

# CHIMICA DELLE SOSTANZE ORGANICHE NATURALI



Prof. Claudio Trapella  
Dispense del corso di Chimica delle Sostanze Organiche Naturali  
A.A. 2016-2017  
trap@unife.it



# INDICE

|   |   |           |
|---|---|-----------|
|    | <b>1. INTRODUZIONE</b>  | <b>1</b>  |
|    | <b>2. METABOLISMO PRIMARIO E SECONDARIO</b>   | <b>9</b>  |
|    | <b>3. TEORIE BIOGENETICHE E BIOSINTETICHE</b>   | <b>11</b> |
|   | <i>Somministrazione di un precursore</i>  | 14        |
|   | <i>Esami sui metaboliti marcati</i>   | 15        |
|    | <b>4. TERPENI</b>   | <b>16</b> |
|   | <i>Isoprenoidi</i>  | 16        |
|   | <i>Formazione delle unità isopreniche</i>   | 17        |
|   | <i>Ciclizzazione delle catene isopreniche</i>   | 20        |
|    | <b>5. MONOTERPENI</b>   | <b>22</b> |
|   | <i>Biosintesi dei monoterpeni</i>   | 22        |
|   | <i>Monoterpeni che contribuiscono all'aroma</i>   | 27        |
|    | <b>6. SESQUITERPENI</b>   | <b>36</b> |
|   | <i>Ipotesi biogenetiche di scheletri sesquiterpenici a partire da TTFPP</i>   | 38        |
|   | <i>Ipotesi biogenetiche di scheletri sesquiterpenici a partire da TCFPP</i>   | 40        |
|   | <i>Teorie biogenetiche dei composti ossigenati</i>  | 44        |
|   | <i>Biogenesi di composti sesquiterpenici con un anello <math>\alpha</math>-metilen-<math>\gamma</math>-lattionico</i> | 47        |
|   | <i>Artefatti dovuti ai metodi di isolamento dei metaboliti secondari</i>  | 50        |
|  | <b>7. DITERPENI</b>   | <b>51</b> |
|   | <i>Tassolo</i>  | 56        |
|  | <b>8. TRITERPENI E STEROIDI</b>   | <b>59</b> |
|   | <i>Formazione del precursore</i>  | 59        |
|   | <i>Triterpeni tetraciclici</i>  | 61        |
|   | <i>Steroidi e steroli</i>   | 63        |
|   | <i>Ormoni steroidei</i>   | 67        |
|   | <i>Acidi biliari</i>  | 69        |
|   | <i>Fitosteroli</i>  | 72        |
|   | <i>Glicosidi cardioattivi</i>   | 76        |
|   | <i>Triterpeni pentaciclici</i>  | 81        |
|   | <i>Saponine triterpenoidiche</i>  | 82        |
|   | <i>Glicosidi</i>  | 84        |
|  | <b>9. ALCALOIDI</b>   | <b>87</b> |
|   | <i>Definizione</i>  | 87        |
|   | <i>Biosintesi</i>   | 88        |
|   | <i>La basicità degli alcaloidi</i>  | 89        |
|   | <i>Alcaloidi derivanti da ornitina e lisina</i>   | 90        |
|   | <i>Tipi di alcaloidi</i>  | 93        |
|   | <i>Pirrolidinici</i>  | 93        |
|   | <i>Piperidinici</i>   | 94        |
|   | <i>Tropanici</i>  | 95        |

|   |  |            |
|---|--|------------|
|   | <i>Chinolinici</i>                           | 97         |
|   | <i>Isochinolinici</i>                        | 100        |
|   | <i>Morfinanici</i>                           | 102        |
|   | <i>Indolici</i>                              | 105        |
|    | <b>10. LIPIDI</b>                            | <b>109</b> |
|   | <i>Acidi grassi</i>                          | 109        |
|   | <i>Biosintesi degli acidi grassi</i>         | 110        |
|   | <i>Strutture di alcuni acidi grassi</i>      | 112        |
|   | <i>Proprietà fisiche degli acidi grassi</i>  | 115        |
|   | <i>Proprietà chimiche degli acidi grassi</i> | 115        |
|   | <i>Acilgliceroli e fosfolipidi</i>           | 119        |
|   | <i>Glicerofosfolipidi</i>                    | 120        |
|   | <i>Sfingolipidi</i>                          | 123        |
|   | <i>Cere</i>                                  | 124        |
|    | <b>11. FLAVONOIDI</b>                        | <b>125</b> |
|   | <i>Definizione e classificazione</i>         | 125        |
|   | <i>Importanza dei flavonoidi</i>             | 127        |
|   | <i>Attività antiossidante dei flavonoidi</i> | 130        |
|   | <i>Biosintesi dei flavonoidi</i>             | 133        |
|   | <i>Isoflavonoidi</i>                         | 142        |
|  | <b>12. ANTRACHINONI</b>                      | <b>145</b> |

