

## Droghe d'abuso e morti in Italia

M. MONTAGNA e O. CRIPPA

Istituto di Medicina Legale e delle Assicurazioni dell'Università di Pavia

**Riassunto.** - È riferita la casistica di decessi per abuso di droghe (45 casi di cui 1 per metadone e gli altri per morfiniti) relativi alle province della Lombardia, esclusa quella di Milano, nel periodo 1 gennaio 1974-30 aprile 1981, come osservata dal Laboratorio di Tossicologia forense dell'Istituto di Medicina Legale dell'Università di Pavia. Dal 1977 al 1980 il numero dei casi è passato da 2 a 16, con un aumento del 700%. Nel 1980 l'avvelenamento da morfiniti ha costituito la causa più frequente di morte tossica, superando anche quello da ossido di carbonio. Nel 20% circa dei casi è stata ipotizzata un'azione sinergica dell'alcool, solo o associato a farmaci benzodiazepinici. L'età media delle vittime è risultata pari a 23,7 anni; la letalità è stata prevalente nella fascia di età tra 18 e 24 anni e ha interessato per l'82,2% gli uomini e per il 17,8% le donne. La mortalità più elevata è stata osservata nella provincia di Cremona, seguita da quelle di Bergamo e di Pavia (tassi per 10<sup>5</sup> abitanti rispettivamente 0,17-0,14-0,11). Nelle province di Bergamo, Pavia e Como — costantemente controllate — il numero di decessi da morfiniti (tasso per 10<sup>3</sup> decessi complessivi nella fascia di età tra 15 e 39 anni) è risultato rispettivamente pari a 2,9-2,7-1,7 nel quinquennio 1974-78.

**Summary** (Deaths related to drug abuse in Italy). - The Authors refer about cases of deaths related to drug abuse as registered at the Laboratory of Forensic Toxicology, Institute of Forensic Medicine, University of Pavia, Italy, relative to the provinces of Lombardy — with the only exception of Milan province — for the period 1974 through 1981. Out of 45 cases examined, 44 have been attributed to heroin | morphine and 1 to methadone. From 1977 to 1980 the number of cases increased of 700%. During 1980 poisoning by opiates was the most frequent cause of lethal intoxication, exceeding even carbon monoxide. On the basis of the toxicological findings, an interaction of opiates with alcohol and/or benzodiazepines has been hypothesized in the 20% of cases. Mean age was 23,7 years, mainly between 18 and 24 years. The 82,2% referred to men and 17,8% to women. The highest mortality was observed in the province of Cremona followed by Bergamo and Pavia provinces, corresponding to 0,17-0,14-0,11 deaths per 10<sup>5</sup> inhabitants. In the provinces of Bergamo, Pavia and Como, under a systematic control, from 1974 to 1978 the mortality due to opiates was equal to 2,9-2,7-1,7 per mille total number of deaths, ranging in age from 15 to 39 years.

L'andamento crescente della mortalità per abuso di droghe in Italia è fenomeno accertato: il numero totale dei decessi di cui sono venute a conoscenza le forze

di Polizia è passato da 39 (nel 1977) a 60 (nel 1978) a 129 (nel 1979), con un aumento del 53,8% dal 1977 al 1978 e del 231% dal 1977 al 1979 [1]. Questi dati, ancorché significativi, devono essere considerati in difetto. In soggetti ospedalizzati, in seguito ad intossicazione acuta da oppiacei e mantenuti in vita per alcuni giorni può, ad esempio, accadere che la diagnosi di morte sia formulata in base alla causa terminale e non già alla causa prima del decesso. Non diversamente dagli altri eventi letali che vedono la partecipazione di tossici esogeni, anche l'avvelenamento da droga, nella sua specie più comune di *narcotismo endovenoso*, esige una corretta definizione diagnostica, quale soltanto può derivare da una appropriata impostazione e conduzione dell'indagine medicolegale. I rilievi obiettivi d'indole anatomico-patologica e chimico-tossicologica, integrati con quelli storici, clinici e circostanziali, consentono inoltre di precisare quale sia stato il meccanismo patogenetico della morte: se da apporto eccessivo di droga assuefacente in relazione al grado di tolleranza della vittima (*overdose* e *surdosaggio* relativo), se da azione concomitante di una o più sostanze (*sinergismo* e *potenziamento tossico*) ovvero da abnorme risposta individuale su base immunologica alla droga e/o a suoi sofisticanti; se, ancora, da isolato effetto tossico di sofisticanti. Dati epidemiologici affidabili sulla mortalità connessa all'abuso di droghe è da ritenere possano quindi esclusivamente provenire da settori medicolegali presso cui funzionino seri laboratori di tossicologia forense.

L'esperienza si riferisce ai casi letali da abuso di droghe pervenuti all'osservazione dell'Istituto di Medicina Legale dell'Università di Pavia. Per esigenze di servizio imposte dalla geografia politica della Lombardia, al Laboratorio di Tossicologia forense dell'Istituto di Medicina Legale dell'Università di Pavia affluiscono tradizionalmente, oltre alle richieste di utenza della nostra provincia, la quasi totalità di richieste delle altre province lombarde, mentre il laboratorio di Milano assorbe prevalentemente le domande di intervento della omonima provincia, la cui popolazione rappresenta peraltro circa la metà di quella dell'intera Lombardia. Pavia, inoltre, raccoglie casi sporadici di province limitrofe delle regioni Emilia (PC) e Piemonte (AL e NO) ed eccezionalmente casi da province più lontane. A maggior ragione questo fenomeno si reputa interessi il Laboratorio di Tossicologia forense di Milano, la cui potenzialità ed efficienza di strutture sono a tutti ben note. I dati ricavati dalla casistica ci sembrano perciò di particolare interesse e

utili, ove integrati con quelli relativi a Milano-Monza già esposti dal prof. Lodi (relazione precedente) a ricostruire un quadro, del fenomeno nella regione Lombardia.

La nostra casistica in tema di decessi attribuiti alle droghe d'abuso (1974-81) è riportata in Tab. 1, insieme alla distribuzione dei casi per anno e per provincia. Dal 1977 al 1980 il numero degli eventi è passato progressivamente da 2 a 16: + 200 % dal 1977 al 1978; + 66,6 % dal 1978 al 1979; + 60 % dal 1979 al 1980; + 700 % dal 1977 al 1980. Relativamente all'anno in corso, i dati estrapolati dal primo quadrimestre indi-

cherebbero invece un sensibile decremento della mortalità. L'unico decesso riferito a metadone si colloca alla fine del 1979.

Per valutare il progressivo impegno posto ai Laboratori di Tossicologia forense da questa classe emergente di sostanze tossiche, si consideri che nel periodo 1974-1980, i decessi per morfiniti occupano il terzo posto dopo l'ossido di carbonio e i farmaci, mentre nel solo 1980 essi vengono a rappresentare la categoria a maggior incidenza assoluta, con il 39 % dei casi contro il 29,3 % da ossido di carbonio, il 24,4 % da farmaci e il 7,3 % da ogni altra sostanza (Tab. 2).

Tabella 1. - *Decessi legati alla droga nel periodo 1 gennaio 1974 - 30 aprile 1981.*

	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981 (al 30 aprile)	TOTALE
Bergamo .....	—	2	1	—	2	2	2	—	9
Brescia .....	—	—	—	—	1	2	2	1	6
Como .....	—	—	1	1	—	—	2	2	6
Cremona .....	1	—	—	1	—	1	1	—	4
Mantova .....	—	—	—	—	—	1	—	—	1
Milano .....	—	1	—	—	—	1	2	—	4
Pavia .....	—	—	—	—	2	—	2	—	4
Sondrio .....	—	—	—	—	1	—	—	—	1
Varese .....	—	—	—	—	—	2	1	—	3
<b>TOTALE ...</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>3</b>	<b>38</b>
									<b>84,4%</b>
Alessandria .....	—	—	—	—	—	—	2	—	2
Novara .....	1	—	—	—	—	—	1	—	2
Piacenza .....	—	1	—	—	—	—	—	—	1
Venezia .....	—	—	—	—	—	1	1	—	2
<b>TOTALE ...</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>—</b>	<b>—</b>	<b>—</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>—</b>	<b>7</b>
									<b>15,6%</b>
<b>TOTALE GENERALE ...</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>10</b>	<b>16</b>	<b>3</b>	<b>(a) 45</b>
	<b>4,8%</b>	<b>9,5%</b>	<b>4,8%</b>	<b>4,8%</b>	<b>14,2%</b>	<b>23,8%</b>	<b>38,1%</b>		

(a) N. 44 casi attribuiti ad eroina o morfina e n. 1 caso attribuito a metadone.

Tabella 2. - *Ripartizione degli avvelenamenti acuti letali per grosse classi di sostanze nel periodo 1974-80.*

SOSTANZE DI AVVELENAMENTO	1974		1975		1976		1977		1978		1979		1980		TOTALE	%
	N.	%	N.	%												
Ossido di carbonio .....	12	52,2	9	29,0	19	67,9	17	50,0	24	55,8	16	50,00	12	29,3	109	47,0
Farmaci .....	4	17,4	12	38,7	6	21,4	10	29,4	6	14,0	2	6,25	10	24,4	50	21,5
Morfiniti .....	2	8,7	4	12,9	2	7,1	2	5,9	6	14,0	10	6,25	16	39,0	42	18,1
Altri .....	5	21,7	6	19,4	1	3,6	5	14,7	7	16,2	4	12,50	3	7,3	31	13,4
<b>TOTALE ...</b>	<b>23</b>	<b>100,0</b>	<b>31</b>	<b>100,0</b>	<b>28</b>	<b>100,0</b>	<b>34</b>	<b>100,0</b>	<b>43</b>	<b>100,0</b>	<b>32</b>	<b>100,00</b>	<b>41</b>	<b>100,0</b>	<b>232</b>	<b>100,0</b>

La distribuzione per fasce d'età (Tab. 3) vede prevalere la letalità nella fascia tra 18 e 24 anni (51,2% contro 41,8% nell'intervallo d'età 25-39 anni). Gli uomini hanno rappresentato l'82,2% dei casi, le donne il 17,8% di cui il 75% concentrato nella fascia di età compresa fra 18 e 24 anni. L'età media delle vittime nel periodo considerato è 23,2 anni per gli uomini (min 16; max 29) e 25,6 anni per le donne (min 20; max 40), con un'età media complessiva di 23,7 anni. La ripartizione dei decessi per intervalli di concentrazione ematica della morfina, dell'alcool e dei tranquillanti benzodiazepinici, sostanze costantemente investigate, fatta eccezione per i casi in cui il campione di

sangue era insufficiente, è riportata in Tab. 4. Le fasce di concentrazioni sono state scelte privilegiando la possibilità di individuare il principale meccanismo patogenetico della morte per quanto concerne la morfina; i livelli o gli intervalli di concentrazione ematica dell'alcool etilico e dei farmaci benzodiazepinici hanno avuto come riferimento le soglie tra valori non tossici, terapeutici e tossici. In tutti i casi è stata utilizzata la metodica gascromatografica: dei silil-derivati nel caso della morfina; allo spazio di testa nel caso dell'alcool; con rilevatore a cattura di elettroni nel caso delle benzodiazepine.

Relativamente alla morfina è da sottolineare la prevalenza delle concentrazioni tra 0,5 e 1 mcg/ml, l'eccezionalità di livelli superiori a 2 mcg/ml (si tratta in particolare di un isolato evento suicidiario con eroina in vena) e la rilevanza percentuale (19%) di casi con livelli < a 0,2 mcg/ml. L'alcool è risultato presente in concentrazioni superiori a 1 grammo/litro nel 12% circa dei casi. Nell'ambito dei farmaci benzodiazepinici è stata rilevata, sotto il profilo qualitativo, la maggior partecipazione del diazepam; livelli di farmaco immodificato e del metabolita demetilato superiori complessivamente a 500 ng/ml erano presenti nel 13,3% dei casi. La considerazione conclusiva che emerge dal raffronto dei dati è che l'alcool etilico e/o le benzodiazepine abbiano potuto rappresentare una concausa tossica nel 20% circa dei casi.

Un ultimo rilievo epidemiologico derivante dalla elaborazione dei casi studiati verte sulla distribuzione dei decessi nelle province della Lombardia. Il profilo emergente dai dati analiticamente tabulati e numericamente espressi come tassi per 100.000 abitanti (Tab. 5),

Tabella 3. - *Decessi legati alla droga nel periodo 1 gennaio 1974-30 aprile 1981: ripartizione per sesso ed età.*

ETÀ (ANNI)	Uomini		Donne		Totale	
	N.	%	N.	%	N.	%
<18 .....	2	4,7	—	—	2	4,7
18 ÷ 24 .....	16	37,2	6	14,0	22	51,2
25 ÷ 39 .....	17	39,5	1	2,3	18	41,8
>40 .....	—	—	1	2,3	1	2,3
TOTALE ...	35	81,4	8	18,6	(a) 43	100,0

(a) In 2 casi non era segnalata l'età.

Tabella 4. - *Ripartizione dei decessi attribuiti a eroina (morfina) secondo fasce di concentrazione ematica di morfina, alcool, benzodiazepine, barbiturici.*

LIVELLI MORFINA (mcg/ml)	N. casi (b)	%	LIVELLI ALCOOL (g/l)	N. casi (b)	%	LIVELLI BENZODIAZEPINE (ng/ml)	N. casi (b)	%
<0,2 .....	8	19,0	< 0,1 .....	23	54,8	D + DD:		
0,2 ÷ 0,5 .....	12	28,6	0,1 ÷ 1 .....	14	33,3	< 50 .....	16	53,4
0,5 ÷ 1 .....	16	38,1	1 ÷ 2 (c) .....	3	7,1	50 ÷ 500 .....	7	23,3
1 ÷ 2 .....	5	11,9	> 2 (c) .....	2	4,8	> 500 (c) .....	4	13,3
> 2 .....	1	2,4				FN:		
						< 10 .....	—	—
						> 10 (c) .....	(d) 2	6,7
						B:		
						< 100 .....	—	—
						> 100 (c) .....	(e) 1	3,3
TOTALE ...	42	100,0	TOTALE ...	42	100,0	TOTALE ...	30	100,0

Legenda: D = diazepam; DD = N-demetilidiazepam; FN = flunitrazepam; B = bromazepam.

(a) Barbiturico è stato riscontrato in un solo caso dei 32 esaminati: si trattava di fenobarbitale a 3,1 mg% associato ad alcool a 0,45 g/litro.

(b) Casi in cui è stato effettuato il dosaggio delle singole sostanze.

(c) Livelli tossici.

(d) In un caso associato a g 1/litro di alcool.

(e) Associato a 466 ng/ml di D + DD.

Tabella 5. - *Distribuzione decessi per provincia. Dati espressi in tassi  $\times 100.000$  abitanti.*

PROVINCIA	N. abitanti (1979)	Tassi $\times 10^5$						Tassi $\times 10^5$ (media)	
		1974	1975	1976	1977	1978	1979		1980
Bergamo (a) .....	$8,9 \times 10^5$	—	0,22	0,11	—	0,22	0,22	0,22	0,14
Brescia .....	$10,1 \times 10^5$	—	—	—	—	0,10	0,20	0,20	0,07
Como (a) .....	$7,7 \times 10^5$	—	—	0,13	0,13	—	—	0,26	0,07
Cremona .....	$3,3 \times 10^5$	0,30	—	—	0,30	—	0,30	0,30	0,17
Mantova .....	$3,8 \times 10^5$	—	—	—	—	—	0,26	—	0,04
Pavia (a) .....	$5,2 \times 10^5$	—	—	—	—	0,38	—	0,38	0,11
Sondrio .....	$1,7 \times 10^5$	—	—	—	—	0,59	—	—	0,08
Varese .....	$7,9 \times 10^5$	—	—	—	—	—	0,25	0,13	0,05
Milano (b) .....	$40,6 \times 10^5$	—	—	—	—	—	—	—	—

(a) Province afferenti per la totalità dei casi al settore medico-legale di Pavia.

(b) Non considerato perché afferente, salvo casi eccezionali (4 nel periodo in esame), al settore milanese.

segnala una maggior mortalità per le provincie di Cremona ( $0,17 \times 10^5$ ) Bergamo ( $0,14 \times 10^5$ ) e Pavia ( $0,11 \times 10^5$ ); ( $0,23 \times 10^5$ ) per quanto concerne i confronti con l'area milanese (Milano-Monza, 1974-79, 55 casi [2]).

La mortalità da droghe d'abuso, espressa in tasso  $\times 10^3$  decessi anziché per  $10^5$  abitanti, e limitatamente alla fascia di età interessata in modo pressoché esclusivo al fenomeno (da 15 a 39 anni), porta per le provincie di Bergamo, Pavia e Como, di cui riteniamo con ragionevole certezza di aver controllato la totalità dei casi, a valori di 2,9-2,7-1,7 (Tab. 6).

Tabella 6. - *Distribuzione dei decessi per provincia. Dati espressi in tassi per 1.000 decessi.*

PROVINCIA	N. totale decessi (periodo 1974-78; anni 15 ÷ 39) (a)	N. decessi per droga	Tassi $\times 10^3$
Bergamo .....	$1,72 \times 10^3$	5	2,9
Como .....	$1,16 \times 10^3$	2	1,7
Pavia .....	$0,75 \times 10^3$	2	2,7

(a) Dati desunti da « Annuario di Statistiche demografiche » aggiornato al 1978.

## BIBLIOGRAFIA

1. AA. VARI. 1980. *Rapporto Droga Italia 1977-78-79*. EB 0, p. 46.
2. MAROZZI, E., GRANDI, M. & SALIGARI, E. 1980. Rilevazioni sui soggetti morti per droga. Esperienze dell'Istituto di Medicina Legale dell'Università di Milano dal 1958 ad oggi. *Notizie Sanità*, II Suppl. 27: 71-82.

## Alcune caratteristiche chimico-analitiche delle sostanze stupefacenti sequestrate nella città di Roma

C. DE ZORZI (a) e A. LOPEZ (b)

(a) Istituto di Medicina Legale e delle Assicurazioni; (b) Laboratorio autonomo di Tossicologia Forense, Università degli Studi, Roma

**Riassunto.** - L'Autore riporta i risultati delle indagini eseguite nell'anno 1980 su campioni di sostanze stupefacenti sequestrate dall'autorità giudiziaria ed esaminate presso il Laboratorio chimico dell'Istituto di Medicina Legale di Roma. Si è rilevato il notevole aumento del numero di reperti esaminati rispetto a quanto osservato in precedenza, con particolare evidenza per i reperti costituiti da cocaina e eroina. A proposito delle sofisticazioni di queste due ultime sostanze si è osservata una modificazione nel tempo delle sostanze aggiunte a tale scopo. Di particolare significato, infine, l'elevata percentuale di eroina nelle miscele usate per il piccolo commercio.

**Summary** (Chemico-analytical specifications of drugs seized in Rome). - The Author reports the results of the researches carried out during the year 1980 on samples of drugs seized by the judicial authorities and examined by the chemical laboratory of the Institute of Legal Medicine in Rome. The remarkable increase of the examined seizures has been noticed in relation to the previous observations, particularly for cocaine and heroine. A modified composition as to the sophisticating substances of these two drugs has been observed during the time. Particularly, the marked percentage of the heroine in the mixtures used for retail trade has been noticed.

Il bilancio delle operazioni analitiche eseguite in una grande città, su richiesta della Magistratura, e la qualità e quantità del materiale sequestrato ai fini di Giustizia possono essere collegati con l'incremento e la diffusione crescente delle sostanze stupefacenti nel nostro Paese.

I dati esposti in questa nota, pur non potendo rappresentare tutta l'attività peritale svolta in questo campo nella città di Roma, in quanto anche altri laboratori chimici, sia pure con una attività più ridotta, sono incaricati di tali indagini, possono comunque offrire un quadro abbastanza rappresentativo della situazione attuale (Tab. 1). Si deve rilevare, tra l'altro, come il numero dei casi esaminati nell'anno 1980 presso questo laboratorio, sia aumentato di quasi 10 volte rispetto

Tabella 1. - Indagini su stupefacenti. Anno 1980.

SOSTANZE	N. casi	N. confezioni	Peso (kg)
Hashish .....	79 (3)	198	57,339
Marijuana .....	56 (2)	195	140,381
Cocaina .....	39	85	9,599
Eroina .....	113	197	7,413
Oppio .....	2	2	0,395
Morfina .....	6	—	{ 0,248 (base) 129 (fiale)
Metadone .....	2	—	30 ml
LSD.....	1	—	4 compresse
TOTALE ...	298		

al 1976 e di 100 volte rispetto al 1974. Si nota la totale assenza di anfetamine, a differenza di quanto noi stessi avemmo occasione di rilevare in precedenza, e il riscontro di un solo caso di LSD. Quest'ultima sostanza appare quasi del tutto scomparsa dall'uso nella nostra città.