# 1. INTRODUZIONE



La chimica delle sostanze organiche naturali si occupa dell'origine di "composti naturali" cioè di composti organici che sono caratteristici di un organismo o di organismi correlati. L'interesse verso i composti naturali è nato praticamente con la chimica organica. Infatti da sempre gli uomini si sono rivolti alla natura per avere un aiuto farmacologico o per capire meglio i processi biochimici. Con lo svilupparsi di tecniche di estrazione ed isolamento più valide, i chimici organici sono stati in grado di ottenere queste sostanze allo stato unitario, e spesso, nonostante la totale mancanza di tecniche spettroscopiche, di identificarne la struttura.

Con il fiorire della biochimica nel XX secolo è stato possibile stabilire per molti prodotti naturali il ruolo che giocano nella vita di un organismo, sia esso un microbo, una pianta, un fungo o un mammifero. Così ad esempio ritroveremo gli acidi grassi come componenti delle strutture lipidiche, gli  $\alpha$ -amminoacidi come costituenti delle proteine e le purine e le pirimidine come unità base degli acidi nucleici. Come pure, l'acido cictrico e l'acido malico, sostanze isolate alla fine del '700 da Scheele, giocano un ruolo importante nel metabolismo dei carboidrati.

Prodotti come questi sono ubiquitari in natura e vengono normalmente classificati come "metaboliti primari". In contrapposizione a questi composti, che tutto sommato sono un numero piuttosto limitato, sono stati isolati ed identificati negli anni, un'ampia gamma di composti quali gli alcaloidi, i terpeni, i polieni, i fenoli (etc.), per i quali è difficile stabilire un ruolo preciso nella vita degli organismi. A causa di un "apparente" ruolo secondario di queste sostanze nella vita degli organismi, questi composti sono stati definiti "*metaboliti secondari*". In realtà la distinzione tra metabolita primario e secondario non è così netta. Ad esempio la lignina, presente nelle pareti delle piante, è classificato come metabolita secondario, anche se è importante per lo sviluppo dei caratteri vascolari della pianta; o anche gli steroidi che sono classificati come metaboliti secondari, sebbene sia ben noto il loro ruolo biologico.

Una prima ipotesi sulla differenza funzionale tra metaboliti primari e secondari è stata fatta quando si è notato che alcuni precursori (detti anche mattoni costitutivi) dei metaboliti primari e secondari erano gli stessi. Così per esempio il glucosio (uno zucchero molto importante) è il precursore necessario per biosintetizzare l'acido shikimico, precursore sia di metaboliti primari come gli amminoacidi aromatici fenilalanina e tirosina, che di metaboliti secondari come ad esempio la lignina. Gli amminoacidi sono a loro volta i mattoni essenziali per la biosintesi delle proteine (metaboliti primari), ma anche di metaboliti secondari quali gli alcaloidi. Il testosterone ad esempio

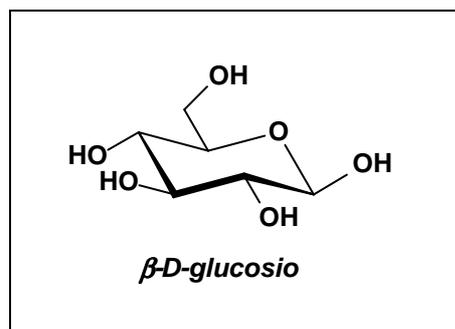
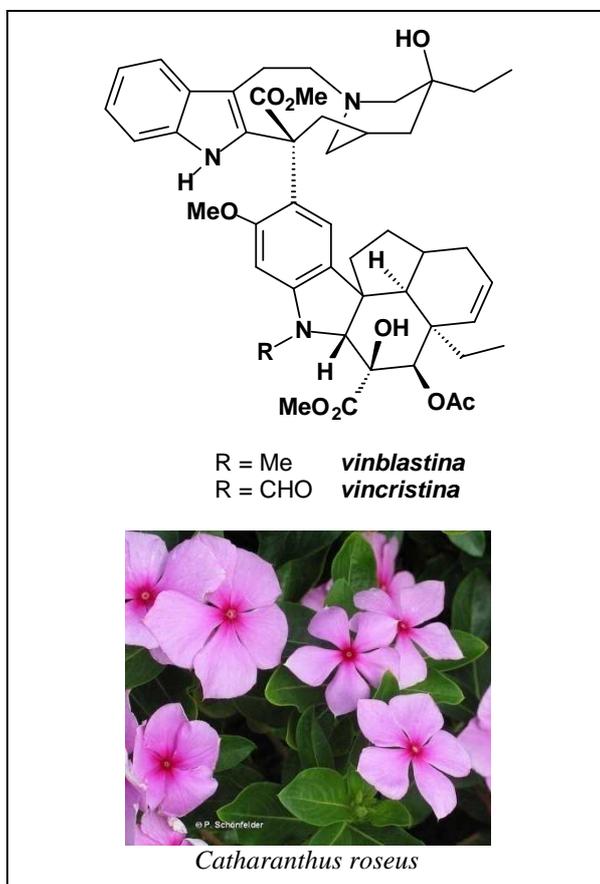
anche se di limitata rilevanza, ha una attività ormonale vitale; la nicotina invece, che si ricava dal tabacco e da poche altre specie, ha un ruolo importante come deterrente nutrizionale per gli insetti. Se i metaboliti secondari sembrano apparentemente privi di un ruolo preciso per la vita degli organismi, allora ci si dovrebbe chiedere come mai gli organismi sprechino energia per biosintetizzare prodotti inutili.