Oltre al notevole incremento della diffusione dell'eroina, si è notata in questi ultimi anni una crescente diffusione della cocaina, confermata anche dai dati da noi ottenuti nei primi mesi del 1981, sia per numero di casi che per quantità di sostanza sequestrata.

I numeri in parentesi, relativi ai casi di hashish e di marijuana, indicano, rispettivamente, l'olio di hashish e la coltivazione di *cannabis*. Si precisa infine che, ovviamente, il numero delle confezioni esaminate e costituenti i vari reperti è superiore a quello dei relativi casi, rappresentando oltre il doppio di questi (Tab. 2). Con la dicitura *importazione* sono indicati i reperti sequestrati, di massima, al loro arrivo all'aeroporto intercontinentale Leonardo Da Vinci. È da rilevare che, come già visto in altri casi precedenti, i due cam-

Tabella 2. - *Hashish e Marijuana.*

N. C A S I	Peso (kg)	THC %
<i>Hashish</i>		
22 (importazione) .....	56,889	} 6,1 (0,4-16,0)
54 (consumo o piccolo spaccio) .....	0,450	
76 (+ 3) (a) .....	57,339	
<i>Marijuana</i>		
29 (importazione) .....	139,816	} 1,7 (0,1-5,6)
25 (consumo o piccolo spaccio) .....	0,565	
54 (+ 2) (b) .....	140,381	

(a) Olio di hashish.  
(b) Piante.

pioni di *cannabis* coltivata in Italia presentavano entrambi un tasso di principio attivo (THC > 0,5 %) che la rendevano idonea come stupefacente; mentre per l'olio di hashish la percentuale di THC è risultata compresa tra il 4,2 % e il 18 %. A proposito della cocaina (Tab. 3) si noti l'elevata quantità di sostanza *importata*, con altissimo grado di purezza e la notevole variabilità, per qualità e quantità, del *taglio* usato. Per quanto concerne quest'ultimo, si nota una certa diminuzione nella frequenza degli anestetici locali o degli antipiretici-antivirglici rispetto a quanto da noi osservato in pre-

Tabella 3. - *Cocaina.*

N. C A S I	Peso (kg)	%
<i>Cocaina</i>		
5 (importazione) .....	9,390	99
34 (consumo o piccolo spaccio) ..	0,209	5-87
39 .....	9,599	

## TAGLI:

Lattosio; Glucosio; Talco; Benzocaina; Lidocaina; Procaina; Piramidone; Fenacetina; Caffaina.

## MISCELE:

- 1) Cocaina 30 %; Eroina 9 %; Zuccheri.
- 2) Cocaina 57 %; Eroina 12 %; Zuccheri.
- 3) Cocaina 5 %; Eroina 1 %; NaHCO<sub>3</sub>; Acido tartarico; Sodio solfito; Sodio ioduro.

cedenza, con frequente presenza di zuccheri. È da rimarcare anche il *taglio* con talco, unica sostanza aggiunta alla cocaina, in percentuale di circa il 41 %. Anche in alcuni piccoli campioni destinati al consumo diretto o al piccolo spaccio, la cocaina è risultata completamente esente da sostanze estranee. Può essere interessante notare la miscelazione di cocaina con eroina, con netta prevalenza quantitativa della prima, tagliate con zuccheri (due casi), nonché l'eterogeneo insieme di sostanze chimiche aggiunte alla cocaina e alla eroina, quest'ultima in assai bassa percentuale, in uno dei casi osservati; le motivazioni di questa particolare miscela appaiono, tuttavia, differire da un semplice uso di sostanze stupefacenti, prospettandosi piuttosto un tentativo di deliberato danneggiamento.

Dai dati in Tab. 4 si può rilevare una certa frequenza di morfina in fiale, motivo certamente questo di apprensione e di discussione in tema di terapia della tossicodipendenza da oppiacei.

Tabella 4. - *Oppio, Morfina, LSD e Metadone.*

N. C A S I	Peso (g)	Morfina %
<i>Oppio</i>		
2 (importazione) .....	395	6,7-9,1
<i>Morfina</i>		
1 (importazione) .....	248 (base)	
5 (consumo o piccolo spaccio)	129 fiale (sol. 20 mg/fiala)	
<i>LSD</i>		
1 .....	compresse n. 4	mcg 50/cp
<i>Metadone</i>		
2 .....	sol.	ml. 30

Per quanto concerne le miscele a base di eroina (Tab. 5), è da notare l'elevato numero di confezioni ad alta percentuale di sostanza stupefacente, accanto alla totale scomparsa di stricnina come sostanza di *taglio*. Sono invece diventati molto numerosi i casi di miscelazioni con anestetici locali, esclusivamente usati in tempi passati in associazione alla cocaina.

In alcuni campioni di eroina, in particolare tra quelli di colore bruno-chiaro, risulta spesso la presenza di alcaloidi dell'oppio, quali la narcotina o la papaverina, indice questo di scarsa purificazione del prodotto di base.

Nella Tab. 6 sono riuniti alcuni dati analitici che si riferiscono a campioni di stupefacenti provenienti da piccoli spacciatori o piccoli consumatori, la cosiddetta *droga di strada*, oggetto di una specifica indagine in corso nel mio laboratorio.

L'alta percentuale di eroina presente in quasi tutte le dosi pronte al consumo fa prevedere ovvie conseguenze in tema di morte da overdose.

Tabella 5. - *Eroina.*

N. CASI	Peso (kg)	%
	<i>Eroina</i>	
9 (importazione) .....	6,962	26,1 (5-53 %) 94 camp.
104 (consumo o piccolo spaccio) .....	0,451	83,8 (63-99 %) 30 camp.
113.....	7,413	
<b>TAOLI:</b>		
Mannite; Lattosio; Glucosio; Fruttosio; Acido tartarico; Caffaina; Fendimetrazina; Procaina; Lidocaina; Benzocaina; Amido.		
<b>IMPUREZZE:</b>		
Narcotina; Papaverina; Monoacetilmorfina; Acetil-codeina.		

Tabella 6. - *Droga da strada.*

Peso (mg)	Eroina %	Impurezze	Taglio
60	tracce	mam + ac	saccarosio
118	46	mam + ac + N	saccarosio
66	85	mam + ac + N	gluc. + lat.
345	16	mam + ac	gluc. + lat. + lidoc.
40	96	mam + ac	
54	90	mam + ac + N	
96	85	mam + ac + N	
345	49	mam + ac	gluc. + lat.
343	52	mam + ac + N	glucosio
250	82	mam + ac + N	glucosio
60	60	mam + ac	sacc. + lat.
71	29	mam + ac	lattosio
74	89	mam + ac + N	
	Cocaina %		
150	80		glucosio
<i>Legenda:</i> mam = monoacetilmorfina; ac = acetilcodeina; N = narcotina.			

## Altri interventi

# L'intervento socio-sanitario nelle tossicodipendenze da oppiacei in Italia: diverse modalità di attuazione, risultanze epidemiologiche delle esperienze straniere, prospettive di ricerca

A. LIBERATI, R. CACCAVARI, C. CORADESCHI, L. MACCIONI e G. PEPINO

Segreteria Tecnica, Coordinamento Nazionale Operatori Tossicodipendenze, Firenze

**Riassunto.** — Sono illustrate le diverse modalità di applicazione dei decreti ministeriali — relativi al trattamento con farmaci sostitutivi a tossicodipendenti accertati — nelle diverse regioni italiane. I principali dati provenienti da esperienze condotte in altri Paesi, sia nel campo degli interventi farmacologici che delle comunità terapeutiche, vengono riesaminati alla luce dei principali problemi metodologici che rendono criticabili i risultati singoli, e compromettono la possibilità di confronti attendibili tra le diverse esperienze. Vengono inoltre discussi i filoni principali di ricerca epidemiologica da attivare, sono presentati alcuni parametri di valutazione per il monitoraggio dell'intervento socio-sanitario; vengono inoltre individuati alcuni terreni su cui sviluppare indagini trasversali e prospettiche su definite dimensioni territoriali e specifiche fasce a rischio.

**Summary** (Social health actions towards opioid dependence in Italy: findings and perspectives on the basis of foreign experience). — *The various ways of applying Ministerial Decrees concerning replacement drug treatment for confirmed drug addicts are illustrated, referring to various regions of Italy. The main findings of studies in other countries, as regards pharmacological measures and therapeutics communities, are re-examined in the light of the methodological difficulties which weaken the individual results and make it difficult to establish a reliable basis for comparing the various studies. The main lines of epidemiological research worth activating are discussed. Some parameters are presented for monitoring social and health measures. Areas are identified in which cross-sectional and perspective studies might be developed, involving defined catchment areas and specific groups at risk.*

### INTRODUZIONE

Interventi con utilizzo di farmaci sostitutivi (metadone o morfina) erano stati avviati in alcune strutture pubbliche (Liguria, Piemonte, Toscana, Emilia) e con iniziative di tipo volontario (Lombardia e Lazio), già precedentemente ai Decreti Ministeriali 7 agosto 1980 e 10 ottobre 1980 e indipendentemente dall'obiettivo esclusivo di una rapida disassuefazione dell'utente [1]. Il fischio di una forte spinta alla medicalizzazione, implicito nei due D.M., viene ulteriormente amplificato dalla confusione e dalla disomogeneità che si riscontra nelle delibere delle singole regioni italiane.

Per esemplificare questa situazione riportiamo, nella Tab. 1, alcuni parametri che sono stati scelti per una

Tabella 1. — *Lettura comparata delle delibere attuative regionali.*

1) Sede dell'accertamento della tossicodipendenza e della definizione del piano terapeutico: nove regioni hanno scelto gli Ospedali come sede per i servizi.

2) Tipo di trattamento indicato (solo scalare o anche possibilità di stabilizzazione a cicli): due regioni indicano come esclusivamente praticabile il trattamento scalare, da portare a termine entro un mese; altre dieci regioni pongono riserve pesanti al trattamento a lungo termine; sono pertanto dodici le regioni che indicano la terapia scalare a breve termine come unico trattamento praticabile.

3) Modalità di assunzione del farmaco: nove regioni parlano della sola possibilità di somministrazione in loco, motivando questa scelta come controllo sul potenziale 'mercato grigio' e come 'terapeuticità' della continua frequenza ai centri sanitari.

4) Tipo di farmaco: otto regioni indicano che l'unico farmaco da utilizzare è il metadone sotto forma di sciroppo.

5) Rapporto con la medicina di base: cinque regioni indicano come solo occasionale la possibilità di decentrare l'assistenza; quindici regioni prevedono invece senza particolari vincoli la possibilità di collegamento con i Presidi pubblici da parte dei singoli medici.

6) Tesserino sanitario per l'utente: dodici regioni ignorano le indicazioni dei decreti ministeriali circa la adozione del tesserino sanitario personale.

7) Normativa per i minori: sei regioni negano al minore la possibilità di accedere ai Servizi senza il consenso dei genitori o del giudice tutelare. Questa norma è in palese contraddizione con l'articolo 95 della legge 685/75.

8) Residenza dell'utente: tutte le regioni fanno obbligo di verificare la residenza dell'utente prima di dare inizio a qualsiasi forma di assistenza; il 'giustificato motivo' per prendere in carico anche i non-residenti è però totalmente lasciato alla discrezionalità del singolo operatore.

9) Limitazioni nella posologia giornaliera: undici regioni non indicano alcuna limitazione; tra le regioni che specificano un dosaggio i limiti sono per la morfina sempre 120 mg/die, mentre per il metadone si oscilla dai valori di 30-40mg/die (Toscana) a quelli di 80-100mg/die (Sardegna).

lettura comparata delle diverse delibere attuative dei D.M. Si rilevi che, peraltro, non sono stati neppure definiti né accennati criteri, generali e specifici, di valutazione degli interventi a livello nazionale.

L'introduzione di elementi ideologici soggettivi, diversi dall'impegno a garantire il massimo di salute psicofisica, nella ammissione del tossicodipendente e nella valutazione di efficacia dell'intervento, impedirebbe ulteriormente la raccolta di possibili risultati dei provvedimenti adottati.

#### RISULTATI DELLE ESPERIENZE STRANIERE.

Un esame sommario di dati disponibili sui programmi a base farmacologica e sui trattamenti in comunità consente di fare le seguenti considerazioni.

Tra i programmi a base di farmaci sostitutivi, quelli con metadone, anche se già meglio caratterizzati e standardizzati rispetto ad altri, non hanno potuto evitare diverse critiche [2-5]: a) per la scelta dei parametri di valutazione del « successo terapeutico »; b) per la scelta del gruppo di riferimento; c) per i motivi di sospensione e la conseguente « selezione favorevole » della popolazione [6]. Gli stessi « tassi di ritenzione » ad un anno rilevati all'interno di programmi di trattamento sono passati da 90 % (metà '60) [7,8] a 50-60 % (metà '70) [9].

Minori elementi valutativi sono disponibili sulle comunità terapeutiche: per l'assenza di dati attendibili riguardo i soggetti che hanno abbandonato il programma [10, 11]; per i problemi di reinserimento manifestati al termine del soggiorno in comunità [12]; per la mancanza di un gruppo di controllo; per l'insufficienza di analisi costi/benefici non solo economici [13]; per una carente descrizione delle modalità di trattamento in quasi tutti gli studi, salvo qualche caso [14].

Così, in base ad alcuni elementi disponibili [9], non si sono ad esempio rilevate differenze tra soggetti in C.T. e soggetti in trattamento metadonico a lungo termine. Anche il ricorso a sostanze antipsicotiche non sembra aver dato risultati favorevoli [15], mentre qualche successo sembrerebbe derivare dall'uso di benzodiazepine, che tuttavia presentano un certo rischio d'abuso e di sostituzione rispetto all'eroina.

#### INDIRIZZI DI RICERCA EPIDEMIOLOGICA PER LA REALTÀ ITALIANA.

Filoni di ricerca epidemiologica che permettano una valutazione integrata, in grado di valutare in maniera continua ed attendibile l'efficacia dei diversi interventi a carattere sia medico che psico-sociale, di tipo preventivo, curativo e riabilitativo potrebbero consistere nei seguenti.

##### *Ricerca sui dati correnti.*

Riguarda un'attività di ricerca mirata a fini valutativi all'interno dei servizi, basata sul monitoraggio di alcuni parametri per stimare l'impatto dell'intervento socio-sanitario:

- patologie associate (epatiti, epatopatie, flebiti, patologie renali e polmonari);

- andamento dei decessi per sovradosaggio o sostanze da taglio;

- diminuzione delle attività illecite: denunce, carcerazioni, arresti;

- miglioramento nella capacità di gestione dei rapporti interpersonali, inserimento lavorativo, scolastico, diminuzione conflittualità distruttiva;

- diminuzione del ricorso al mercato nero.

##### *Ricerche sui servizi e sulla popolazione generale.*

Questo tipo di ricerca, che si può definire ricerca per la prevenzione, dovrebbe invece fornire elementi per la valutazione dei fattori che incidono maggiormente sulla definizione di rischio di tossicomania, e che possono risultare predittivi dell'andamento del fenomeno.

In base al carattere multifattoriale del problema risulta più utile, in questo contesto, porsi l'obiettivo della ricerca del quanto e del come piuttosto che del perché. Come obiettivo minimo si potrebbe considerare la verifica se il fenomeno tossicodipendenza è veramente caratterizzato da quel tipo di manifestazioni che si evidenziano a livello istituzionale, o se è invece quest'ultimo a determinarle e definirle: un'indagine, ad esempio, mirata a cogliere la immagine che il servizio dà di sé all'utenza e l'immagine che l'utenza ha del servizio. Studi di questo tipo possono essere eseguiti mediante questionari mirati, da somministrare al personale e agli utenti dei servizi, campionando strutture interne ad aree urbane e ad aree geograficamente decentrate. Questo tipo di indagini se adeguatamente programmate nel tempo e nello spazio possono fornire, oltre ad una immagine conoscitiva diretta della diffusione dell'uso e dell'abuso di sostanze lecite e illecite e della sua evoluzione nel tempo, anche la misura dell'impatto di interventi di educazione sanitaria, di informazione, e di attività di carattere socio-culturale e politico [17, 18]. Singoli progetti di ricerca più mirati e di minori dimensioni, possono invece essere svolti su specifiche situazioni (distretti o U.S.L. particolarmente colpite dal fenomeno) seguendo una metodologia di ricerca che procede per livelli progressivi di approfondimento conoscitivo, utilizzando il metodo del confronto e della validazione, con l'obiettivo di fornire una dimensione quantitativa e qualitativa dell'abuso di droghe.

#### CONCLUSIONI.

Se è questa la complessità della problematica, qual'è il senso della battaglia attorno agli aspetti medico-sanitari e di omogeneizzazione legislativa? Crediamo che il farmaco, e più in generale l'assistenza sanitaria, siano degli strumenti (certamente non i più importanti se il loro uso è fatto correttamente, e da usare solo in determinate condizioni di gravità) con i quali è possibile tentare di restituire all'individuo una dignità ed una speranza di vita. Ciò che si chiede all'indagine epidemiologica è di andare al di là della pura descrizione del fenomeno in termini di incidenza e prevalenza; è necessario, attraverso una onesta concorrenza —

che parta dalla constatazione della insufficienza dei dati oggi disponibili a dimostrare la superiorità di un tipo di intervento rispetto all'altro — arrivare ad acquisire dati in grado di stimare la differente efficacia degli interventi e la loro fattibilità. Condizione fondamentale

per questo è che, a partire dalle legislazioni regionali, si arrivi a definire un quadro generale di intervento in cui i diversi approcci derivino tutti da una comune impostazione programmatica, e siano sottoposti a comuni momenti di verifica.

#### BIBLIOGRAFIA

1. CORADESCHI, C., CACCAVARI, R., LIBERATI, A., MACCIONI, L. & PEPINO, N. 1981. I due decreti Aniasi: prospettive di attuazione e priorità di ricerca epidemiologica. *Epidemiologia e Prevenzione* (in stampa).
2. MADDUX, J. & BOWDEN, C. L. 1972. Critique of success with methadone maintenance. *Am. J. Psychiatry*. **129**: 440-446.
3. KLEBER, H. D. 1977. Methadone maintenance treatment. A reply. *Am. J. Drug Alcohol Abuse*. **4**: 267-272.
4. PERKINS, M. E. & BLOCH, H. I. 1971. A study of some failures in methadone treatment. *Am. J. Psychiatry*. **128**: 79-83.
5. BALE, R. N., CABRERA, S. & BROWN, J. 1977. Follow-up evaluation of drug abuse treatment. *Am. J. Drug Alcohol Abuse*. **4**: 223-249.
6. JAFFE, J. H. 1971. Further experience with methadone in the treatment of narcotic users. In: *Methadone Maintenance*. S. Einstein (Ed.). M. Dekker, New York, pp. 29-40.
7. DOLE, V. P. & NYSWANDER, M. E. 1965. A medical treatment for diacetylmorphine (heroin) addiction: a clinical trial with methadone hydrochloride. *J. Am. Med. Assoc.* **193**: 646-650.
8. PERKINS, M. E. & RICHMAN, A. 1972. Prevalence of participation in methadone programs. *Am. J. Psychiatry*. **129**: 447-450.
9. BALE, R. N., VAN STONE, W. W., KULDAU, J. M., ENGELSING T. M. J. & ZARCONF, V. P. 1980. Therapeutic Communities vs. methadone maintenance. A prospective controlled study of narcotic addiction treatment: Design and one-year follow-up. *Arch. Gen. Psychiatry*. **37**: 179-193.
10. BALE, R. N. 1979. Outcome research in therapeutic communities for drug abusers: A critical review 1963-1975. *Int. J. Addict.* **14**: 1053-1074.
11. HARRIS, R. & LINN, M. W. 1980. A comparison of dropouts and disciplinary discharges from a therapeutic community. *Int. J. Addict.* **15**: 749-756.
12. COLLIER, W. V. & HIJAZI, M. A. 1974. A follow-up study of former resident of a therapeutic community. *Int. J. Addict.* **9**: 805-826.
13. ARON, W. S. & CAMARILLO, D. D. 1974. Short and long term therapeutic communities: A follow-up and cost effectiveness comparison. *Int. J. Addict.* **9**: 619-636.
14. SELLS, S. B. 1974. *The Effectiveness of Drug Abuse Treatment*. Vol. 2: *Patient Profiles, Treatment and Outcomes*. Ballinger, Cambridge, Massachusetts.
15. CICCONE, P. E., O'BRIEN, C. P. & KHATAMI, M. 1980. Psychotropic agents in opiate addiction: A brief review. *Int. J. Addict.* **15**: 499-513.
16. HOCHHAUSER, M. 1979. Bias in drug abuse survey research. *Int. J. Addict.* **14**: 657-687.
17. SCHAPS, E., CHURGIU, S., PALLEY, G.S., TAKATA, B. & COHEN, A.Y. 1980. Primary prevention research: A preliminary review of program outcome studies. *Int. J. Addict.* **15**: 657-676.
18. CHAMPION, R. A. & BELL, D. S. 1980. Monitoring trends in drug use. *Int. J. Addict.* **13**: 375-390.

## Aspetti epidemiologici e implicanze psicosociali dell'epatite virale B nei tossicodipendenti

M. A. BALBO (a), L. GALLO (a) e G. RAIMONDO (b)

(a) Servizio Tossicodipendenze, Torino; (b) Divisione di Gastroenterologia, Ospedale Maggiore San Giovanni, Torino

**Riassunto.** - La presentazione svolta dal Servizio Tossicodipendenze di Torino, su un campione di soggetti afferenti al Servizio, ha fornito dati favorevoli a considerare la grave incidenza delle implicanze psicosociali dell'HBV nei tossicodipendenti. Essa ha permesso di constatare il livello qualitativamente e quantitativamente superiore di conoscenza in tema di HBV nei tossicodipendenti rispetto ai gruppi di controllo. La conoscenza corretta viene, però, inattivata nelle sue implicanze preventive dalla situazione di dipendenza dalla sostanza stupefacente. L'informazione risulta essere fornita ai tossicodipendenti dal gruppo di appartenenza. Paradossalmente è il resto della popolazione coetanea a dimostrare una scarsa, spesso scorretta conoscenza, tranne nei casi di esperienza diretta della malattia. In conclusione è emersa l'opportunità di affrontare insieme al tossicodipendente il problema dello HBV nei termini di programma terapeutico complessivo. Questo può costituire la possibilità di una ripresa di contatto con la realtà e un recupero riparativo del corpo e dell'individualità del tossicodipendente.

**Summary** (Epidemiological aspects and psycho-social implications of HBV of heroin addicts). - *The research carried out by the Drug Dependence Service of Turin on a group of subjects tied to the Service, has furnished data favorable towards considering the serious incidence of the psycho-social implications of HBV on heroin addicts. It has allowed the researchers to establish the existence of a higher qualitative and quantitative level of knowledge of the subject of HBV in heroin addicts as compared to the control groups. However, in terms of its preventive implications, this acute awareness of the addict becomes inert, due to his situation of dependence on narcotic drugs. The information is actually passed among the addicts themselves. Paradoxically, it is the remainder of the population to demonstrate a scarce (often incorrect) awareness, except in cases of direct experience with the disease. The opportunity emerged to confront the problem of HBV in terms of a complete program of therapy (medical and psychological) together with the drug addicts themselves. This may constitute the possibility of a renewed contact with reality and a substantial recovery of the drug addicts individuality as well as physical state of his body.*

### INTRODUZIONE.

L'epatite da virus B (HBV) è molto diffusa tra i tossicodipendenti. L'infezione di virus B (trasmessa selettivamente attraverso il sangue e i suoi derivati) spesso

si cronicizza e causa una malattia epatica progressiva, invalidante e talora mortale. Per le sue caratteristiche epidemiologiche il virus B prevale nei politrasfusi ed in questi individui predomina rispetto alla popolazione generale. I tossicodipendenti si comportano come soggetti politrasfusi in quanto esposti parenteralmente alle tracce di sieri contaminati, aghi e siringhe usati promiscuamente: da tempo è stata segnalata nei tossicodipendenti nord-americani un'altissima incidenza di indici sierologici da infezione da HBV. Sebbene i fattori tossici rappresentati dallo stupefacente, i tagli, il diluente, l'abuso di neurolettici e di alcool contribuiscono alla disfunzione epatica nel tossicodipendente, l'epatite clinica risale solitamente all'infezione con virus epatotroni contaminanti gli strumenti utilizzati per il buco. Nella popolazione tossicodipendente torinese non si riscontrano, tuttavia, fattori di rischio correlabili all'infezione da virus A, poiché non risultano differenze significative, rispetto al resto della popolazione giovanile, riguardo all'abitazione, al tipo e alla modalità di alimentazione, al livello igienico, ai viaggi (a).

L'esposizione parenterale ad agenti epatitici tramite aghi e siringhe contaminati segrega e concentra l'infezione virale tra i tossicodipendenti, dove l'epatite si diffonde per trasmissione sporadica endemica o attraverso mini-epidemie. Il persistente contatto con virus epatitici facilita la cronicizzazione dell'infezione e quote significative di tossicodipendenti diventano portatori cronici di viremia: alcuni sviluppano epatopatia cronica, altri, la maggior parte, rimangono asintomatici e rappresentano focolai cronici di infezione per altri tossicodipendenti e per i loro partners nella vita di relazione. Nella popolazione tossicodipendente torinese risulta che l'84,5% dei tossicodipendenti apparentemente asintomatici ha subito l'infezione da HBV: mentre il 59,5% ha superato l'infezione, il 20% è rimasto infettivo. Un ulteriore 5% è potenzialmente infetto e contagioso [1].

Durante lo screening clinico ed epidemiologico effettuato in occasione della ricerca sopra citata, ma già prima, nel rapporto quotidiano con i tossicodipendenti, siamo rimasti colpiti dall'interesse, dall'apparente conoscenza e dal coinvolgimento emotivo che i nostri utenti dimostrano rispetto alla HBV. La rilevanza del pro-

(a) Comunicazione personale, Dott.ssa A. Moiraghi Ruggenini, Istituto di Igiene Università di Torino.

blema e l'insieme delle osservazioni ci ha condotto a formulare le seguenti ipotesi di ricerca:

- i tossicodipendenti hanno più informazioni e maggior conoscenza, circa l'HBV, dei coetanei non tossicodipendenti;

- la conoscenza, per la popolazione non tossicodipendente, è legata alla esperienza diretta della malattia;

- le informazioni sull'HBV vengono trasmesse ai tossicodipendenti direttamente dal loro gruppo di appartenenza;

- di fronte al rischio di contrarre la malattia, il tossicodipendente è maggiormente influenzato dalla propria situazione di dipendenza dalla sostanza piuttosto che dal timore di ammalarsi. La conoscenza sufficiente del problema ben poco conta di fronte a situazioni esistenziali e psicologiche nelle quali l'uso di droga sia soggettivamente compensativo di disagi profondi.

#### MATERIALI E METODI.

Abbiamo usato un questionario aperto di 25 domande riguardanti conoscenza oggettiva, soggettiva e vissuto personale. Per quanto riguarda il metodo, i dati ottenuti sono stati elaborati dal calcolatore secondo il sistema SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) [2]. Il questionario è stato sottoposto a 160 individui di ambo i sessi divisi nei seguenti campioni:

- 43 soggetti tossicodipendenti che hanno avuto o hanno l'HBV (Tossi/ep);

- 38 soggetti che non hanno mai avuto l'HBV (Tossi);

- 39 soggetti non tossicodipendenti che hanno avuto o hanno l'HBV (Controllo/ep);

- 40 soggetti sani e non tossicodipendenti (Controllo).  
I campioni, randomizzati, comprendono individui di età compresa tra i 15 e i 35 anni e appartenenti a classe sociale medio, medio-bassa.

#### RISULTATI.

Nella Tab. 1 si può osservare la composizione dei campioni tossicodipendenti: il numero di soggetti tossicodipendenti di età inferiore ai 21 anni è 38 (16 + 22)

Tabella 1. - *Caratteristiche relative alle fasce d'età (15-21 anni e 21-35 anni) e al sesso del campione esaminato e della corrispondente popolazione regionale.*

	Campione	Dati regionali
<b>Età:</b>		
15-21 anni	38 = 46,9%	40,0%
21-35 anni	43 = 53,1%	60,0%
<b>Sesso:</b>		
Maschi	65 = 80,3%	82,5%
Femmine	16 = 19,7%	17,5%

pari al 46,9%, dato confrontabile con quello fornito dalla regione Piemonte per il 1979 (40%). I tossicodipendenti di età superiore sono 43 (27 + 16) pari al 53,1% confrontabile con il dato regionale (60%). Abbiamo fissato come *range* di età 15-35 perché questo è l'arco di età entro cui è raccolta la quasi totalità dei tossicodipendenti che afferiscono al Servizio. Riguardo alla distribuzione secondo il sesso i nostri campioni di tossicodipendenti risultano confrontabili con i dati forniti dalla regione Piemonte: i maschi sono 65 pari all'80,3% (dato regionale: 82,5%), le femmine 16 pari al 19,7% (dato regionale: 17,5%). Il nostro campione di tossicodipendenti non epatici (Tossi) e il campione dei sani non tossicodipendenti (Controllo) risultano perfettamente confrontabili in quanto il gruppo Controllo è stato scelto tale per età e sesso. Si è rivelato impossibile creare il campione Controllo/ep omogeneo agli altri per il parametro sesso. Non è stata riscontrata nessuna differenza significativa nei due campioni tossicodipendenti rispetto al parametro degli anni di tossicodipendenza (da 0 a 1 anno: 29%, da 2 a 5 anni: 54%, oltre: 17%).

Nella Fig. 1 risulta una netta differenza, rispetto alla domanda «che cos'è l'epatite virale tipo B» tra le risposte date dai tossicodipendenti (tutte e due i campioni) e quelle date dal Controllo/ep e dal Controllo.

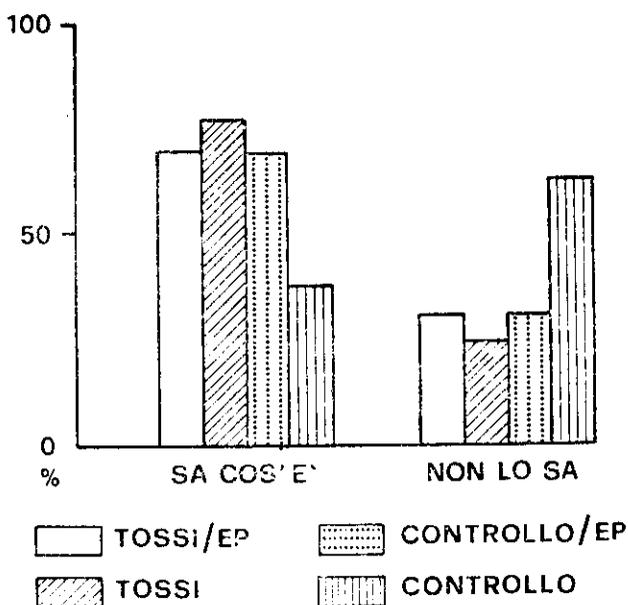


FIG. 1. - Cos'è l'epatite virale di tipo B?

Dimostrano di sapere cos'è l'HBV il 70% dei Tossi/ep, il 74% dei Tossi e il 69% del Controllo/ep, contro il 63% del Controllo che afferma di non saperlo. All'interno di quella che abbiamo definito conoscenza (es.: «malattia del fegato») abbiamo raggruppato definizioni più precise quali «malattia contagiosa da virus che colpisce il fegato, che trascurata porta alla cirrosi epatica», «una forma di epatopatia causata da virus che presenta un tasso di transaminasi elevato». Dalla Fig. 2 risulta che tali definizioni vengono date solo dai tossicodipendenti (Tossi/ep: 16%, Tossi: 18%). Rispetto alla conoscenza dei sintomi le differenze tra i tossicodipendenti (Tossi/ep: 58%, Tossi: 47%), il

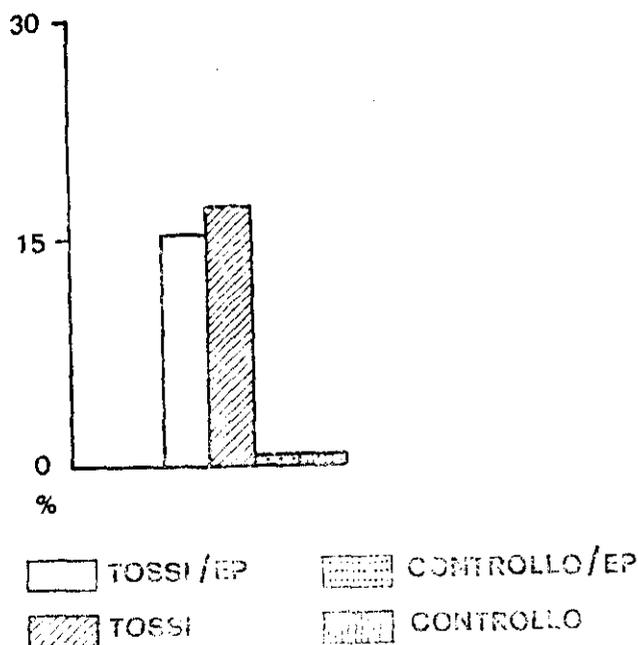


FIG. 2. - Definizione precisa

Controllo/ep (28%) e il Controllo (< 1%) è significativa. Esempi di definizioni adeguate: « stato itterico, urine scure, feci chiare, stanchezza ».

Nella Fig. 3 abbiamo considerato la conoscenza delle vie di contagio definendo quattro gruppi di risposte: la 'non conoscenza assoluta', 'la conoscenza errata'

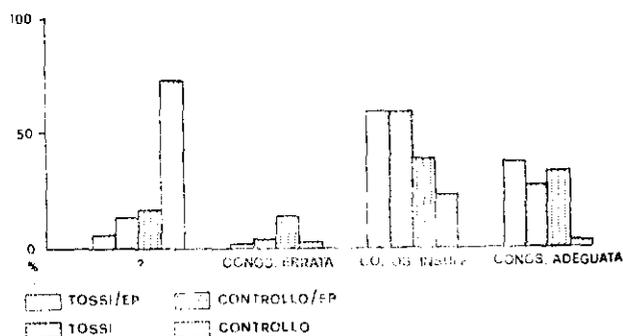


FIG. 3. - Conoscenza delle vie di contagio

(quella che comprende solo la via oro-fecale di trasmissione e che non dà possibilità di prevenzione rispetto all'HBV), la 'conoscenza insufficiente' (conoscenza delle vie di trasmissione corretta, ma non completa), la 'conoscenza adeguata' (via parenterale e parenterale inapparente). Il Controllo non sa nulla nel 73%. La percentuale più alta di risposte di tipo errato viene data dal Controllo/ep (13%). Le risposte di 'conoscenza insufficiente' si distribuiscono nel seguente modo: Tossi/ep: 58%, Tossi: 58%, Controllo/ep: 39%, Controllo: 23%. La conoscenza adeguata è presente, in misura significativa, solo nei tossicodipendenti (Tossi/ep: 37%, Tossi: 26%) e nel Controllo/ep (33%).

Nella Fig. 4 possiamo osservare, riguardo all'ipotesi circa le fonti di informazione, che per la popolazione tossicodipendente la quasi totalità della informazione è data dall'esperienza personale e dalle informazioni

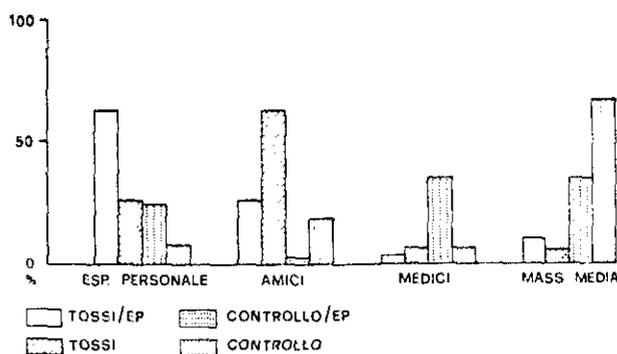


FIG. 4. - Fonte di informazione

ricevute dal gruppo dei tossicodipendenti: 'esperienza personale': Tossi/ep: 63%, Tossi: 26%; 'amici': Tossi/ep: 26%, Tossi: 63%. Per il Controllo/ep l'informazione risulta data per il 36% dai medici e per il 36% dai mass-media. Si può notare come per il Controllo la maggior fonte di informazione risulti essere quella dei mass-media. Una conferma circa la provenienza delle informazioni viene, poi, dall'alta percentuale (70%) dei tossicodipendenti che affermano di aver capito di aver contratto l'epatite virale prima di rivolgersi al medico contro il 72% del Controllo/ep che afferma di non essere stato in grado di farlo.

Continuiamo ad analizzare i risvolti pratici della conoscenza dell'HBV osservando ora le risposte a domande specifiche rivolte soltanto ai tossicodipendenti. Alla domanda: 'Lo sa che per i tossicodipendenti i rischi di esserne affetto sono maggiori che per il resto della popolazione?' la quasi totalità afferma di essere a conoscenza del rischio (Tossi/ep: 98%, Tossi: 97%).

Nella Fig. 5 vediamo che viene indicata, come causa di questo rischio, la 'vita da tossicodipendente' nel 58% (Tossi/ep) e nel 74% (Tossi). Es.: « La voglia di abusare di stupefacenti spesso trascurava la necessità di pensare anche a delle puerili norme igieniche. Uno che si fa di continuo non pensa di certo di usare una siringa per ogni buco. Ho visto tanti che la raccolgono per terra ». Una rilevante percentuale (Tossi/ep: 33%,

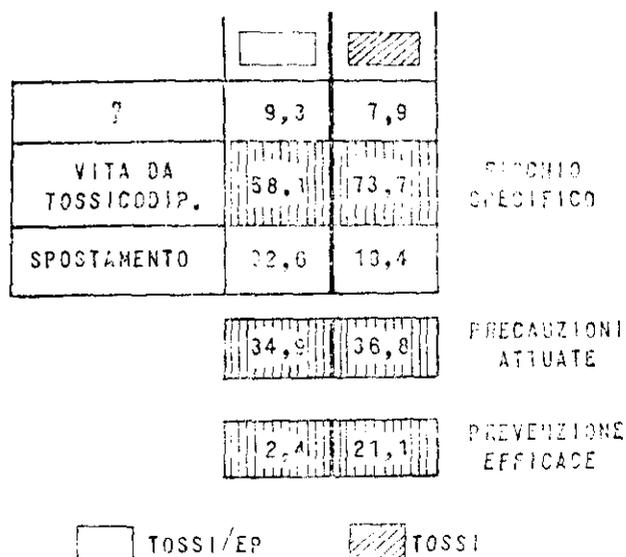


FIG. 5

Tossi: 18 %) si difende dall'ansia suscitata dal riconoscimento della propria responsabilità rispetto alla malattia spostandola all'esterno, sugli altri [3-4]. Es.: « È colpa della mancanza di igiene del resto della popolazione ». Tra coloro che affermano che il rischio dipende dalla condizione di tossicodipendenza solo il 35 % (Tossi/ep) e il 37 % (Tossi) affermano di attuare precauzioni, ma di queste percentuali solo il 2 % (Tossi/ep) e il 21 % (Tossi) attuano una prevenzione efficace (bucare con siringhe sempre nuove e usare acqua distillata come diluente).

Coloro che hanno coscienza di non attuare precauzione sufficienti lo motivano con 'difficoltà soggettive' (Tossi/ep: 35 %, Tossi: 35 %), cioè, per urgenza del desiderio di bucare o per carenza, e 'difficoltà oggettive' (Tossi/ep: 35 %, Tossi: 13 %) quali le farmacie chiuse o l'essere detenuti.

#### DISCUSSIONE.

Sulla base dei dati raccolti è possibile trarre alcune valutazioni conclusive. L'incidenza dell'HBV costituisce un problema molto rilevante nella popolazione dei tossicodipendenti. La popolazione generale ha scarse, spesso inesatte, informazioni sull'HBV provenienti, in massima parte, dai mass-media. Solo chi ha avuto l'esperienza diretta della malattia dimostra di possedere conoscenze sufficienti al riguardo. Pensiamo che una maggiore informazione sull'HBV (e, quindi, una corretta conoscenza del problema) sarebbe accolta con interesse

dalla popolazione non tossicodipendente soprattutto se accompagnata da indicazioni operative. I tossicodipendenti hanno dimostrato di possedere una conoscenza circa l'HBV qualitativamente e quantitativamente superiore al resto della popolazione e di non aver bisogno, quindi, di ulteriori informazioni. Il gruppo dei tossicodipendenti è la diretta fonte di informazione per tutti i membri, anche se i soggetti che hanno avuto la malattia privilegiano, in seguito, come fonte di informazione, la propria esperienza. Per il tossicodipendente che rischia di ammalarsi, la coscienza delle conseguenze dei suoi atti passa in secondo piano rispetto alla dipendenza dalla sostanza e la condizione di tossicodipendenza può, così, inattivare la conoscenza corretta del problema. Durante lo svolgimento della ricerca abbiamo notato che l'esperienza della malattia contribuisce ad aumentare l'ansia e il disagio preesistenti nei tossicodipendenti. Dati preliminari, che ci ripromettiamo di sviluppare in un proseguo della ricerca, permettono di ipotizzare in questi soggetti un'esperienza della malattia legata ad un'immagine corporea modificata dalla situazione di dipendenza della sostanza. Concludendo ci sembra di poter affermare, sulla base dell'interesse riscontrato, che affrontare insieme al tossicodipendente il problema dell'HBV nei termini di un programma terapeutico complessivo possa costituire un aggancio importante: la salute, la responsabilità di essere portatore di infettività verso il partner e/o i figli può costituire, secondo noi, una ripresa di contatto con la realtà, nonché un recupero riparativo del proprio corpo e della propria individualità.