Il metabolismo cellulare è un complesso insieme di reazioni chimiche il cui duplice scopo è quello di fornire energia e di creare nuovo materiale cellulare. In genere la produzione di energia o di nuovi metaboliti ha luogo solo quando l'organismo lo richiede. Ciò significa che i metaboliti primari vengono generalmente prodotti ed utilizzati e non vengono immagazzinati. I metaboliti secondari invece possono venire immagazzinati anche in grande quantità. Da queste osservazioni è nata l'idea che il metabolismo secondario si sviluppa quando il normale metabolismo dell'organismo è variato e i substrati primari vengono trasformati in complesse ed insolite strutture (metaboliti secondari).

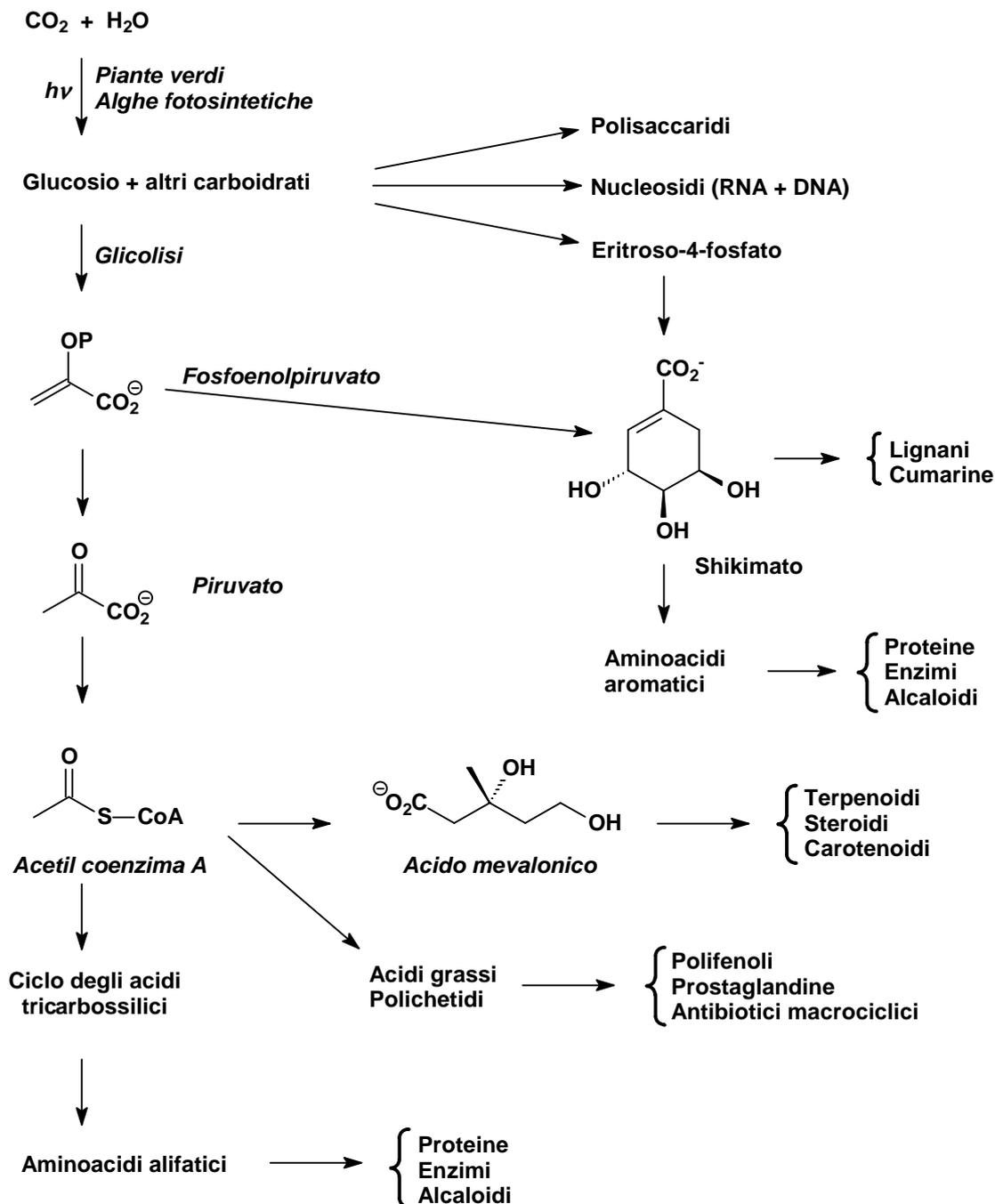
In realtà oggi si è visto che non tutti i metaboliti secondari sono in realtà "inutili", e per alcuni di essi è stata riscontrata una funzione importante per la difesa e lo sviluppo dell'organismo. Un esempio può essere quello dei monoterpeni, molti dei quali giocano un ruolo importante per la difesa delle piante nei confronti, ad esempio, dell'attacco da parte di microrganismi.