#### BIBLIOGRAFIA

1. BALBO, M. A., GALLO, L., MOIRAGHI RUGGENINI, A., RAIMONDO, G. & VEGLIO, V. *L'epatite virale nei tossicodipendenti della città di Torino.* (In preparazione).
2. NIE, N. H., HUDLAI HULL, C., JENKINS, J. C., STEINBRENNER, K. & BENT, D. M. 1975. *SPSS.* McGraw-Hill Book Company, New York.
3. FREUD, A. 1967. *L'io e i meccanismi di difesa.* Martinelli, Firenze.
4. ROSENFELD, H. A. 1973. *Stati psicotici.* Armando, Roma.
5. BLALOCK, H. M. J. 1960. *Social Statistics.* McGraw-Hill. Book Company, New York.
6. SCHILDER, P. 1978. *Immagine di sé e schema corporeo.* Franco Angeli (Ed.), Milano.

## Conclusioni

F. POCCHIARI

*Direttore dell'Istituto Superiore di Sanità, Roma*

A conclusione di questo interessante Convegno, vorrei ringraziare tutti i relatori, in particolare il Prof. Rexed per le sue parole. Desidero inoltre dare la mia assicurazione che l'Istituto Superiore di Sanità, quale organo tecnico scientifico del Servizio Sanitario Nazionale, che sta potenziando le sue strutture interne, si offre come « punto di riferimento », in collaborazione con l'Istituto di Medicina Legale dell'Università di Padova, con il C.N.R., con le Università, con le Società Scientifiche, per una discussione più allargata sull'argomento.

Anche in questo campo, come in altri settori, l'Istituto Superiore di Sanità ha saputo porre tempestivamente le basi tecnico-scientifiche per un intervento proficuo delle strutture pubbliche, abbastanza in anticipo rispetto alla esplosione del fenomeno (si consideri che fin dai primi anni '60 abbiamo studiato i residui della fabbricazione industriale della cocaina dalla pasta di coca, ed abbiamo coltivato, a scopi sperimentali, in questa sede il papavero da oppio, la cannabis indica e da fibra, estendendo, in qualche caso, gli studi oltre gli aspetti chimico-analitici fino agli effetti provocati sugli animali).

Tuttavia, come diceva Rexed, vi sono altre questioni fondamentali, quali ad esempio la prevenzione ed i trattamenti, che non sono state prese ancora in considerazione in questa sede, ma che devono essere dibattute. Le difficoltà che si presentano sono molte, anche perché dalle Autorità regionali non ci vengono forniti dati sugli effetti dell'impiego dei vari farmaci agonisti, antagonisti, non-stupefacenti ed altri tipi di interventi non-farmacologici.

Sarà utile tener conto, nel prossimo futuro, delle ricadute che nel fenomeno abuso di droga potranno derivare da un maggior coinvolgimento, da un lato delle strutture deputate alla repressione del traffico illecito, dall'altro dall'impegno che dovrà comunque essere profuso nelle attività di prevenzione.

L'Istituto Superiore di Sanità è a completa disposizione per un confronto aperto anche su questo punto, perché ritengo che sia necessario raggiungere prima un accordo tecnico e poi passare alla discussione in sede politica.

Desidero ringraziare di nuovo tutti i relatori, sia stranieri che italiani, i moderatori, i partecipanti, per l'elevata qualità dei contributi forniti.

### *Ringraziamenti.*

Alla collazione, preparazione e stesura degli Atti ha validamente collaborato la sig.ra Rossella Pala del Laboratorio di Biochimica Clinica dell'I.S.S.

## Ricerche e metodologie

# Sesquiterpeni lattonici di interesse farmacologico: proprietà strutturali e funzionali - Parte III: Guaianolidi

P. BARBETTI (a), G. FARDELLA (a) e C. G. CASINOVI (b)

(a) Istituto di Chimica delle Sostanze Naturali, Farmacia, Università degli Studi, Perugia

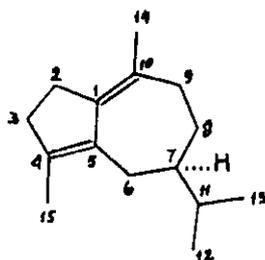
(b) Istituto Superiore di Sanità, Roma

**Riassunto.** - Si passano in rassegna le strutture e le caratteristiche chimico-fisiche dei lattoni guaianolidici dotati di azione citotossica ed antitumorale particolarmente spiccata.

**Summary** (Sesquiterpene lactones having pharmacological interest: structures and chemical functions). - Sesquiterpene lactones of the guaianolide series are reviewed from the chemical and pharmacological point of view.

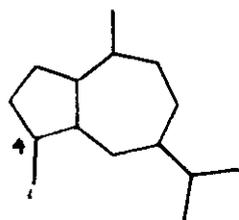
Fra i sesquiterpeni lattonici naturali e di sintesi dotati di attività biologica, in particolare di attività citotossica e anticancerogena, abbiamo già trattato le famiglie degli Eudesmanolidi [1] e dei Germacranolidi [2].

Il presente lavoro descrive una rassegna dei Guaianolidi lattonici significativamente bioattivi, sia dal punto di vista delle loro caratteristiche chimico fisiche strutturali, sia da quello dei dati sperimentali ottenuti da tests di citotossicità e anticancerogenicità *in vitro* o/e *in vivo*, eseguiti secondo le classiche metodiche sperimentali [3-8]. I dati quantitativi delle misure di bioattività *in vitro* su linee di cellule, ove disponibili, sono espressi come ED<sub>50</sub> (dose efficace sul 50 % della popolazione cellulare) e, in considerazione del fatto che solo i valori di ED<sub>50</sub> < 4 µg/ml vengono generalmente ritenuti qualificati per ulteriori investigazioni *in vivo* [8], sono stati esclusi dalla presente rassegna quei composti la cui citotossicità è risultata sensibilmente inferiore a tale limite.

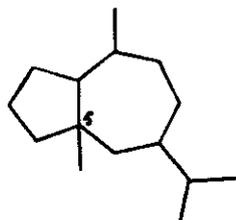


I. - GUAIANO

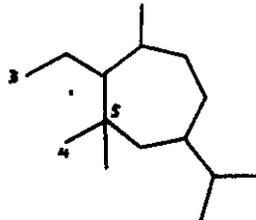
Scheletri carboniosi più ricorrenti nella classe dei guaianolidi biologicamente attivi:



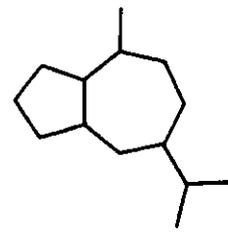
II. - GUAIANOLIDI



III. - AMBROSANOLIDI  
(PSEUDOGUAIANOLIDI)

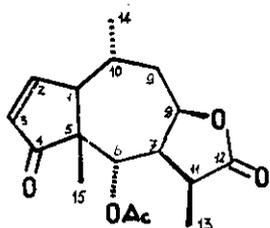


IV  
SECO-AMBROSANOLIDI



V  
NOR-GUAIANOLIDI

## VI. - ARNICOLIDE A [8, 9]



$C_{17}H_{22}O_5$ , PM = 306, p. f. = 117-19 °C (etere etilico),  
 $[\alpha]_D^{25} = -112,8^\circ$  (C = 0,13).

Isolato da *Arnica montana* L.

O.R.D. =  $[\varphi]_{400} = -1263^\circ$ ,  $[\varphi]_{352} = -3693^\circ$ ,  $[\varphi]_{301} = -2332^\circ$ ,  
 $[\varphi]_{255} = -2235^\circ$ .

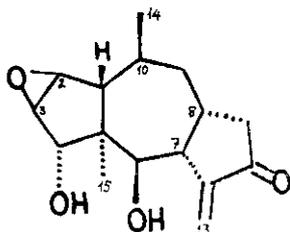
I. R. = ( $\nu_{\text{Max}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) 1765  $\gamma$ -lattone, 1730 acetato, 1712  
 ciclopentenone, 1585, 1242.

M. S. = (m/e) 306 ( $M^+$ ), 264, 263, 246, 231, 191, 124,  
 123, 122, 96, 95.

$^1\text{H-NMR}$  = ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) 3,03 (1H) C-1,  
 7,65 (1H) C-2, 6,04 (1H) C-3, 5,42 (1H) C-6, 2,83  
 (1H) C-7, 4,74 (1H) C-8, 2,45 (1H) C-9, 1,64 (1H)  
 C-9, 2,15 (1H) C-10, 3,05 (1H) C-11, 1,47 (3H)  
 C-14, 0,99 (3H) C-15, J (x-y) = (Hz), 1,5 (1-2),  
 3,0 (1-3), 9,5 (1-10), 6,0 (2-3),  $\pm 0$  (2-6),  $\pm 0$  (6-7),  
 6 (7-8), 10 (7-11), 6,0 (8-9), 14,5 (9-9'),  $< 3$  (9-10),  
 11 (9'-10), 6,0 (10-14), 7,0 (11-13).

Bioattività: attivo *in vitro* contro colture di cellule del car-  
 cinoma della cervice uterina HeLa;  $\text{ED}_{50} = 1,00 \mu\text{g/ml}$   
 ( $3,3 \times 10^{-6} \text{ M}$ ).

## VII. - AUTUMNOLIDE [10-12]



$C_{15}H_{20}O_5$ , PM = 280, p. f. = 199-201 °C,  $[\alpha]_D^{25} = 20,6^\circ$   
 (C = 0,84,  $\text{CHCl}_3$ ).

Isolato da *Helenium autumnale* L. - Alabama, USA.

I. R. = ( $\nu_{\text{Max}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ , Nujol) 3520, 3400 (OH), 1760 e  
 1660 (lattone  $\alpha,\beta$ -insaturo).

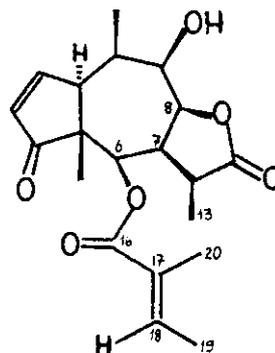
M. S. = (m/e) 280 ( $M^+$ ).

$^1\text{H-NMR}$  = ( $\delta$  ppm, DMSO) 6,02 (1H, d, J = 2 Hz)  
 e 5,61 (1H, d, J = 1,5 Hz) C-13, 4,8 (1H, d, J =

4 Hz) e 5,15 (1H, d, J = 4 Hz) ossidrili scambiabili  
 con  $\text{D}_2\text{O}$ , 4,75 (1H, m) C-8, 3,3-3,8 (5 H, m), 1,08  
 (3H, d, J = 5 Hz) C-14, 0,74 (3H, s) C-15.

Bioattività: attiva contro linee di cellule del carcinoma  
 umano della nasofaringe KB;  $\text{ED}_{50} = 3,1 \mu\text{g/ml}$ .

## VIII. - BAILEYOLINA [13]



$C_{20}H_{26}O_6$ , PM = 362, p. f. = 180-182 °C,  $[\alpha]_D^{28} =$   
 $-74,6^\circ$ .

Isolata da *Baileya multiradiata*. Messico.

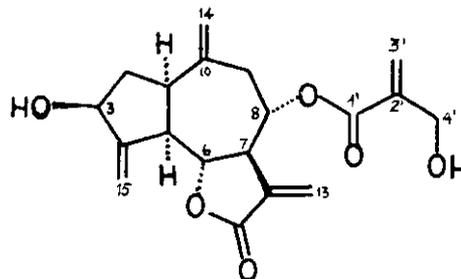
U. V. = ( $\lambda_{\text{Max}}$ , nm) 222 ( $\epsilon = 17800$ ).

I. R. = ( $\nu_{\text{Max}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3500 (OH), 2950, 1750 ( $\gamma$ -latto-  
 ne), 1710 (estere in C-6 e ciclopentenone), 1550, 1222,  
 1070, 1050.

$^1\text{H-NMR}$  = ( $\delta$  ppm) 1,05 (3H, s) C-15, 1,38 (3H, d, J  
 = 6 Hz) C-14, 1,45 (3H, d, J = 6 Hz) C-13, 1,7-  
 1,9 (6H, m) C-19 e C-20, 2,65 (1H, s) OH, 3,0 (1H, m)  
 C-9, 3,4 (1H, d) C-6, 4,9 (1H, d) C-8, 5,45 (1H, s),  
 6,08 (1H, dd, J = 6,2 Hz) C-3, 6,2-6,3 (1H) C-18,  
 7,72 (1H, dd, J = 6,2 Hz) C-2.

Bioattività: attività citotossica, antineoplastica e anti-  
 biotica.

## IX. - CINAROPICRINA [8, 14-18]



$C_{19}H_{22}O_6$ , PM = 346, p. f. = non cristallino,  $[\alpha]_D^{20} =$   
 $-108,6^\circ$ .

Isolata da *Amberboa muricata*, *Cynara scolymus*, *Centaurea americana*, *Centaurea canariensis*, *Cynara cardunculus*.

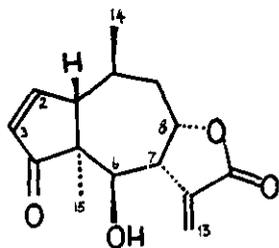
I. R. = ( $\nu_{\text{Max.}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3600-3500 (OH), 1760 ( $\alpha$ -metilene,  $\gamma$ -lattone), 1710 (metacrilato).

M. S. = (m/e) 346 ( $\text{M}^+$ ), 362, 244, 226, 85.

$^1\text{H-NMR}$  = ( $\delta$ , ppm, DMSO, 100 MHz) 6,18 (1H, m) C-3', 5,91 (1H, m) C-3'', 4,18 (2H, bd,  $J = 5,5$  Hz) C-4', 6,02 (1H, d,  $J = 3,4$  Hz) C-13, 5,52 (1H, d,  $J = 3,0$  Hz) C-13, 5,09 (1H, bs,  $J = 2$  Hz) C-14, 4,84 (1H, bd,  $J = 2$  Hz) C-14, 5,23 (2H, bs) C-15, 5,15 (1H, m) C-8, 3,21 (1H, m) C-7, 4,38 (1H, bt) C-6, 4,38 (1H, m) C-3, 2,67 (1H, dd,  $J = 5,5, 14$  Hz) C-9, 2,25 (1H, dd,  $J = 3,5, 14$ ) C-9'.

Bioattività: attiva *in vitro* contro linee di cellule del carcinoma della cervice uterina HeLa;  $\text{ED}_{50} = 2,00$   $\mu\text{g/ml}$  ( $5,7 \times 10^{-5}$  M) e contro carcinoma umano della nasofaringe KB;  $\text{ED}_{50} = 3,50-5,50$   $\mu\text{g/ml}$  ( $1,1-1,3 \times 10^{-5}$  M).

X. - FLENALINA [10, 19-21]



$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_4$ , PM = 262, p. f. = 170-174 °C,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -101^{\circ}$  (C = 0,2 etanolo).

Isolata da *Helenium autumnale* - Oregon, USA.

U. V. = ( $\lambda_{\text{Max.}}$ , nm, EtOH) 219,5 ( $\epsilon = 12090$ ), 223 ( $\epsilon = 11900$ ).

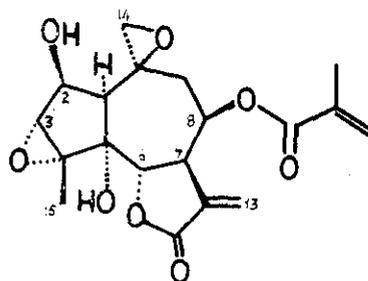
I. R. = ( $\nu_{\text{Max.}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ , KBr) 1765 (esometilene,  $\gamma$  lattone) 1710 (ciclopentenone), 1465 (esometilene), 1301, 1275, 1060, 825.

M. S. = (m/e) 262 ( $\text{M}^+$ ), 244, 234, 151, 137, 124, 109, 96.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ) 0,97 (3H, s) C-15, 1,25 (3H, d,  $J = 6$  Hz) C-14, 1,62-2,53 (3H, m), 3,04 (1H, br s), 3,27 (1H, br s), 3,58 (1H, m), 4,46 (1H, br s), 4,98 (1H, dt,  $J = 7,2$  Hz) C-8, 5,81 (1H, d,  $J = 3$  Hz) e 6,03 (1H, ddd,  $J = 6, 5, 3$  Hz) C-13, 6,37 (1H, d,  $J = 3$  Hz) C-3, 7,69 (1H, ddd,  $J = 6, 5, 2$  Hz) C-2.

Bioattività: attiva *in vivo* contro la leucemia P-388, T/C = 200; attiva *in vitro* contro linee di cellule del carcinoma umano KB;  $\text{ED}_{50} = 0,19$   $\mu\text{g/ml}$ , contro cellule da tumori di Walker 256 e contro melanoma B<sub>16</sub> *in vivo*.

XI. - EPIEUPATOROSSINA [10, 22]



$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_8$ , PM = 392, p. f. 230-232 °C,  $[\alpha]_{\text{D}}^{26} = -109^{\circ}$  (MeOH).

Isolata da *Eupatorium rotundifolium* L. - Florida, USA.

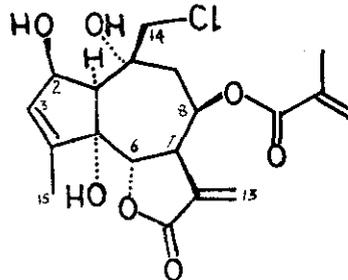
U. V. = ( $\lambda_{\text{Max.}}$ , nm, MeOH) 213 ( $\epsilon = 15000$ ).

I. R. = ( $\nu_{\text{Max.}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ , KBr) 3472, 1776, 1700, 1692, 1647.

$^1\text{H-NMR}$  = ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ) 1,48 (1H, d) C-1, 4,5 (1H, m) C-2, 3,38 (1H, br s) C-3, 5,08 (1H, dd) C-6, 4,1 (1H, m) C-7, 5,65 (1H, m) C-8, 3,3 (2H, m) C-9, 6,24 (2H, d) C-13, 2,7 (2H, m) C-14, 1,86 (3H, s) C-15, 1,9 (6H, m) metili angelici.

Bioattività: attiva *in vitro* contro linee di cellule del carcinoma umano KB;  $\text{ED}_{50} = 2,6$   $\mu\text{g/ml}$ .

XII. - EUPACLORINA [10, 22]



$\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{ClO}_7$ , PM = 412, p. f. = 219-221 °C,  $[\alpha]_{\text{D}}^{27} = -110^{\circ}$  (EtOH).

Isolata da *Eupatorium rotundifolium* L. - Florida, USA.

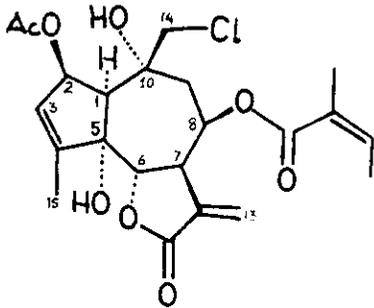
U. V. = ( $\lambda_{\text{Max.}}$ , nm, MeOH) 212 ( $\epsilon = 16000$ ).

I. R. = ( $\nu_{\text{Max.}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ , KBr) 3533, 3356, 1760, 1706, 1645, 1244.

$^1\text{H-NMR}$  = ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ) 2,70 (1H, m) C-1, 4,5 (1H, m) C-2, 5,7 (1H, m) C-3, 4,28 (1H, d) C-6, 4,5 (1H, m) C-7, 5,7 (1H, m) C-8, 2,4 (2H, m) C-9, 6,13 (2H, d) C-13, 3,86 (2H, d) C-14, 1,09 (3H, s) C-15, 1,9 (6H, m) metili angelici.

Bioattività: attiva *in vitro* contro colture di cellule del carcinoma umano KB;  $\text{ED}_{50} = 0,21$   $\mu\text{g/ml}$ .

## XIII. - EUPACLORINA ACETATO [10, 22, 23]



$C_{22}H_{27}ClO_8$ , PM = 454, p. f. = 161-164 °C,  $[\alpha]_D^{26} = -192^\circ$  (MeOH).

Isolata da *Eupatorium rotundifolium* L. - Florida, USA.

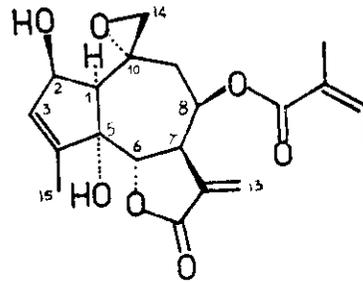
U. V. = ( $\lambda_{Max.}$ , nm, MeOH) 212 ( $\epsilon = 15800$ ).

I. R. = ( $\nu_{Max.}$ ,  $cm^{-1}$ , KBr) 3401, 1770, 1739, 1721, 1664, 1228.

$^1H$ -NMR = ( $\delta$ , ppm,  $CDCl_3$ ) 2,71 (1H, d) C-1, 5,8 (1H, m) C-2, 5,8 (1H, m) C-3, 4,80 (1H, d) C-6, 4,60 (1H, m) C-7, 5,6 (1H, m) C-8, 2,4 (2H, m) C-9, 6,23 (2H, d) C-13, 3,53 (2H, s) C-14, 2,0 (3H, s) acetato, 1,8 (6H, m) metili angelici.

Bioattività: attiva *in vitro* contro linee di cellule KB;  $ED_{50} = 0,18 \mu g/ml$  e *in vivo* contro il carcinoma intramuscolare del topo: Walker 256 con T/C = 38 (300 mg/kg).

## XV. - EUPAROTINA [10, 22]



$C_{20}H_{24}O_7$ , PM = 376, p. f. = 199-200 °C,  $[\alpha]_D^{32} = -124^\circ$  (C = 1,25 EtOH).

Isolata da *Eupatorium rotundifolium* L. - Florida, USA.

U. V. = ( $\lambda_{Max.}$ , nm, EtOH) 213 ( $\epsilon = 17800$ ).

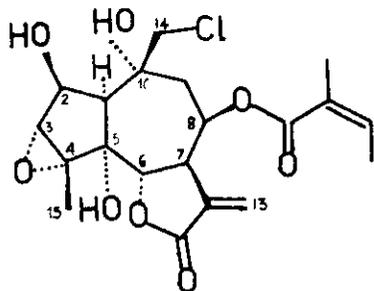
I. R. = ( $\nu_{Max.}$ ,  $cm^{-1}$ , KBr) 1760 e 1653 ( $\alpha$ -metilene,  $\gamma$ -lattone), 3448 (OH), 1706 (estere  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturo).

M. S. = (m/e) 376 ( $M^+$ ).

$^1H$ -NMR = ( $\delta$ , ppm,  $CDCl_3$ ) 2,65 (1H) C-1, 4,8 (1H, m) C-2, 5,8 (1H, m) C-3, 4,80 (1H, d) C-6, 4,2 (1H) C-7, 6,7 (1H, m) C-8, 2,75 (2H) C-9, 6,38 (2H, dd) C-13, 2,7 (2H, s) C-14, 2,0 (3H) C-15, 1,8 e 1,9 (3H, m) metili angelici.

Bioattività: citotossica verso linee di cellule del carcinoma umano della nasofaringe KB;  $ED_{50} = 0,21 \mu g/ml$ .

## XIV. - EUPACLOROSSINA [10, 22]



$C_{20}H_{25}ClO_8$ , PM = 428.

Isolata da *Eupatorium rotundifolium* L. - Florida, USA.

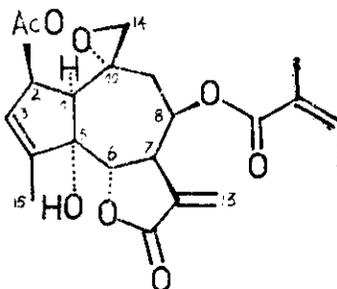
I. R. = ( $\nu_{Max.}$ ,  $cm^{-1}$ , KBr) 3448, 1770, 1724.

M. S. = (m/e) 428 ( $M^+$ ), 430.

$^1H$ -NMR = ( $\delta$ , ppm,  $CDCl_3$ ) 2,5 (1H, m) C-1, 4,4 (1H, m) C-2, 3,37 (1H, br s) C-3, 5,02 (1H, d) C-6, 4,8 (1H, d) C-7, 5,8 (1H, m) C-8, 2,6 (2H, m) C-9, 6,20 (2H, d) C-13, 3,81 (2H, d) C-14, 1,60 (3H, s) C-15, 1,8 (6H, m) metili angelici.

Bioattività: attività *in vitro* contro linee di cellule del carcinoma umano KB;  $ED_{50} = 3,6 \mu g/ml$ .

## XVI. - EUPAROTINA, 2-ACETATO [10, 22, 24]



$C_{22}H_{26}O_8$ , PM = 418, p. f. = 156-157 °C,  $[\alpha]_D^{30} = -191^\circ$  (EtOH)

Isolata da *Eupatorium rotundifolium* L. - Florida, USA.

U. V. = ( $\lambda_{Max.}$ , nm, EtOH) 210 ( $\epsilon = 18400$ ).

I. R. = ( $\nu_{Max.}$ ,  $cm^{-1}$ , KBr) 3436 (OH) 1763 ( $\alpha$ -metilene,  $\gamma$ -lattone), 1742 (acetile), 1709 (angelile), 1658, 1655 (insaturazioni olefiniche).

M. S. = (m/e) 418 ( $M^+$ ).

$^1\text{H-NMR}$  = ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ) 2,02 (3H, s) acetile, 1,80 (3H, dd,  $J = 1,5$  e 7 Hz) e 1,75 (3H, d,  $J = 1,5$  Hz) metili angelici, 6,05 (1H, dd,  $J = 7$  e 15 Hz) H angelil-vinilico, 2,1 (1H), C-1, 5,7 (1H, m) C-2, 5,7 (1H, m) C-3, 4,8 (1H, d) C-6, 4,2 (1H, m) C-7, 2,41 (2H, dd) C-9, 6,37, 2H, d) C-13, 2,68 (2H, s) C-14, 2,0 (3H) C-15.

Bioattività: attiva *in vitro* contro colture di cellule del carcinoma umano KB,  $\text{ED}_{50} = 0,21 \mu\text{g/ml}$  ed *in vivo* contro le cellule del carcinosarcoma intramuscolare del topo: Walker 256.

Isolata da *Eupatorium rotundifolium* L. - Florida, USA.

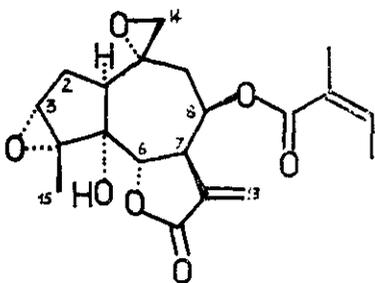
U.V. = ( $\lambda_{\text{Max}}$ , nm, MeOH) 209 ( $\epsilon \approx 16100$ ).

I.R. = ( $\nu_{\text{Max}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ , KBr) 3484, 1763, 1706, 1661, 1631.

$^1\text{H-NMR}$  = ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ) 2,68 (1H, d) C-1, 4,40 (1H, br d) C-2, 3,43 (1H, br s) C-3, 4,92 (1H, d) C-6, 3,8 (1H, m) C-7, 6,5 (1H, m) C-8, 2,94 (2H, d) C-9, 6,30 (2H, d) C-13, 5,06 (2H, br s) C-14, 1,65 (3H, s) C-15, 1,8 (6H, m) metili angelici.

Bioattività: attiva *in vitro* contro colture di cellule del carcinoma umano della nasofaringe KB;  $\text{ED}_{50} = 0,39 \mu\text{g/ml}$ .

XVII. - EUPATOROSSINA [10, 22]



$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_8$ , PM = 392, p. f. = 197-200 °C,  $[\alpha]_{\text{D}} = +98^\circ$  (MeOH).

Isolata da *Eupatorium rotundifolium* L. - Florida, USA.

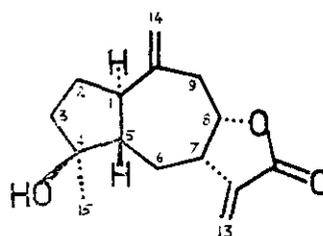
U. V. = ( $\lambda_{\text{Max}}$ , nm, MeOH) 213 ( $\epsilon = 12900$ ).

I. R. = ( $\nu_{\text{Max}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ , KBr) 3460, 1770, 1715, 1661.

$^1\text{H-NMR}$  = ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ) 1,6 (1H, m) C-1, 4,24 (1H, d) C-2, 3,36 (1H br s) C-3, 5,04 (1H, d) C-6, 4,3 (1H, m) C-7, 5,55 (1H, m) C-8, 2,3 (2H, m) C-9, 6,25 (2H, d) C-13, 2,68 (2H, q<sub>AB</sub>) C-14, 1,58 (2H, s) C-15, 1,8 (6H, m) metili angelici.

Bioattività: attiva *in vitro* contro linee di cellule del carcinoma umano della nasofaringe KB;  $\text{ED}_{50} = 2,8 \mu\text{g/ml}$ .

XIX. - FLORILENALINA [10, 25]



$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$ , PM = 264.

Isolata da *Helenium autumnale* - Florida, USA.

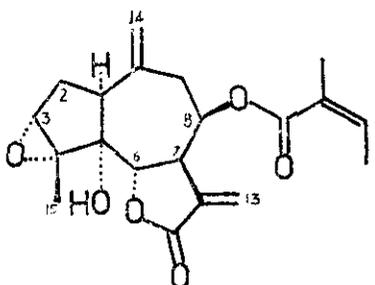
I. R. = ( $\nu_{\text{Max}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\text{CHCl}_3$ ) 3420 (OH), 1765 ( $\alpha$ -metilen,  $\gamma$ -lattone), 1660, 1645, 1610 (insaturazioni olefiniche).

M. S. = (m/e) 264 ( $\text{M}^+$ ).

$^1\text{H-NMR}$  = ( $\delta$ , ppm) 4,76 (1H, m) C-8, 4,37 (1H, m) C-2.

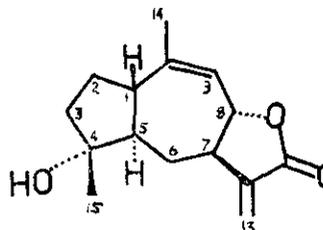
Bioattività: attiva *in vitro* verso colture di cellule da carcinoma epidermoide umano della faringe H. Ep-2;  $\text{ED}_{50} \approx 1 \mu\text{g/ml}$ .

XVIII. - EUPATUNDINA [10, 22]



$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_7$ , PM = 376, p. f. = 188-189 °C,  $[\alpha]_{\text{D}} = -80^\circ$  (EtOH).

XX. - GAILIARDINA [10, 26-28]



$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_5$ , PM = 306, p. f. = 198-199 °C,  $[\alpha]_{\text{D}} = -15^\circ$  ( $\text{CHCl}_3$ ).

Isolata da *Gaillardia pulchella* Fong.

U. V. = ( $\lambda_{\text{Max.}}$ , nm, EtOH) 209 ( $\epsilon = 15500$ ).

I. R. = ( $\nu_{\text{Max.}}$ ,  $\mu$ ) 5,67, 6,00 ( $\alpha$ -metilene,  $\gamma$ -lattone), 5,78, 8,15 (acetato), 2,78 (OH).

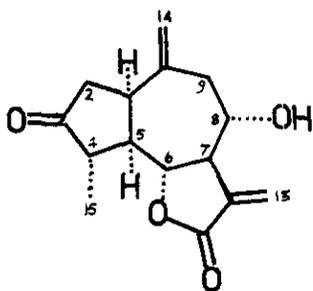
M. S. = (m/e) 306 ( $M^+$ ), 288, 246, 228, 213, 188, 105, 91.

$^1\text{H-NMR}$  = ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ , 60 MHz) 5,30 (1H, q) C-2, 1,26 (3H, s) C-15, 4,50 (1H, m) C-8, 5,93 (1H, br s) C-9, 1,82 (3H, br s) C-14, 2,08 (3H, s) Ac, 6,21 (1H, d,  $J = 3$  Hz) C-13, 5,53 (1H, d,  $J = 3$  Hz) C-13'.

La struttura chimica e stereochimica è stata confermata per via cristallografica ai raggi X.

Bioattività: attiva *in vitro* contro linee di cellule del carcinoma umano della nasofaringe KB;  $\text{ED}_{50} = 0,80$   $\mu\text{g/ml}$ .

XXI. - GROSHEIMINA [8, 29, 30]



$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_4$ , PM = 262, p. f. =  $\left\{ \begin{array}{l} 197^\circ \text{C (EtAc)} \\ 205^\circ \text{C (MeOH)} \end{array} \right.$

$[\alpha]_D^{20} = \left\{ \begin{array}{l} +123^\circ (\text{CHCl}_3, C = 1,0) \\ +137,7^\circ (\text{MeOH}, C = 0,22) \end{array} \right.$

Isolata da *Grosshemia macrocephala*, *Amberboa lippi*, *Char-  
toleipsis intermedia*, *Cynara scolymus*.

O.R.D. =  $[\varphi]_{400} = +964^\circ$ ,  $[\varphi]_{320} = +4985^\circ$ ,  $[\varphi]_{317} = +4876^\circ$ ,  $[\varphi]_{309} = +5495^\circ$ ,  $[\varphi]_{295} = \pm 0^\circ$ ,  $[\varphi]_{275} = -3740^\circ$ ,  $[\varphi]_{265} = -3540^\circ$ .

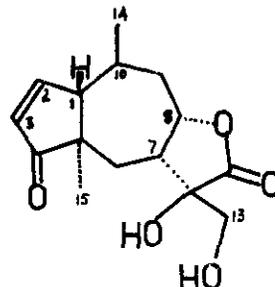
C. D. =  $[\theta]_{330} = \pm 0^\circ$ ,  $[\theta]_{296} = +7458^\circ$ ,  $[\theta]_{244} = \pm 0^\circ$ ,  $[\theta]_{221} = -20360^\circ$ .

I. R. = ( $\nu_{\text{Max.}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3600-3500 (OH), 1765, 1405, 1145 ( $\alpha$ -metilene,  $\gamma$ -lattone), 1735 (ciclopentanone) 1645 (esometilene non coniugato).

$^1\text{H-NMR}$  = ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ) 3,14 (1H) C-1, 2,52 (2H) C-2, 2,30 (1H) C-4, 2,30 (1H) C-5, 3,99 (1H,  $J_{5,6} = 9,5$ ,  $J_{6,7} = 8,9$  Hz) C-6, 3,07 (1H) C-7, 3,91 (1H,  $J_{8,9} = 5,8$ ,  $J_{8,9'} = 8,7$ ,  $J_{8,7} = 9,9$  Hz) C-8, 2,87 (1H,  $J_{8,9} = 5,6$ ,  $J_{9,9'} = 13,0$  Hz) C-9, 2,30 (1H,  $J_{9',8} = 8,8$ ,  $J_{9',9} = 13,0$ ,  $J_{9',14} = 0,9$  Hz) C-9', 6,36 (1H,  $J_{13,7} = 3,35$ ,  $J_{13,13'} = 1,15$  Hz) C-13, 6,31 (1H,  $J_{13',7} = 3,0$ ,  $J_{13',13} = 1,15$  Hz) C-13', 5,08 (1H) C-14, 4,84 (1H,  $J_{14',14} = 0,5$ ,  $J_{14',1} = 0,8$  Hz) C-14', 1,26 (3H,  $J_{15,4} = 6,9$  Hz) C-15.

Bioattività: attiva *in vitro* contro linee di cellule di carcinoma maligno della cervice uterina HeLa;  $\text{Ed}_{50} = 0,5-0,6$   $\mu\text{g/ml}$ . Su culture linfocitiche è stato osservato che la Grosheimina inibisce la divisione cellulare a livello dello stadio della metafase.

XXII. - IMENOFLOREINA [10, 31]



$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3$ , PM 280, p. f. =  $197-199^\circ \text{C}$ ,  $[\alpha]_D = -54,3^\circ$ .

Isolata da *Hymenoxys grandiflora* - Colorado, USA.

U. V. = ( $\lambda_{\text{Max.}}$ , nm) 217,5 ( $\epsilon = 9050$ ).

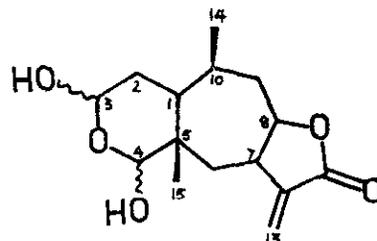
I. R. = ( $\nu_{\text{Max.}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3700-3540 (OH) 1772 ( $\gamma$ -lattone sostituito) 1700 e 1574 (ciclopentenone).

M. S. = (m/e) 256 ( $M^+ - \text{CH}_3$ ), 250 ( $M^+ - \text{CH}_2\text{OH}$ ), 249, 235, 232.

$^1\text{H-NMR}$  = ( $\delta$ , ppm, DMSO) 7,7 (1H, dd) C-2, 5,06 (1H, dd) C-3, 4,78 (1H, m) C-8, 3,5 (2H, br) C-13, 1,23 (3H, d) C-14, 1,08 (3H, s) C-15, 5,15 (1H, t) -OH secondario, 5,07 (1H, m) -OH terziario.

Bioattività: significativa attività *in vivo* nella leucemia linfocitica L-1210.

XXIII. - IMENOSSONE [31, 32]



$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_5$ , PM = 282, p. f. =  $135-142^\circ \text{C}$ .

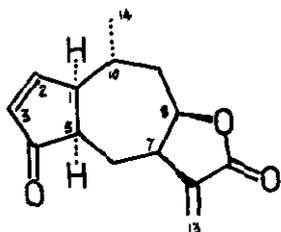
Isolata da *Hymenoxys odorata* (Compositae).

I. R. = ( $\nu_{\text{Max.}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ , KBr) 3390-3425 (OH), 1735 ( $\alpha$ -metilene,  $\gamma$ -lattone), 1650 (esometilene).

$^1\text{H-NMR}$  = ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ -DMSO, 100 MHz) 6,12 (1H, d,  $J = 2,5$  Hz) C-13, 5,61 (1H, d,  $J = 2,0$  Hz) C-13', 1,05 (3H, d,  $J = 2,5$  Hz) C-14, 0,94 (3H, s) C-15, 6,24 (1H, d,  $J = 4$  Hz) OH in C-4, 6,03 (1H, d,  $J = 7$  Hz) OH in C-3, 5,20 (1H, m) C-3, 4,58 (1H, d,  $J = 3$  Hz) C-4.

Bioattività: attività di veleno mortale eseguita su pecore; dose letale intraperitoneale:  $IPLD_{50} = 7 \text{ mg/kg}$ . L'effetto tossico è stato prevenuto nel cane iniettando l'Imenossone simultaneamente alla L-cisteina.

## XXIV. - MESSICANINA E [33]



$C_{14}H_{16}O_3$ , PM = 232, p. f. = 95-100 °C,  $[\alpha]_D^{26} = -55,0^\circ$  (C = 1,0,  $CHCl_3$ ).

Isolata da *Helenium microcephalum* - Texas.

I. R. = ( $\nu_{Max}$ ,  $cm^{-1}$ ,  $CCl_4$ ) 1777-1667 ( $\alpha$ -metilene,  $\gamma$ -lattone), 1712 e 1592 (ciclopentenone).

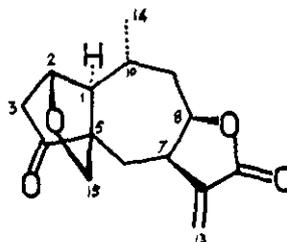
$^1H$ -NMR = ( $\delta$ , ppm,  $CDCl_3$ , 100 MHz) 5,70 (1H, d, J = 1,5 Hz) C-13, 6,23 (1H, d, J = 1,5 Hz) C-13', 4,64 (1H, m) C-8, 6,28 (1H, dd, J = 2,25 e 6,0 Hz) C-3, 7,83 (1H, dd, J = 2,25 e 6,0 Hz) C-2, 1,19 (3H, d, J = 6,0 Hz) C-14.

La struttura chimica e stereochimica è stata confermata per cristallografia ai raggi X.

Bioattività: significativa *in vivo* contro il carcinosarcoma Walker 256 del topo e attività citotossica *in vitro* con T/C  $\geq 125\%$ .

Bioattività: attivo *in vitro* contro linee di cellule del carcinoma umano della nasofaringe KB;  $ED_{50} = 2.5 \mu\text{g/ml}$ .

## XXVI. - MICROELENINA A [35]



$C_{15}H_{18}O_4$ , PM = 262, p. f. = 140-141 °C,  $[\alpha]_D^{24} = +89^\circ$  (C = 1, MeOH).

Isolata da *Helenium microcephalum* - Texas, USA.

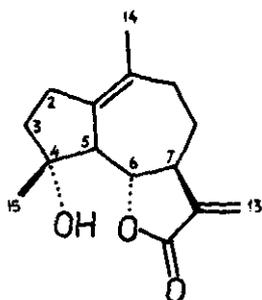
I. R. = ( $\nu_{Max}$ ,  $cm^{-1}$ ,  $CCl_4$ ) 1772 e 1665 ( $\alpha$ -metilene,  $\gamma$ -lattone), 1758 (ciclopentenone).

$^1H$ -NMR = ( $\delta$ , ppm) 6,34 (1H, d, J = 3 Hz) C-13, 5,77 (1H, d, J = 3 Hz) C-13', 1,17 (3H, d, J = 7 Hz) C-14, 4,77 (1H, ddd, J = 4,9 e 11 Hz) C-8, 3,12 (1H, m) C-7, 3,64 (1H, q<sub>AB</sub>, J = 9 Hz) C-15, 3,85 (1H, q<sub>AB</sub>, J = 9 Hz) C-15', 4,53 (1H, m) C-2.