Il motivo per cui le “sostanze naturali” riescano ancora a destare un così largo interesse da parte dei chimici organici, deriva probabilmente dal fatto che, numerose tra esse, possiedono interessanti attività biologiche. Contemporaneamente sono stati affinati alcuni concetti di base che costituivano la struttura portante delle ipotesi biogenetiche sulla formazione di questa classe di composti.

Sono ormai un centinaio di anni che Emil Fischer annunciò la sua ipotesi sulla struttura del **glucosio** (1891). Il complesso di alcaloidi **vincristina** e **vinblastina** (potenti agenti antitumorali), sono stati invece caratterizzati nel 1964. Questi composti sono ovviamente tutti prodotti naturali: il glucosio è un composto ubiquitario ed essenziale per la vita, gli altri due composti sono prodotti in piccole quantità solo da poche piante (*Catharanthus roseus*) e non hanno una apparente funzione in esse.



Nonostante le grandi differenze strutturali le due classi di prodotti sono però collegate attraverso una complessa via metabolica. Nello schema 1.1 vengono rappresentate le numerose interconnessioni metaboliche tra le varie classi di prodotti naturali.



*Schema 1.1. rappresentazione delle connessioni tra varie vie metaboliche.*

Anche se il legame tra **glucosio** ed il complesso di alcaloidi **vinblastina** e **vincristina** è qualcosa di tenue, si può notare dallo schema come i carboidrati diano origine, passando per lo **shikimato**, agli aminoacidi aromatici (nel caso specifico il **triptofano**) ed al precursore terpenico **acido mevalonico**. Questi due precursori vengono utilizzati per gran parte della sintesi di vinblastina e vincristina.

Come già anticipato, sebbene la suddivisione in **metaboliti primari** (ubiquitari e sicuramente

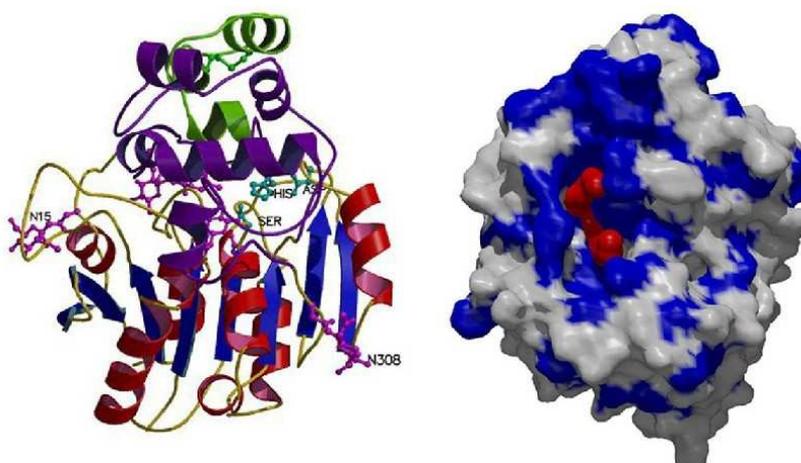
essenziali per la vita) e **metaboliti secondari** (occorrenza ristretta ed una apparente inutilità) sia molto utile, spesso risulta arbitraria e risulta più utile apprezzare una classificazione sulla base delle varie interconnessioni (chimica, biochimica e metabolica) tra le varie classi di prodotti naturali.

Le vie metaboliche che portano a questi prodotti, e successivamente ai loro derivati, sono fondamentalmente processi di tipo enzimatico, in cui sono appunto coinvolti enzimi (molecole di natura proteica) ed i cofattori necessari al loro funzionamento.

Ci sono due maggiori classi di proteine:

- **proteine strutturali** (cheratine della pelle o collagene dei tendini. Sono di solito fibrose).
- **Enzimi** (chimotripsina, tripsina, etc. Hanno forma globulare).

Un **enzima** (Figura 1.1) è una proteina in grado di accelerare una specifica reazione chimica senza intervenire sui processi energetici che ne regolano la spontaneità. Chimicamente si parla di un catalizzatore biologico.



**Figura 1.1.** Struttura tridimensionale della lipasi pancreatica umana.

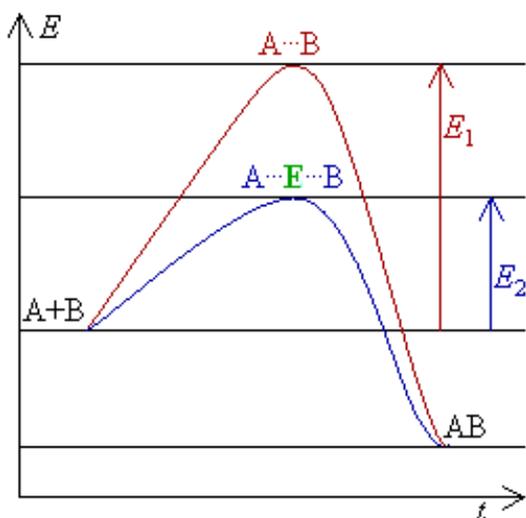
**Enzima** significa *nel lievito*, in quanto nel 1897 fu ottenuto per la prima volta un processo metabolico (la fermentazione alcolica) *in vitro* utilizzando un estratto di lievito.

L'enzima partecipa attivamente alla reazione: il *substrato* (1a/e molecola/e su cui agisce l'enzima) va ad incastrarsi nel *sito attivo* (la parte di enzima in cui avvengono le reazioni), formando un *complesso*. Avvenuta la reazione, il prodotto viene allontanato e l'enzima rimane disponibile per agire nuovamente. Una singola molecola enzimatica è in grado di catalizzare in un secondo le reazioni di decine di migliaia di molecole identiche, rendendo gli enzimi efficaci anche in quantità minime. In generale i processi chimici che avvengono in tale ambito sono meccanicisticamente

simili a quelli che possono essere compiuti in laboratorio, con la differenza che le reazioni enzimatiche sono 10-12 volte più veloci.

A differenza dei catalizzatori inorganici, gli enzimi presentano un'elevatissima specificità, catalizzando solo una reazione o pochissime reazioni simili poiché il sito attivo interagisce con i reagenti in modo *stereospecifico* (è sensibile anche a piccolissime differenze della struttura tridimensionale) o comunque altamente stereoselettivo.

L'accelerazione e la stereospecificità di questi processi sono il diretto risultato delle modalità con il quale l'enzima ed il substrato interagiscono. Substrati, aminoacidi partecipanti specifici e cofattori necessari (piccole molecole organiche o ioni metallici) sono tenuti in uno stato conformazionale di pseudotransizione tale da permettere una riduzione dell'energia di attivazione delle reazioni assicurando la stereospecificità del processo (Figura 1.2).