Misure di CD (dicroismo circolare) e ORD (dispersione ottica rotatoria) mostrano la cis-fusione C-7/C-8 con H-7 e H-8 di tipo  $\alpha$  e la trans-fusione C-1/C-5 con H-1 $\alpha$  e Me-5 $\beta$ .

Bioattività: attività inibitoria *in vivo* contro il carcinoma Walker 256 del ratto; T/C = 148% con dose di 2,5 mg/kg.

## XXV. - MICHELIOLIDE [34]



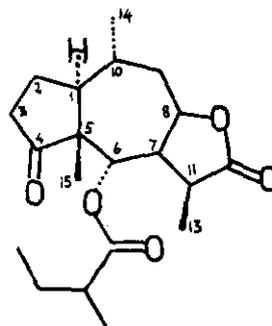
$C_{15}H_{20}O_3$ , PM = 248, p. f. = 141 °C (etere etilico).

Isolata da *Michelia compressa* Maxim (Magnoliaceae).

M. S. = (m/e) 248 ( $M^+$ ), 230 ( $M-H_2O$ ), 190, 43.

$^1H$ -NMR = ( $\delta$ , ppm,  $CDCl_3$ ) 1,31 (3H, s) C-15, 1,69 (3H, br d, J = 1,6 Hz) C-14, 3,82 (1H, t, J = 10 Hz) C-6, 5,50 (1H, d, J = 3 Hz) C-13, 6,20 (1H, d, J = 3 Hz) C-13'.

## XXVII. - MICROELENINA B [33]



$C_{20}H_{28}O_5$ , PM = 348, p. f. = 111-113 °C ( $CHCl_3$ ),  $[\alpha]_D^{28} = 84,91$  (C = 1,75, MeOH).

Isolata da *Helenium microcephalum* - Texas, USA.

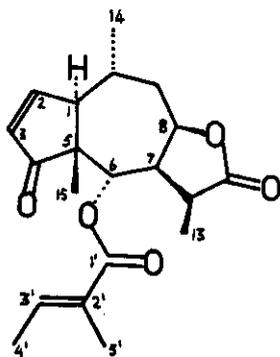
I. R. = ( $\nu_{Max}$ ,  $cm^{-1}$ ) 1726 e 1556 (ciclopentenone), 1783 ( $\alpha$ -metilene,  $\gamma$ -lattone), 1741, 1230 e 1190 (estere 2-metilbutirrico).

M. S. = (m/e) 348 ( $M^+$ ), 85,06 ( $CH_3-CH_2-CH(CH_3)-C = O^+$ ).

$^1\text{H-NMR}$  = ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ) 7,79 (1H, dd,  $J$  = 2,3 e 3,6 Hz) C-2, 6,14 (1H, dd,  $J$  = 3,0 e 6,0 Hz) C-3, 1,55 (3H, d,  $J$  = 6,0 Hz) C-13, 1,08 (3H, s) C-15, 1,28 (3H, d,  $J$  = 6,0 Hz) C-14, 1,07 (3H, d,  $J$  = 7,5 Hz) metile dell'estere metil-butirrico.

Bioattività: significativa attività *in vivo* contro il carcinoma Walker 256 del topo.

XXVIII. - MICROELENINA C [33]



$\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_5$ , PM = 346, p. f. = gomma,  $[\alpha]_D^{23}$  = 85,0 (C = 1.30, MeOH).

Isolata da *Helenium microcephalum* - Texas, USA.

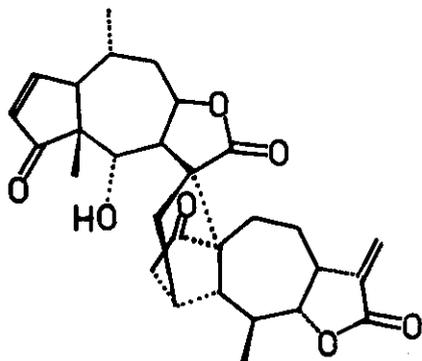
I. R. = ( $\nu_{\text{Max.}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\text{CCl}_4$ ) 1725, 1583 (ciclopentenone), 1728 ( $\gamma$ -lattone), 1725, 1651, 1260, 1182 (radicale dell'acido tiglico).

M. S. = (m/e) 346,1782 ( $\text{M}^+$ ) 246,1252 ( $\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{CH} = \text{C}(\text{CH}_3)\text{COOH}$ ), 83,0494 ( $\text{CH}_3\text{CH} = \text{C}(\text{CH}_3)\text{CO}^+$ ).

$^1\text{H-NMR}$  = ( $\delta$ , ppm), 7, 79 (1H, dd,  $J$  = 2,0, 6,0 Hz) C-2, 6,06 (1H, dd,  $J$  = 3,0, 6,0 Hz) C-3, 1,50 (3H, d,  $J$  = 6,0 Hz) C-13, 4,78 (1H, m) C-8, 6,64 (1H) C-2', 1,73 (3H) C-5', 1,74 (3H, d,  $J$  = 7,0 Hz) C-4', 5,50 (1H) C-6, 1,05 (3H, s) C-15, 1,25 (3H, d,  $J$  = 6,0 Hz) C-14.

Bioattività: significativa attività *in vivo* contro il carcinoma Walker 256 del topo.

XXIX. - MICROLENINA [36, 37]



$\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{O}_7$ , PM = 494, p. f. = 280 °C (decomp.),  $[\alpha]_D^{22}$  = +100° (C = 1, Piridina).

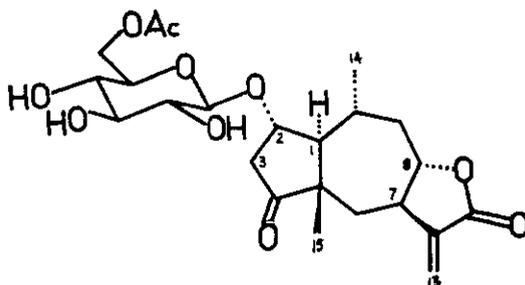
Isolata da *Helenium microcephalum* - Texas, USA.

I. R. = ( $\nu_{\text{Max.}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ , KBr) 3521 (OH), 1763 ( $\gamma$ -lattone), 1756, 1664 ( $\alpha$ -metilene,  $\gamma$ -lattone), 1744 (ciclopentenone), 1707 (ciclopentenone).

La struttura chimica e stereochimica è stata definita per via chimica, spettroscopica H-NMR e M. S. ad alta risoluzione per il monoacetil derivato e confermata per via cristallografica ai raggi X.

Bioattività: attiva *in vivo* contro il carcinoma Walker 256 del topo (T/C 125%), C = 2,5 mg/kg.

XXX. - PAUCINA [31, 38, 39]



$\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_{10}$ , PM = 468, p. f. = 144-146 °C,  $[\alpha]_D$  = +19,2°.

Isolata da *Hymonoxys grandiflora* - Colorado, USA, da *Baileya pauciradiata* Harv., da *Baileya pleniradiata* Cov. - California-Arizona, USA.

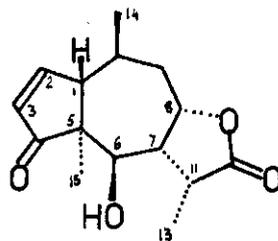
U. V. = ( $\lambda_{\text{Max.}}$ , nm) 214 ( $\epsilon$  = 11000), 240 ( $\epsilon$  = 5400).

I. R. = ( $\nu_{\text{Max.}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) 1760, 1655 ( $\alpha$ -metilene,  $\gamma$ -lattone), 1730 (acetato), 1720, 1610 (ciclopentenone).

$^1\text{H-NMR}$  = ( $\delta$ , ppm) 7.00 (1H, d,  $J$  = 1,5 Hz) C-2, 3,32 (1H) C-7, 4,70 (1H, m) C-8, 5,55 (1H, d,  $J$  = 2,0 Hz) C-13, 6,16 (1H, d,  $J$  = 2,5 Hz) C-13', 1,23 (3H, d,  $J$  = 6,0 Hz) C-14, 1,34 (3H, s) C-15, 2,21 (3H, s) acetato.

Bioattività: attiva *in vivo* contro la leucemia P-338 del topo.

XXXI. - PLENOLINA [10, 40]



$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$ , PM = 264, p. f. = 223-226 °C.

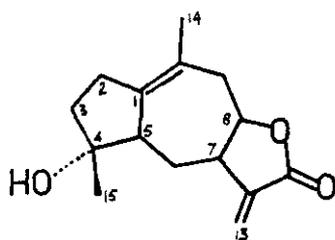
Isolata da *Helenium autumnale* - Florida, USA.

I. R. = ( $\nu_{\text{Max.}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3450 (OH), 1745 ( $\gamma$ -lattone), 1712 (ciclopentenone).

$^1\text{H-NMR}$  = ( $\delta$ , ppm) 7,60 (1H, dd,  $J$  = 2, 6 Hz) C-2, 6,08 (1H, dd,  $J$  = 3, 6 Hz) C-3, 1,26 (3H, d,  $J$  = 7 Hz) C-13, 1,08 (1H, s) C-15, 1,02 (3H, d,  $J$  = 7 Hz) C-14, 4,87 (1H, m) C-8, 4,73 (1H, d,  $J$  = 4 Hz) C-6.

Bioattività: attiva *in vitro* su colture cellulari del carcinoma epidermoide umano della laringe H Ep-2;  $\text{ED}_{50}$  = 0,814  $\mu\text{g/ml}$ .

XXXII. - PSEUDOIVALINA [10, 41, 42]



$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3$ , PM = 248, p. f. = 122-123 °C,  $[\alpha]_D^{25}$  = -145° (C = 1,00,  $\text{CHCl}_3$ ).

Isolata da *Iva microcephala* (Compositae).

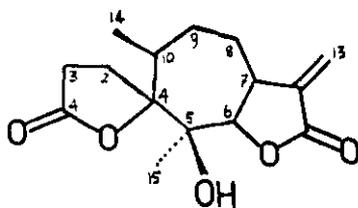
U. V. = ( $\lambda_{\text{Max.}}$ , nm) 210 ( $\alpha$ -metilene,  $\gamma$ -lattone).

I. R. = ( $\nu_{\text{Max.}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3650, 3500 (OH), 1760, 1660 ( $\alpha$ -metilene,  $\gamma$ -lattone), 1630 (insaturazione olefinica -endo).

$^1\text{H-NMR}$  = ( $\delta$ , ppm) 4,6 (1H, m) C-8, 6,02 (1H, d,  $J$  = 3 Hz) C-13, 5,45 (1H, d,  $J$  = 3 Hz) C-13', 1,00 (3H, s) C-15, 1,57 (3H, d,  $J$  = 1 Hz) C-14.

Bioattività: attiva *in vitro* verso colture di carcinoma umano della nasofaringe KB;  $\text{ED}_{50}$  = 1,8  $\mu\text{g/ml}$ .

XXXIII. - PSILOSTACHINA [10, 43, 44]



$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_5$ , PM = 280, p. f. = 215 °C,  $[\alpha]_D^{24}$  = -125° (C = 4,76,  $\text{CHCl}_3$ ).

Isolata da *Ambrosia psilostachya* DG - Texas, USA e da *Ambrosia astemisifolia* - Australia.

U. V. = ( $\lambda_{\text{Max.}}$ , nm, MeOH) 212 ( $\epsilon$  = 12600)  $\alpha$ -metilene,  $\gamma$ -lattone.

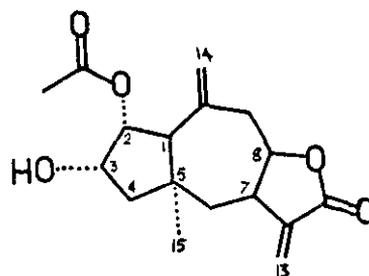
I. R. = ( $\nu_{\text{Max.}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) 1764 ( $\gamma$ -lattone), 3570 (OH), 1660 (esometilene).

M. S. = (m/e) 280 ( $\text{M}^+$ ).

$^1\text{H-NMR}$  = ( $\delta$ , ppm, DMSO) 5,29 (1H, s) OH; ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ) 1,22 (3H, s) C-15, 1,04 (3H, d,  $J$  = 7 Hz) C-14, 4,96 (1H, d,  $J$  = 10 Hz) C-6, 5,53 (1H, d,  $J$  = 3 Hz) C-13, 6,29 (1H, d,  $J$  = 3 Hz) C-13', 3,43 (1H, m) C-7.

Bioattività: attiva *in vitro* contro il carcinoma umano della nasofaringe KB;  $\text{ED}_{50}$  = 5,4  $\mu\text{g/ml}$ .

XXXIV. - PULCHELLINA E [10, 41, 45]



$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_5$ , PM = 306, p. f. = 181-183 °C,  $[\alpha]_D^{28}$  = +43,8° (C = 1,05, EtOH).

Isolata da *Gaillardia pulchella* (Compositae).

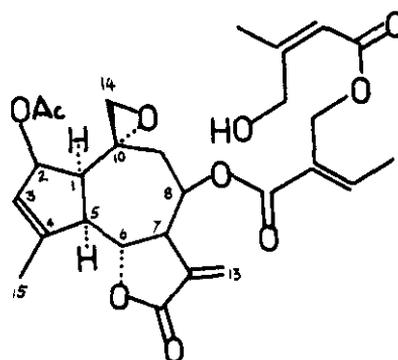
U. V. = ( $\lambda_{\text{Max.}}$ , nm) 210 ( $\epsilon$  = 14000)  $\alpha$ -metilene,  $\gamma$ -lattone.

I. R. = ( $\nu_{\text{Max.}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3620, 3510 (OH), 1760 ( $\alpha$ -metilene,  $\gamma$ -lattone), 1740 (acetato), 1660, 1650 (esometileni).

$^1\text{H-NMR}$  = ( $\delta$ , ppm) 6,18 (1H, d) C-13, 5,66 (1H, d) C-13', 5,08 (1H, br d,  $J$  = 11 Hz) C-2, 4,98 (1H, br) C-14, 4,70 (1H, br) C-14', 4,56 (1H, td,  $J$  = 5,2 Hz) C-8, 3,73 (1H, m) C-3, 3,05 (1H, m) C-7, 2,18 (3H, s) acetato, 0,89 (3H, s) C-15.

Bioattività: attiva *in vitro* contro linee di cellule del carcinoma umano della nasofaringe KB;  $\text{ED}_{50}$  = 1,0  $\mu\text{g/ml}$ .

XXXV. - SPICATINA [10, 46, 47]



$\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_{10}$ , PM = 516, p. f. = vetrosa (bromidato = 95-98 °C),  $[\alpha]_D^{22}$  = -146° (C = 0,20,  $\text{CHCl}_3$ ).

Isolata da *Liatris spicata* e da *Liatris pycnostachya* (Compositae).

I. R. = ( $\nu_{\text{Max.}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3510 (OH), 1778, 1652 ( $\alpha$ -metilene,  $\gamma$ -lattone), 1715 (esteri insaturi coniugati).

M. S. = (m/e) 517 ( $\text{MH}^+$ , 0,5), 499 ( $\text{MH}^+-18$ , 0,2), 439 ( $\text{MH}^+-18-60$ , 2,3), 399 ( $\text{MH}^+-118$ , 0,7).

$^1\text{H-NMR}$  = ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ , 90 MHz) 1,58 (1H) C-1, 5,44 (1H, m) C-2, 5,44 (1H, m) C-3, 2,19 (1H, dd,  $J = 9, 11$  Hz) C-5, 4,60 (1H, dd,  $J = 11, 8$  Hz) C-6, 3,56 (1H, ddd,  $J = 8, 3,9, 3,6, 3,2$  Hz) C-7, 5,51 (1H, td,  $J = 8, 8, 3,9$  Hz) C-8, 2,18 AB di ABx (1H,  $J_{\text{AX}}-J_{\text{BX}} = 9$  Hz,  $J_{\text{AB}} = 15$  Hz) C-9, 6,23 (1H, d,  $J = 3,6$  Hz) C-13, 2,22 (2H) C-14, 1,68 (3H, br s) C-15, 7,0 (1H, q) vinilico sarracinolico, 1,9 (3H, s) metile sarracinolico, 4,8 (2H, s) metilene alcolico sarracinolico.

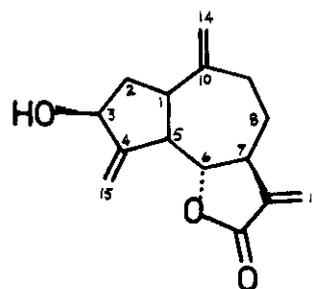
La struttura chimica e stereochimica è stata confermata per cristallografia a raggi X.

Bioattività: ha mostrato una spiccata attività citotossica *in vitro* contro linee di cellule del carcinoma umano della nasofaringe KB.

(C-1), 51,6 (C-13), 55,1 (C-5), 57,2 (C-11), 80,3 (C-6), 131,4 (C-3), 163,2 (C-2), 173,5 (C-12), 210,1 (C-4).

Bioattività: ha mostrato una spiccata attività citotossica *in vitro* contro linee di cellule del carcinoma umano della nasofaringe KB.

XXXVII. - ZALUZANINA C [10, 49]



$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_3$ , PM = 246, p. f. = 93-95 °C,  $[\alpha]_D^{20} = +37^\circ$  ( $\text{CHCl}_3$ ).

Isolata da *Zaluzania parthenoides*.

I. R. = ( $\nu_{\text{Max.}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ , KBr) 1764, 1239 ( $\alpha$ -metilene,  $\gamma$ -lattone), 1639, 900 (insaturazione olefinica).

$^1\text{H-NMR}$  = ( $\delta$ , ppm) 6,21 (1H, d,  $J = 3$  Hz) C-13, 5,52 (1H, d,  $J = 3$  Hz) C-13', 5,03 (1H, s) C-14, 4,97 (1H, s) C-14', 5,45 (1H, t,  $J = 1$  Hz) C-15, 5,35 (1H, t,  $J = 1$  Hz) C-15', 4,15 (1H, t,  $J = 9$  Hz) C-6, 2,95-1 (10 H, m) metilene e metini.

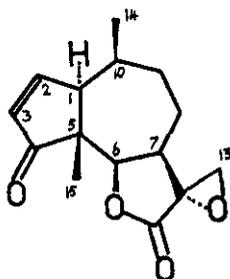
La struttura chimica e stereochimica è stata confermata per via cristallografica ai raggi X.

Bioattività: citotossica *in vitro* verso linee di cellule del carcinoma umano della nasofaringe KB,  $\text{ED}_{50} = 2,9 \mu\text{g/ml}$ .

Attiva su test di sistema PS, 86-101 % con dosi 2,5-10,0 mg/kg.

Attiva contro la leucemia linfocitica P-388.

XXXVI. - STRAMONINA B [48]



$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_4$ , PM = 262, p. f. = 175-176 °C (isopropil etere- $\text{CHCl}_3$ ),  $[\alpha]_D^{20} = -125^\circ$  (C = 1,14,  $\text{CHCl}_3$ ).

Isolata da *Parthenium tomentosum* (var. *stramonium*) (Compositae).

U. V. = ( $\lambda_{\text{Max.}}$ , nm, MeOH) 226 ( $\epsilon = 8947$ ).

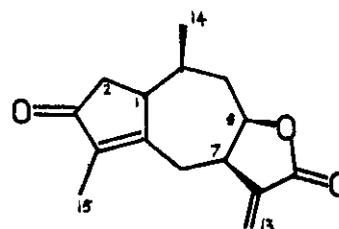
I. R. = ( $\nu_{\text{Max.}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ , KBr) 3098, 2975, 2952, 2925, 2870, 1775\*, 1720\*\*, 1595\*\*, 1478, 1470, 1465, 1392, 1385, 1375, 1338, 1318, 1294, 1268, 1250\*\*\*, 1218, 1209, 1168, 1121, 1100, 1070, 1045, 1024, 1009, 980\*\*\*, 960, 926, 880, 870, 860, 835\*\*\*, 800 (\* $\gamma$ -lattone) (\*\*ciclopentenone) (\*\*\*)epossido).

M. S. = (m/e) 262 ( $\text{M}^+$ ).

$^1\text{H-NMR}$  = ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz) 7,48 (1H, dd,  $J = 2, 6$  Hz) C-2, 6,12 (1H, dd,  $J = 3, 6$  Hz) C-3, 3,29 (2H, q<sub>AB</sub>,  $J = 5,5, 36,1$  Hz) C-13, 1,24 (3H, s) C-15, 1,05 (3H, d,  $J = 7$  Hz) C-14, 2,24 (1H, m) C-10, 4,78 (1H, d) C-6.

$^{13}\text{C-NMR}$  = ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ ) 17,0 (C-14), 7,5 (C-15), 21,4 (C-9), 29,2 (C-8), 33,4 (C-10), 39,9 (C-7), 47,0

XXXVIII. - XERANTOLIDE [50]



$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_3$ , PM = 246, p. f. = 175-177 °C,  $[\alpha]_D^{20} = +239,6^\circ$  (C = 0,484, MeOH).

Isolata da *Xeranthemum cylindraceum*, Sibth. e Smith (Cynareae).

U.V. = ( $\lambda_{\text{Max.}}$ , nm) 239 ( $\log \epsilon = 4,10$ ).

I. R. = ( $\nu_{\text{Max.}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) 1770, 1158 ( $\alpha$ -metilene,  $\gamma$ -lattone), 1695, 1638 (ciclopentenone).

M. S. = (m/e) 246 ( $\text{M}^+$ ).

$^1\text{H-NMR}$  = ( $\delta$ , ppm,  $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) 6,29 (1H, d,  $J = 3,4$  Hz) C-13, 5,60 (1H, d,  $J = 2,9$  Hz), 4,13 (1H, ddd,  $J = 3,5, 9,0, 11,5$  Hz) C-8, 1,77 (3H, s) C-15.

Bioattività: attiva *in vitro* verso colture di cellule del carcinoma umano della nasofaringe KB;  $\text{ED}_{50}$  (DMSO) = 1,45  $\mu\text{g/ml}$ ; e del carcinoma della cervice uterina HeLa;  $\text{ED}_{50} = 1,503$   $\mu\text{g/ml}$ .

Ricevuto il 23 gennaio 1982.

Accettato il 7 febbraio 1982.

#### BIBLIOGRAFIA

- BARBETTI, P. & CASINOVI, C. G. 1981. Sesquiterpeni lattonici di interesse farmacologico. Proprietà strutturali e funzionali. Parte I: Eudesmanolidi. *Ann. Ist. Super. Sanità.* **17** (2): 255-282.
- BARBETTI, P. & CASINOVI, C. G. 1981. Sesquiterpeni lattonici di interesse farmacologico. Proprietà strutturali e funzionali. Parte II: Germacranolidi. *Ann. Ist. Super. Sanità.* **17** (2): 283-322.
- CANCER CHEMOTHERAPY NATIONAL SERVICE CENTER. 1962. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Cancer Chemother. Rep.* **25**: 1-56.
- GERAN, R. I., GREENBERG, N. H., MACDONALD, M. M., SCHUMACHER, A. M. & ABBOTT, B. J. 1972. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems (third edition). *Cancer Chemother. Rep.* **3** (2): 1-88.
- KING, M. L., WANG, C. T., CHANG, C. F., HSU, H. M., WANG, S. J., HARTWELL, J. L. & ABBOTT, B. J. 1974. Screening study on Taiwan plants for antitumor activities. *Cancer Chemother. Rep.* **2**, **4** (3): 1-5.
- ABBOTT, B. J. 1976. Bioassay of plants extract for anticancer activity. *Cancer Treatment Rep.* **60**: 1007-1010.
- SONTAG, J. M., PAGE, N. P. & SAFFIOTTI, U. 1976. Guidelines for carcinogen bioassay in small rodents. *Carcinog. Tech. Rep. Ser.* **1**: 1-65.
- HLADON, B., DROZDZ, B., HOLUB, M. & BOBKIEWICZ, T. 1975. Sesquiterpene lactones. XVI. *In vitro* studies on cytotoxic properties of sesquiterpene lactones in tissue cultures of human and animal malignant cells. *Arch. Immun. Ther. Experim.* **23**: 845-855.
- POPLAWSKI, J., HOLUB, M., ZAMEK, Z. & HEROUT, V., 1971. On Terpenes. CCIX. Arnicolides - Sesquiterpenic lactones from the leaves of *Arnica montana* L. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **36**: 2189-2199.
- PETTIT, G. R. & GRAGG, G. M. 1978. *Biosynthetic products for cancer chemotherapy* II. Ed. Plenum Press, London.
- HERZ, W., SUBRAMANIAN, P. S. & DENNIS, N. 1969. Stereochemistry of flexuosin A and related compounds. *J. Org. Chem.* **34**: 2915-2917.
- VON DRIELE, R. B., PETTIT, G. R., GRAGG, G. M. & ODE, R. H. 1975. The crystal and molecular structure of the pseudoguaianolide Autumnolide. *J. Am. Chem. Soc.* **97**: 5256-5259.
- DOMINGUEZ, X. A., GUTIERREZ, M. & ARAGON, R. 1976. Isolation of Baileyolin a tumor inhibitory and antibiotic sesquiterpene lactone from *Baileya multiradiata*. *Planta Med.* **30**: 356-359.
- SUCHY, M., HEROUT, V. & SORM, F. 1960. Structure of Cynaropicrin. *Coll. Czech. Chem. Commun.* **25**: 2777-2782.
- GONZALEZ, A. G., BERMEJO, J., MASSANET, G. M. & PEREZ, J. 1973. Muricatina, una nuova lactona sesquiterpenica aislada de la *Ambroboea muricata* D.C. *An. Química.* **69**: 1333-1334.
- OHNO, N., HIZAI, H., YOSHIOKA, H., DOMINGUEZ, X. A. & MABRY, T. J. 1973. Cinaropicrin, a sesquiterpene lactone from *Centaurea americana*. *Phytochem.* **12**: 221-222.
- CORBELLA, A., GARIBOLDI, P., JOMMI, G., SAMEK, Z., HOLUB, M., DROZDZ, B. & BLOSZYK, E. 1972. Absolute stereochemistry of Cynaropicrin and related guaianolides. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **7**: 386-387.
- GONZALEZ, A. G., BERMEJO, J., CABRERA, I., MASSANET, G. M., MANSILLA, H. & GALINDO, A. 1977. Two sesquiterpene lactones from *Centaurea canariensis*. *Phytochem.* **17**: 955-956.
- PETTIT, G. R., BUDZINSKI, J. C., GRAGG, G. M., BROWN, O. & JOHNSTON, L. D. 1974. Antineoplastic agents. 34. *Helenium autumnale* L. *J. Med. Chem.* **17**: 1013-1016.
- HERZ, W., DE VIVAR, A. R., ROMO, J. & VISWANATHAN, N. 1963. Constituents of *Helenium* species. XIII. The structure of Helenalin and Mexicanin A. *J. Am. Chem. Soc.* **85**: 19-26.
- WILLUHN, G. & HERMANN, H. D. 1976. Untersuchungen über die inhalstoffe von Arnica-Arten, 9. Zwei sesquiterpenlactone aus den bluten von *Arnica longifolia*. *Arch. Pharm.* **309**: 333-335.
- KUPCHAN, S. M., KELSEY, J. E., MARUYAMA, M., CASSADY, J. M., HEMINGWAY, J. C., & KNOX, J. R. 1969. Tumor inhibitors. XLI. Structural elucidation of tumor-inhibitory sesquiterpene lactones from *Eupatorium rotundifolium*. *J. Org. Chem.* **34**: 3876-3883.
- KUPCHAN, S. M., EAKIM, M. A. & THOMAS, A. M. 1971. Tumor inhibitors. 69. Structure-cytotoxicity relationships among the sesquiterpene lactones. *J. Med. Chem.* **14**: 1147-1152.

24. FISHER, H. D., FISHER, N. H. & OLIVIER, R. W. 1979. *Fortschritte der chemie organischer naturstoffe*. Springer-Verlag Ed. Berlin, p. 47.
25. LEE K. H., IBUTA, T., KOZUKA, M. MCPHAIL, A. T. & ONAN, K. D. 1974. The structure and absolute configuration of florilenalin a new cytotoxic guaianolide from Florida *Helenium autumnale* L. *Tetrahedron Lett.* **26**: 2287-2290.
26. DULFORCE, T. A., SIM, G. A. & WHITE, D. N. J. 1971. Sesquiterpenoids. Part. XII. Stereochemistry of Gaillardin: crystal and molecular structures of bromogaillardin and deacetyldihydrogaillardin p-bromobenzoate. *J. Chem. Soc., (B)*. **45**: 1399-1405.
27. DULFORCE, T. A., SIM, G. A., WHITE, D. N. J., KELSEY, J. E. & KUPCHAM, S. M. 1969. The stereochemistry of gaillardin. *Tetrahedron Lett.* **12**: 973-976.
28. KUPCHAN, S. M., CASSADY, J. M., KELSEY, J. E., SCHNOES, H. K., SMITH, D. H. & BURLINGAME, A. L. 1966. Structural elucidation and high-resolution mass spectrometry of Gaillardin, a new cytotoxic sesquiterpene lactone. *J. Am. Chem. Soc.* **88**: 5292-5302.
29. SAMEK, Z., HOLUB, M., VOKAC, K., DROZDZ, B., JOMMI, G., GARIBOLDI, P. & CORBELLA, C. 1971. On Terpenes. CCXIX. The structure of Grosheimin. *Coll. Czech. Chem. Commun.* **37**: 2611-2629.
30. BIALECKI, M., BLOSZYK, E., DROZDZ, B., HLADON, B., SZWEIMIN, S. 1973. Sesquiterpene lactones. Part. VIII. Cytostatic activity of Grosheimin. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* **25**: 195-199. Cfr. Chem. Abst., 79, 73515n (1973).
31. HERZ, W., AOTA, K., HALL, A. L. & SRINIVASAN, A., 1974. Antileukemic pseudoguaianolide from *Hymenoxys grandiflora* (T & G) Parker. Application of lanthanide induced shift to structure determination, *J. Org. Chem.* **39**: 2013-2017.
32. HILL, D. W., KIM, H. L., MARTIN, C. L. & CAMP, B. J. 1977. Identification of Hymenoxon in *Baileya multiradiata* and *Helenium boopsii*. *J. Agr. Food Chem.* **25**: 1304-1307.
33. LEE, K. H., IMAKURA, Y., SIMS, D., MCPHAIL, A. T. & ONAN, K. D. 1977. Antitumor sesquiterpene lactones from *Helenium Microcephalum*: isolation of Mexicanin E and structural characterization of microhelenium B and C. *Phytochem.* **16**: 393-395.
34. OGIURA, M., CORDELL, G. A. & FARNSWORTH, N. R. 1978. Anticancer sesquiterpene lactones of *Micbelia compressa* (Magnoliaceae). *Phytochem.* **17**: 957-961.
35. LEE, K. H., IMAKURA, Y. & SIMS, D. 1976. Antitumor agents. XVII: structure and stereochemistry of Microhelenin-A, a new antitumor sesquiterpene lactone from *Helenium microcephalum*. *J. Pharm. Sci.* **65**: 1410-1412.
36. LEE, K. H., IMAKURA, Y., SIMS, D., MCPHAIL, A. T. & ONAN, K. D., 1976. Structure and stereochemistry of microlenin, a novel antitumor dimeric sesquiterpene lactone from *Helenium microcephalum*, x-ray crystal structure. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **10**: 341-342.
37. LEE, K. H., IMAKURA, Y. & SIMS, D. 1976. Structure and stereochemistry of microlenin, a novel antitumor dimeric sesquiterpene lactone from *Helenium microcephalum*; x-ray cristal structure. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **10**: 341-342.
38. HERZ, W., AOTA, K., HOLUB, M. & SAMEK, Z. 1970. Sesquiterpene lactones and lactone glycosides from *Hymenoxys* species. *J. Org. Chem.* **35**: 2611-2624.
39. WADDELL, T. G. & GEISSMAN, T. A. 1969. Paucin, a new sesquiterpene lactone glucoside. *Tetrahedron Lett.* **7**: 515-517.
40. LEE, K. H., IBUKA, T., MCPHAIL, A. T., ONAN, K. D., GEISSMAN, T. A. & WADDELL, T. G. 1974. The structure and absolute configuration of plenolin, a cytotoxic sesquiterpene lactone. *Tetrahedron Lett.* **13**: 1149-1151.
41. HARTWELL, J. L. & ABBOTT, B. J. 1969. Antineoplastic principles in plants: recent developments in the field. *Adv. Pharmacol. Chemother.* **7**: 117-159.
42. HERZ, W. H., DE VIVAR, A. R. & LAKSHMIKANTHAM, M. V. 1965. Constituents of *Iva* Species. IV. Structure of Pseudoivalin, a New Guaianolide. *J. Org. Chem.* **30**: 118-122.
43. MABRY, T. J., MILLER, H. E., KAGAN, H. B. & RENOLD, W. 1966. The structure of psilostachyn, a new sesquiterpene dilactone from *Ambrosia psilostachya*. *Tetrahedron.* **22**: 1139-1146.
44. BIANCHI, E., CULVENOR, C. C. J. & LODER, J. W. 1968. Psilostachyn, a cytotoxic constituent of *Ambrosia artemissifolia* L. *Aust. J. Chem.* **21**: 1109-1111.
45. HERZ, W. & ROY, S.K. 1969. New pseudoguaianolides from *Gaillardia pulchella*. *Phytochem.* **8**: 661-664.
46. HERZ, W., POPLAWSKI, J. & SHARMA, R. P. 1975. New guaianolides from *Liatris* species, *J. Org. Chem.* **40**: 199-206.
47. KARLSSON, B., PILOTTI, A. M., WIEHAGER, A. C., WAHLBERG, I. & HERZ, W. 1975. Crystal structure of spicatin hydrobromide. Revision of the structure of spicatin. *Tetrahedron Lett.* **14**: 2245-2248.
48. GRIECO P. A., OGURI, T., BURKE, S., RODRIGUEZ, E., DE TITTA, G. T. & FORTIER, S. 1978. Structure, absolute configuration and synthesis of Stramonin -B, a new cytotoxic pseudoguaianolide. *J. Org. Chem.* **43**: 4552-4554.
49. DOMINGUEZ, X. A., MARROQUIN, J. & CARDENAS, E. 1975. Isolation of Zaluzanin-C, a cytotoxic sesquiterpene lactone from *Zaluzania parthenoides*. *Planta Med.* **28**: 89-91.
50. ZAMEK, S., HOLUB, M., DROZDZ, B., GRABARCZYK, H. & HLADON, B. 1977. Xerantholide-A, new cytotoxically active sesquiterpene lactone from *Xeranthenum cylindraceum* Sibith et Smith. *Coll. Czech. Chem. Comm.* **42**: 2441-2447.

## Identificazione dei residui di dietilstilbestrolo in tessuti animali edibili mediante spettrometria di massa. Nota preliminare

G. MORETTI (a), G. CAVINA (a) e V. POMPI (b)

(a) Laboratorio di Chimica del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma; (b) Ospite presso il Laboratorio

**Riassunto.** - Viene descritta l'applicazione della spettrometria di massa allo scopo di confermare l'identità del dietilstilbestrolo in tessuti animali edibili, come tali o contenuti in prodotti dietetici omogeneizzati a base di carne. Il procedimento impiegato comprende l'estrazione del dietilstilbestrolo dal tessuto, dopo idrolisi enzimatica in soluzione tamponata, la sua purificazione mediante cromatografia su colonna ed il suo riconoscimento con l'impiego della cromatografia bidimensionale su strato sottile, secondo un metodo per la ricerca dei residui delle sostanze anabolizzanti nelle carni, proposto da Verbeke in sede comunitaria. Successivamente, una aliquota dell'estratto, ottenuto come sopra descritto, è fatta reagire con pentafluorobenzoil cloruro e trietilammina in soluzione benzenica. Il derivato così ottenuto viene purificato mediante cromatografia su colonna di acido silicico. L'eluato, dopo concentrazione, è introdotto nella sonda dello spettrometro di massa, la quale viene riscaldata fino a 250 °C; l'energia di ionizzazione è di 70 eV e gli spettri, ottenuti con scansione ripetitiva, vengono memorizzati dal computer. Sono riportati alcuni esempi di applicazione riguardanti campioni di rene di vitello e di prodotti dietetici omogeneizzati.

**Summary** (Identification of diethylstilbestrol residues in edible animal tissues by means of mass spectrometry. Preliminary report). - The application of mass spectrometry is described in order to confirm the identity of diethylstilbestrol in edible animal tissues, as such or else contained in baby food. The procedure includes the extraction of diethylstilbestrol from the tissue after enzymic hydrolysis in buffer, its purification by means of column chromatography and its detection by means of two-dimensional thin-layer chromatography, according to a method for detecting anabolic residues in meat proposed by Verbeke at E.E.C. Successively an aliquot of the extract, obtained with the described procedure, is allowed to react with pentafluorobenzoyl chloride and triethylamine in benzene solution. The derivative so obtained is purified by means of silicic acid column chromatography. The eluate, after concentration, is introduced into the probe of the mass spectrometer, which is heated up to 250 °C. The ionization energy is 70 eV and mass spectra are elaborated by a computer system by repetitive scanning. Some examples referring to calf kidney and baby food samples are reported.

### INTRODUZIONE.

Numerose sostanze anabolizzanti sono largamente impiegate a scopo auxinico in animali destinati all'alimentazione umana, nonostante tale pratica sia vietata in molti Paesi dalle rispettive legislazioni.

Questo gruppo di farmaci comprende una grande varietà di composti i quali, in base alla loro struttura, possono essere classificati in steroidi ormonali, sia endogeni che non endogeni, e sostanze di natura non steroidica; tra queste ultime sono compresi i derivati stilbenici, dei quali il rappresentante più noto, a causa del suo esteso impiego, è costituito dal dietilstilbestrolo.

È evidente che l'impiego incontrollato dei composti sopra menzionati rappresenta un potenziale rischio per la salute del consumatore, nell'eventualità della presenza dei loro residui nelle carni. Allo scopo di poter valutare l'entità ed anche la natura di questi residui, la cui concentrazione è in genere dell'ordine delle parti per miliardo (ppb) od anche inferiore, è necessario avere a disposizione metodologie analitiche dotate di sensibilità elevata e di specificità. A tale riguardo, sono stati proposti in letteratura numerosi metodi: nel corso degli ultimi anni, molto perfezionati sono stati i metodi cromatografici basati sulla gascromatografia [1], sulla cromatografia su strato sottile [2-5] e sulla cromatografia liquida ad alte prestazioni [6] e, in epoca piuttosto recente, sono stati studiati i metodi radioimmunologici [7-9]. L'impiego della spettrometria di massa è stato riportato solo in un numero limitato di casi per l'analisi di questi residui e tale tecnica è stata sempre utilizzata in associazione con la gascromatografia [10-12].

Nella presente nota viene descritta l'applicazione della spettrometria di massa allo scopo di confermare l'identità del dietilstilbestrolo in tessuti animali edibili, come tali o contenuti in prodotti dietetici omogeneizzati a base di carne. Il procedimento impiegato comprende l'estrazione dal tessuto e la messa in evidenza del dietilstilbestrolo mediante cromatografia su strato sottile, secondo un metodo proposto in sede comunitaria [4]; successivamente, sull'estratto si procede alla formazione del pentafluoro-benzoil derivato del dietilstilbestrolo, che, dopo purificazione, viene identificato mediante introduzione diretta del campione nello spettrometro di massa.

## PARTE SPERIMENTALE.

**Reattivi e prodotti.** - Il dietilstilbestrolo (DES) era un prodotto puro per uso farmaceutico. Tutti i solventi impiegati erano puri per analisi. L'etere etilico era reso privo di perossidi per passaggio su allumina basica. Il benzene impiegato per la preparazione dei derivati veniva riscaldato a ricadere per 2 ore su anidride fosforica e poi distillato. La trietilammina veniva riscaldata a ricadere su idrossido di potassio per 3 ore e poi distillata. Il cloruro di pentafluorobenzoile era fornito dalla Pierce Chemical (USA). L'acido silicico era Biosil HA minus 325 mesh della Biorad.

**Estrazione.** - L'estrazione del tessuto animale (ad esempio rene) oppure del prodotto omogeneizzato è stata eseguita con l'impiego del metodo di Verbeke [4], descritto per la ricerca dei residui delle sostanze anabolizzanti nei tessuti animali: 50 g di tessuto, oppure 40-50 g di prodotto omogeneizzato, si estraevano con metanolo dopo idrolisi enzimatica dei coniugati delle sostanze ormonali in soluzione tamponata. La fase acquoso-metanolica, dopo lavaggio con esano, si estraeva con diclorometano. Si evaporava fino a secchezza la soluzione di diclorometano ed il residuo, sciolto in acqua, era fatto passare su una colonna di Amberlite XAD-2, dalla quale le sostanze anabolizzanti venivano eluite con metanolo. L'estratto, dopo concentrazione, veniva fatto passare su una colonna di Extrelut basica, dalla quale le sostanze estrogene, eventualmente presenti, erano eluite con etere etilico. L'eluato così ottenuto si evaporava fino a secchezza ed il residuo si riprendeva con 100  $\mu$ l di acetone.