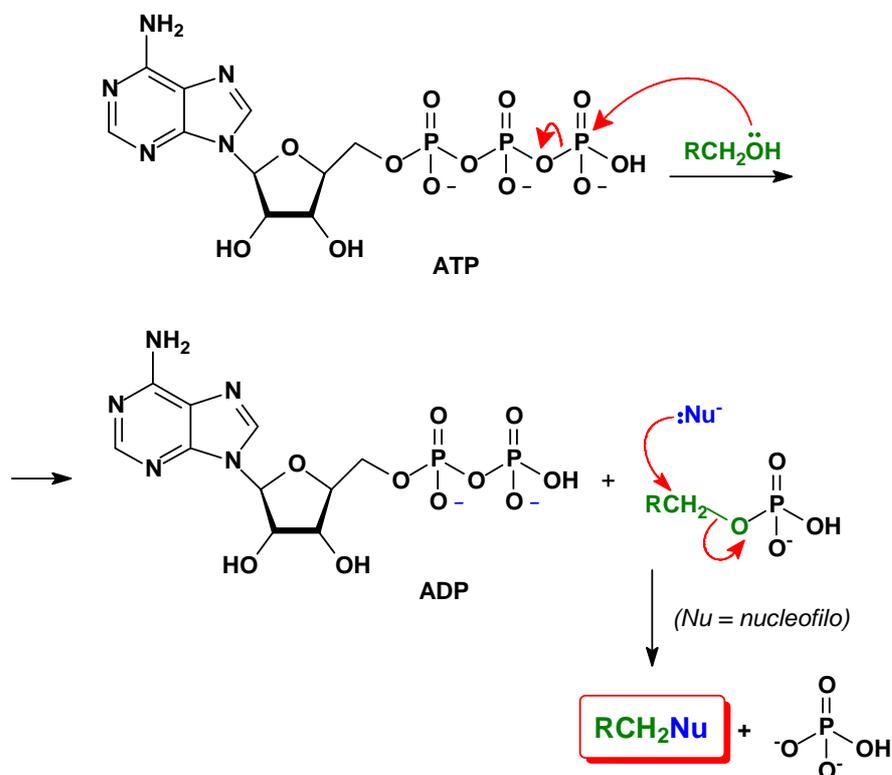
**Figura 1.2.** Diagramma di una reazione catalitica che mostra l'energia (E) richiesta a vari stadi lungo l'asse del tempo (t). I substrati (A e B) normalmente necessitano di una notevole quantità di energia ( $E_1$ ) per giungere allo stato di transizione  $A\cdots B$ , onde reagire per formare il prodotto (AB). L'enzima (E) crea un microambiente nel quale A e B possono raggiungere lo stato di transizione ( $A\cdots E\cdots B$ ) più facilmente, riducendo così la quantità d'energia richiesta ( $E_2$ ). Essendo più facile arrivare a uno stato energetico minore la reazione può avere luogo più frequentemente e di conseguenza la velocità di reazione sarà maggiore.

Molti enzimi contengono molecole non proteiche che partecipano alla funzione catalitica. Queste molecole, che si legano spesso all'enzima nelle vicinanze del sito attivo, vengono chiamate *cofattori* e sono divise in due categorie, sulla base del loro legame con l'enzima: i *gruppi prostetici* e i *coenzimi*. I gruppi prostetici sono strettamente legati agli enzimi, generalmente in modo permanente. I coenzimi sono legati piuttosto debolmente agli enzimi (una singola molecola di coenzima può associarsi con enzimi diversi) e servono come portatori di piccole molecole da un enzima ad un altro. La maggior parte delle vitamine ad esempio, composti che gli esseri umani e altri animali non sono in grado di sintetizzare autonomamente, sono coenzimi.

Sono stati identificati numerosi cofattori, ma due sono di particolare importanza:

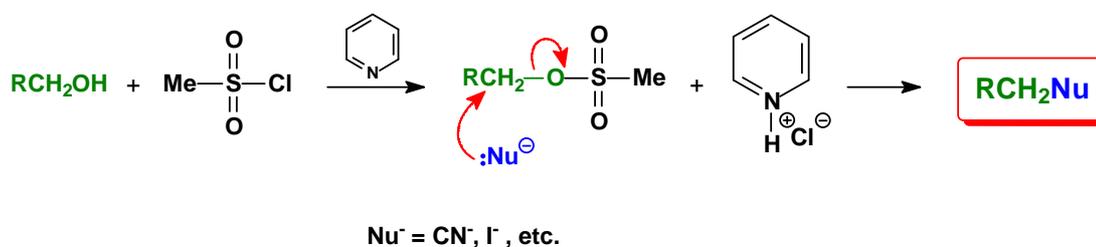
**adenosina trifosfato (ATP) e nicotinamide adenina dinucleotide fosfato (NADPH).**

Il meccanismo di azione dell'ATP (schema 1.2) coinvolge l'attivazione di una molecola di substrato per la sostituzione nucleofila. Normalmente una funzione idrossilica è convertita nel corrispondente fosfato o pirofosfato, ottimi gruppi uscenti, che poi subiscono sostituzione nucleofila.



**Schema 1.2.** Attivazione da parte dell'ATP di un substrato ( $\text{RCH}_2\text{OH}$ ) come fosfato e successiva reazione con un nucleofilo (Nu).

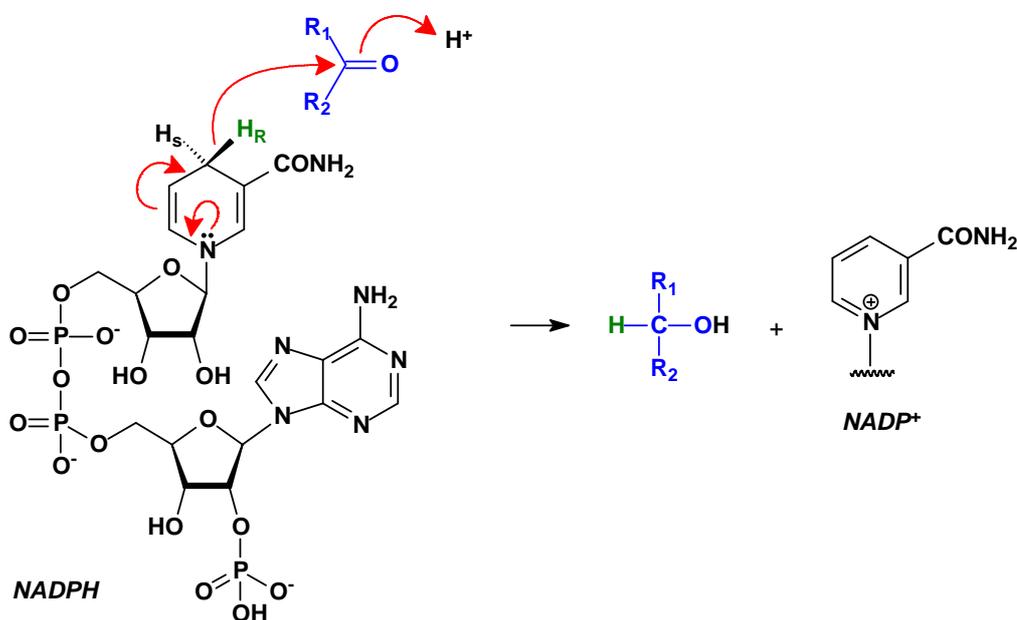
Questo processo è familiare a tutti coloro che hanno sintetizzato metansolfonati o toluensolfonati per la conversione di un alcol in ioduro, nitrile, etc. (Schema 1.3).



**Schema 1.3.**

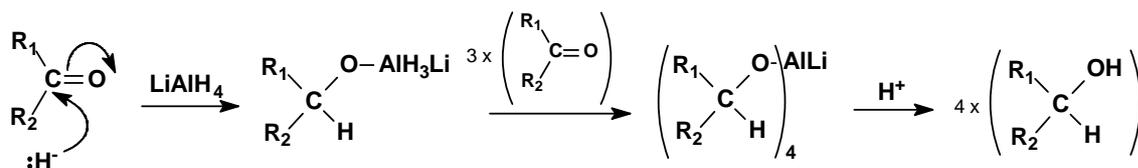
Il cofattore **NADPH** è un mediatore di numerosi processi biosintetici riduttivi; questi processi

prevedono un meccanismo di trasferimento di uno ione idruro dal NADPH al substrato che deve subire riduzione (schema 1.4).



Schema 1.4.

Ancora una volta questa chimica è analoga alla chimica di laboratorio, infatti le riduzioni effettuate con litio alluminio idruro, sodio boro idruro e altri reagenti donatori di idruro, avvengono con addizione di idruro seguita da addizione di un protone in seguito a work-up con acqua (Schema 1.5).



Schema 1.5.

Una delle maggiori differenze del processo enzimatico su quello di laboratorio, è che i due idrogeni del NADPH sono prochirali, e le riduzioni mediate dai cofattori sono generalmente stereospecifiche; questo significa che gli enzimi deputati ad una specifica riduzione possono utilizzare selettivamente l'idrogeno  $H_R$  o  $H_S$ .

## 2. METABOLISMO PRIMARIO E SECONDARIO



Negli organismi viventi i composti chimici sono sintetizzati e degradati per mezzo di una serie di reazioni, ciascuna delle quali viene effettuata tramite un enzima. Questi processi sono conosciuti in generale come metabolismo e comprendono il catabolismo (degradazione) e l'anabolismo (sintesi). Tutti gli organismi posseggono vie metaboliche simili, attraverso le quali sintetizzano ed utilizzano componenti chimici essenziali: zuccheri, aminoacidi, acidi grassi, nucleotidi, e polimeri derivanti da essi (polisaccaridi, proteine, lipidi, RNA e DNA). Questo è il **metabolismo primario** ed i composti sopra elencati, essenziali per la sopravvivenza di un organismo, sono metaboliti primari. Molti organismi utilizzano anche altre vie metaboliche, attraverso le quali producono composti che in genere non sono di apparente utilità, ovvero i cosiddetti metaboliti secondari; le vie biosintetiche e l'utilizzo di queste molecole costituiscono quindi il **metabolismo secondario**.