**Cromatografia su strato sottile.** - La cromatografia bidimensionale su strato sottile veniva effettuata con l'impiego di lastre HPTLC al gel di silice 60,10  $\times$  10 cm, secondo il procedimento descritto da Verbeke [4]. Per la deposizione si impiegavano 10-20  $\mu$ l della soluzione dell'estratto sopra preparata. Le sostanze estrogene venivano rivelate a luce U.V. (366 nm) mediante la fluorescenza sviluppatasi per trattamento delle lastre con un reattivo all'acido solforico e riscaldamento; il loro riconoscimento si effettuava mediante confronto dei valori di Rf con quelli delle sostanze di riferimento, ad esempio DES.

**Preparazione dei derivati.** - Per questo procedimento e per i successivi passaggi era necessario impiegare vetreria lavata con miscela cromica. La soluzione dell'estratto, rimasta dopo le prove di cromatografia su strato sottile, veniva evaporata fino a secchezza in provetta a fondo conico con tappo a smeriglio, su bagnomaria in corrente di azoto. Al residuo si aggiungeva 1 ml di soluzione di cloruro di pentafluorobenzoile (allo 0,1 % v/v in benzene anidro) ed 1 ml di soluzione di trietilammina (al 2 % v/v in benzene anidro). Dopo agitazione su Vortex si lasciava la soluzione in riposo per una notte a temperatura ambiente. Per la preparazione del derivato del DES di riferimento si procedeva in modo analogo, impiegando 500 ng circa di sostanza.

**Purificazione dei derivati.** - In una colonna cromatografica del diametro di 1 cm, lunghezza 14 cm, munita di rubinetto in teflon e di un tamponcino di cotone sgrassato sul fondo, si introducevano 1,6 g di acido

silicico sospesi in 10 ml di esano; dopo sedimentazione l'acido silicico veniva lavato con 10 ml di esano e si chiudeva il rubinetto quando l'esano aveva raggiunto il livello dell'adsorbente. La soluzione del campione, contenente il derivato del DES preparato nel modo sopra descritto, veniva evaporata in corrente di azoto su bagnomaria fino a secchezza; il residuo si riprendeva con 40  $\mu$ l di cloroformio e si trasferiva sulla colonna. La provetta si lavava ancora per due volte con 100  $\mu$ l di esano: cloroformio 90:10 (v/v) alla volta ed i lavaggi si trasferivano sulla colonna; questa si lavava con 25 ml di esano e si eluiva il derivato con 25 ml di esano: etere etilico 98:2 (v/v). L'eluato si concentrava in evaporatore rotante fino a piccolo volume e poi si trasferiva quantitativamente in provetta a punta conica, lavando il palloncino di raccolta più volte con piccoli volumi di eluente; si evaporava la soluzione fino a secchezza in corrente di azoto ed il residuo si riprendeva con 10  $\mu$ l di benzene anidro.

Per la purificazione del derivato del DES di riferimento si procedeva in modo analogo ed il residuo veniva ripreso egualmente con 10  $\mu$ l di benzene anidro.

**Spettrometria di massa.** - Per la spettrometria di massa è stato utilizzato un apparecchio LKB, modello 2091, munito di sistema di calcolo. Mediante una microsiringa si trasferiva la soluzione da analizzare (5-10  $\mu$ l) direttamente nel contenitore del campione per la sonda dell'apparecchio; il contenitore veniva poi posto in un essiccatore e si eliminava il solvente per mezzo di una pompa da vuoto. Si inseriva quindi il contenitore nella sonda, la quale veniva riscaldata progressivamente fino a 250 °C. L'energia di ionizzazione era di 70 eV. Gli spettri erano ottenuti con scansione ripetitiva e venivano memorizzati dal calcolatore.

## RISULTATI E DISCUSSIONE.

Nella Fig. 1 è riportato lo spettro di massa del derivato del DES di riferimento, costituito dal DES dipentafluorobenzoato, nel quale è ben evidente la presenza dello ione molecolare a  $m/z$  656 e di un frammento ionico a  $m/z$  195,  $[C_7F_5O]^+$ , il quale rappresenta il picco base. Dai risultati ottenuti nell'analisi di differenti campioni è stato osservato che l'elevato valore della massa dello ione molecolare rende questo perfluoro estere particolarmente idoneo alla messa in evidenza dei residui del DES, i quali, come precedentemente detto, sono presenti nei tessuti in concentrazioni estremamente basse. Tale ione è situato infatti in una zona dello spettro nella quale sono generalmente assenti ioni originati da possibili sostanze interferenti. Si deve far osservare che il procedimento di purificazione su colonna di acido silicico qui proposto per il derivato del DES consente di eliminare molte delle sostanze naturali proprie della matrice biologica, ancora presenti nei campioni dopo il complesso procedimento di estrazione, come è stato anche notato dalla presenza di una bandina di colore giallo bruno situata alla sommità dell'adsorbente.

Prendendo in esame il picco base ( $m/z$  195) del derivato, si è osservato che a questo frammento non può essere attribuito un preciso valore diagnostico ai fini dell'identificazione. Ad esempio esso, nel caso del tes-

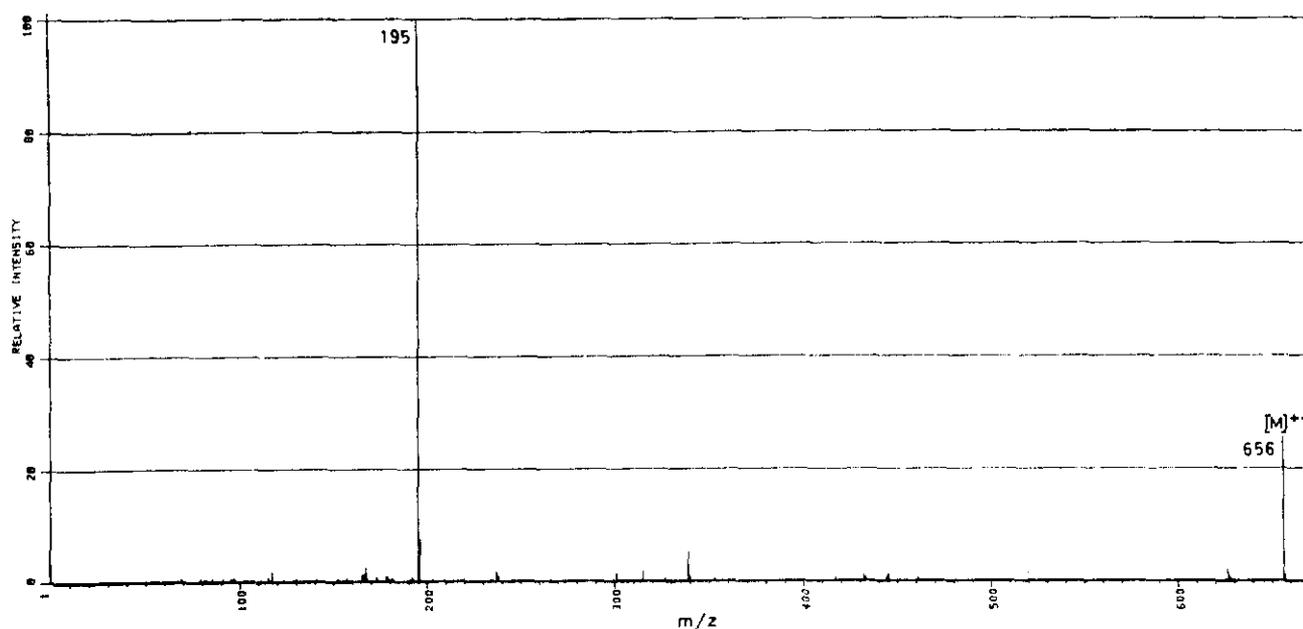


FIG. 1. - Spettro di massa del pentafluorobenzoil derivato del DES di riferimento

suto renale, oltre ad essere situato in un tratto dello spettro dove sono presenti numerosi frammenti ad intensità più o meno elevata, non è risultato caratteristico per il perfluoro estere del DES. È stato da noi osservato infatti che il frammento in questione può formarsi anche da sostanze naturali proprie del tessuto, ancora presenti nella soluzione finale contenente il derivato. Secondo alcuni Autori [1], questo particolare frammento può essere originato anche dallo stesso cloruro del perfluoro acido impiegato per la reazione di formazione del derivato, cosa che non è stata notata nelle condizioni sperimentali da noi impiegate, come risulta dimostrato dalla verifica della prova in bianco dei soli reattivi.

Ad illustrazione di quanto sopra menzionato, nella Fig. 2 viene riportato lo spettro di massa ottenuto per

un campione di rene di vitello, proveniente da un animale sicuramente non trattato, sottoposto in parallelo a tutto il procedimento di estrazione e di derivatizzazione, che può essere considerato come una prova in bianco, per questo tessuto, dell'intero procedimento.

Nella Fig. 3 viene riportato lo spettro di massa ottenuto, dopo opportuna correzione per il fondo, per un campione di rene di vitello nel quale, mediante cromatografia su strato sottile, era stata messa in evidenza la presenza del DES ad un livello di 10 ppb circa. Tale valutazione era stata effettuata in modo semiquantitativo sulla lastra stessa mediante confronto dell'intensità della fluorescenza delle macchie del DES (cis e trans) nel campione con quella delle macchie del DES di riferimento, tenuto conto del recupero medio del procedimento.

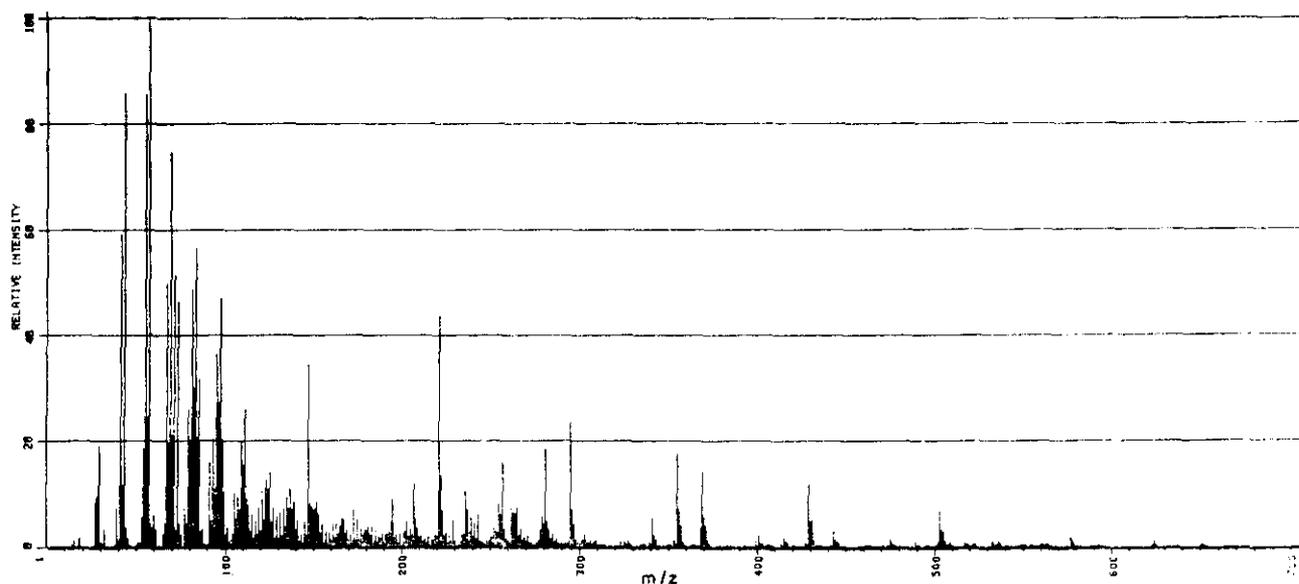


FIG. 2. - Spettro di massa ottenuto per un campione di rene di vitello proveniente da un animale non trattato con DES (prova in bianco dell'intero procedimento)

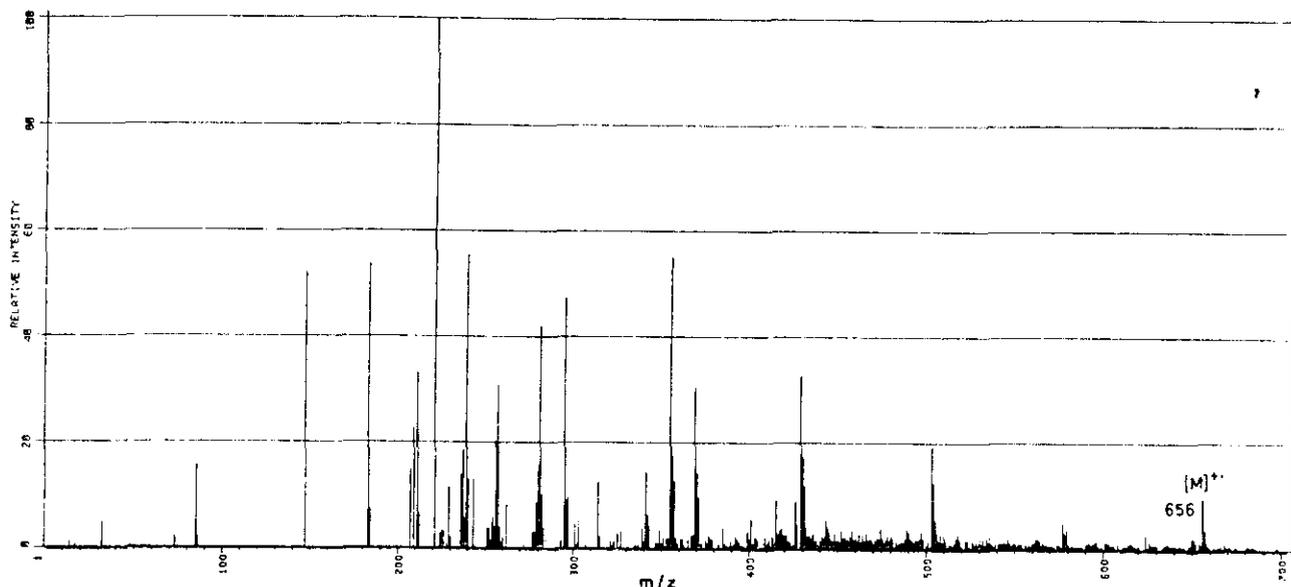


FIG. 3. - Spettro di massa ottenuto per un campione di rene di vitello nel quale era stata messa in evidenza la presenza del DES mediante HPTLC: risulta presente lo ione molecolare a  $m/z$  656 dovuto al DES (come pentafluorobenzoil derivato)

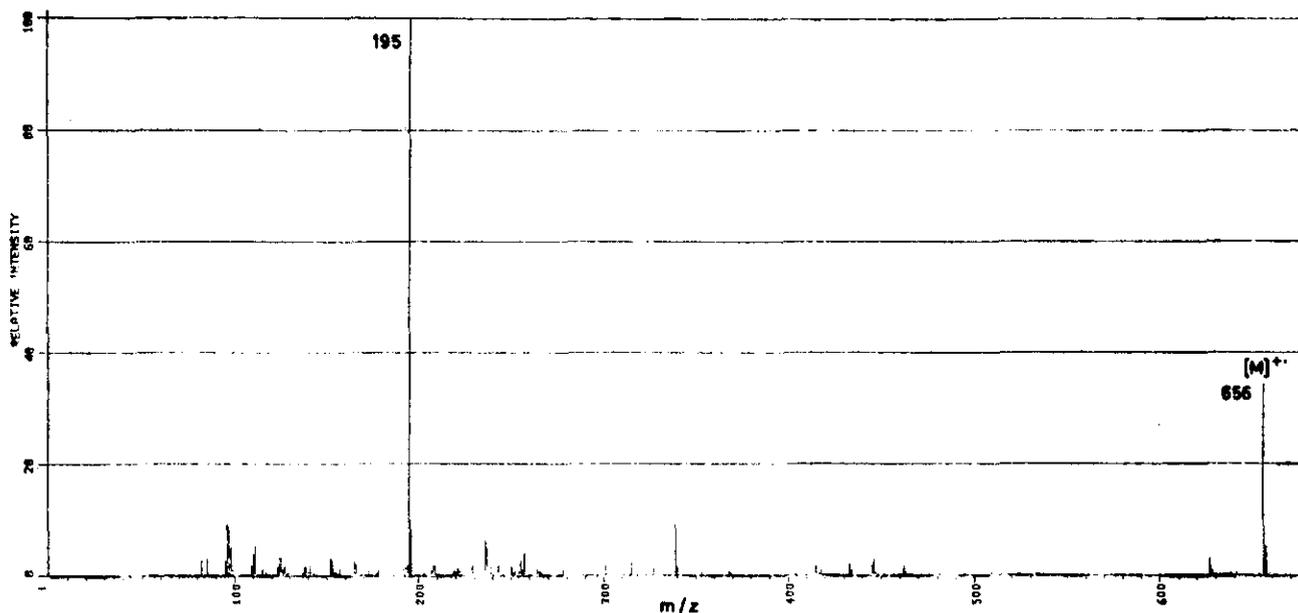


FIG. 4. - Spettro di massa ottenuto per un campione di prodotto omogeneizzato a base di carne nel quale era stata messa in evidenza la presenza del DES mediante HPTLC: sono presenti lo ione molecolare a  $m/z$  656 e lo ione a  $m/z$  195 dovuti al DES (come pentafluorobenzoil derivato)

Infine nella Fig. 4 viene mostrato lo spettro di massa ottenuto per un campione di prodotto omogeneizzato nel quale, mediante la cromatografia su strato sottile, era stato possibile mettere in evidenza il DES ad un livello di 20 ppb circa, mediante la tecnica semiquantitativa più sopra indicata. In questo spettro risultano evidenti sia lo ione molecolare a  $m/z$  656, sia il frammento ionico a  $m/z$  195.

Il procedimento qui proposto per la conferma della presenza dei residui di DES in tessuti animali, come tali o contenuti in preparati carnei, potrebbe essere

con vantaggio impiegato anche per accertare la presenza del diestrogeno, un altro composto di tipo stilbenico impiegato come anabolizzante, il quale dà per il corrispondente derivato uno spettro di massa caratterizzato da uno ione molecolare a  $m/z$  654, di intensità sufficientemente elevata.

Si ringrazia il Prof. Luigi Boniforti, del Laboratorio di Tossicologia dell'Istituto Superiore di Sanità, per il suo aiuto nella spettrometria di massa.

Questo lavoro è stato realizzato con il contributo del Progetto Finalizzato del CNR "Chimica Fine e Secondaria".

Ricevuto il 15 marzo 1982.

Accettato il 14 aprile 1982.

## BIBLIOGRAFIA

1. LAITEM, L., GASPAR, P. & BELLO, I. 1978. Stable derivatives for the gas chromatographic determination of synthetic anabolic stilbene residues (diethylstilbestrol, dienestrol and hexestrol) in meat and organs of treated cattle at the sub-parts per billion (10<sup>9</sup>) level. *J. Chromatogr.* **156**: 267-273.
2. JARC, H., RUTTNER, O. & KROCZA, W. 1977. The quantitative detection of estrogens and antithyroid drugs by thin-layer and high-performance thin-layer chromatography in animal tissue. *J. Chromatogr.* **134**: 351-358.
3. VERBEKE, R. 1979. Sensitive multi-residue method for detection of anabolics in urine and in tissues of slaughtered animals. *J. Chromatogr.* **177**: 69-84.
4. VERBEKE, R. 1979. Method of analysis for detecting anabolic residues in tissues of slaughter animals. Documento CEE 2582/VI/79-EN.
5. SMETS, F. & VERSCHAEREN, A. 1979. Chromatographic purification and separation of anabolics in biological extracts on hydroxyalkoxypropyl-Sephadex (Lipidex). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **169**: 32-35.
6. SMITH, M. R. & FRISCHKORN, C. G. B. 1980. Trace determination of some phenolic growth-promoting hormones in meat by high-performance liquid chromatography with voltammetric detection. *Fresenius Z. Anal. Chem.* **301**: 220-223.
7. RICHOU-BAC, L., MOLLET, M. F., BOURSIER, B. & CUMONT, G. 1976. Recherche des oestrogènes par radioimmunologie dans le plasma et les tissus des jeunes bovins. *Bull. Acad. Vet. de France.* **49**: 409-415.
8. HOFFMANN, B. & OETTEL, G. 1976. Radioimmunoassays for free and conjugated trienbolone and for trienbolone acetate in bovine tissue and plasma samples. *Steroids.* **27**: 509-523.
9. HOFFMANN, B. & LASCHÜTZ, W. 1980. Development of a radioimmunoassay for detection of diethylstilbestrol in blood plasma and edible tissues of cattle. *Arch. Lebensmittelhyg.* **31**: 105-111.
10. HOLLERER, G. & JAHR, D. 1975. Detection of oestrogens in bovine liver by combined gaschromatography-mass spectrometry. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **157**: 65-69.
11. DAY E. W., VANATTA, L. E. & SIECK, R. F. 1975. The confirmation of diethylstilbestrol residues in beef liver by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Ass. Offic. Anal. Chem.* **58**: 520-524.
12. STAN, H. J. & ABRAHAM, B. 1980. Determination of residues of anabolic drugs in meat by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **195**: 231-241.