Le vie metaboliche secondarie sono il risultato dell'impostazione genetica dell'organismo, tanto quanto quelle primarie, ma probabilmente sono attivate solo durante particolari condizioni della crescita e dello sviluppo, o durante periodi di "stress" causati da carenze nutrizionali o attacchi microbici. In realtà la linea di separazione tra metabolismo primario e secondario è abbastanza sfumata, presentando vari collegamenti: il metabolismo primario infatti dà luogo alla formazione di un certo numero di piccole molecole, che sono poi utilizzate come "materiale di partenza" in molte vie metaboliche secondarie importanti. (vedi schema 1 a pag. 4)

I mattoni biosintetici per i metaboliti secondari derivano quindi da metaboliti primari provenienti da processi fondamentali quali la fotosintesi, la glicolisi ed il ciclo di Krebs.

Sebbene il numero di mattoni biosintetici necessari è sorprendentemente piccolo, una grande varietà di molecole può essere costruita con esse.

I mattoni biosintetici di gran lunga più importanti nella biosintesi dei metaboliti secondari, da cui derivano anche i nomi delle rispettive vie, sono i seguenti:

- a) l'**acido shikimico** (o **shikimato**), il precursore di molti composti aromatici inclusi gli aminoacidi aromatici, l'acido cinnamico ed alcuni polifenoli
- b) gli **aminoacidi** che portano alla formazione di alcaloidi, ed antibiotici peptidici comprendenti penicilline e cefalosporine
- c) l'**acetato** che è il precursore di poliacetileni, prostaglandine, antibiotici macrociclici, polifenoli, terpeni isoprenoidi, steroidi e carotenoidi, attraverso due vie biosintetiche completamente separate.

Oltre a questi, nella biosintesi delle sostanze naturali, sono usati altri mattoni biosintetici basati su amminoacidi (peptidi, proteine, alcaloidi, antibiotici). E' importante rendersi conto che i metaboliti secondari possono essere sintetizzati combinando molti mattoni biosintetici dello stesso tipo, oppure usando una miscela di mattoni biosintetici diversi. Questo accresce la varietà strutturale, e di conseguenza rende piuttosto difficile una suddivisione basata esclusivamente sulle vie biogenetiche. Ad esempio una tipica sostanza naturale può essere prodotta combinando elementi delle vie dell'acetato, del mevalonato e dello shikimato; altri metaboliti secondari contengono una o più unità zuccherine nella loro struttura (glucosio, ribosio o zuccheri sostanzialmente modificati ed insoliti). Questo dimostra la grande complessità del sistema biologico, all'interno del quale esistono numerosissime possibilità biosintetiche, di cui alcune sono affini a tutte le specie viventi, mentre altre sono specifiche solo per una o poche specie, e vengono rappresentate principalmente dai metaboliti secondari.

### 3. TEORIE BIOGENETICHE E BIOSINTETICHE



L'origine dei prodotti naturali è sempre stato uno dei problemi più grandi del chimico organico. Solo negli ultimi trenta anni, con l'avvento dei traccianti isotopici e delle metodologie per monitorarli, si è avuto un grande progresso nello studio sperimentale della biosintesi dei prodotti naturali. Nei decenni scorsi la biosintesi delle sostanze naturali è stato un fertile campo per la speculazione e la sperimentazione. Eminentissimi nomi, come ad esempio Robinson, Ruzicka, Barton, Birch, sono stati associati alla formulazione di schemi biogenetici basati su una deduzione a priori. Questo era più che altro un gioco intellettuale che portava alle "teorie biogenetiche".

La validità di queste teorie è stata successivamente ampiamente dimostrata sia con studi in vivo sia mediante sintesi chimiche basate su analogie biogenetiche (sintesi biomimetiche). Si è assunto che i prodotti naturali complessi sono un assemblaggio di molecole più semplici che derivano da comuni metaboliti cellulari.

Il riconoscimento di queste relazioni strutturali è stato alla base delle speculazioni biogenetiche. Esempi di queste deduzioni sono l'isoprene e la regola isoprenica, l'ipotesi dell'acetato e gli studi comparativi sugli alcaloidi.

Oggigiorno si è visto che i processi biosintetici di un gran numero di prodotti naturali utilizzano, in ultima analisi, un numero ristretto di intermedi del metabolismo primario, come il fosfoenolpiruvato, piruvato, acetyl-CoA, 3-fosfoglicerato, ossalacetato e gli aminoacidi che provengono da questi intermedi. Generalmente dopo aver ottenuto i necessari chiarimenti sulla struttura di un determinato metabolita secondario, è possibile ipotizzare la **biogenesi** da una particolare specie-precursore. Il passo successivo è l'applicazione di metodi in grado di dimostrare sperimentalmente gli schemi **biosintetici** che intervengono nella formazione di un determinato metabolita.

Da notare che i termini **biogenesi** e **biosintesi** non sono sinonimi: il concetto di **biogenesi** è relativo ad una ipotesi, ad esempio del percorso di un dato precursore verso un dato prodotto finale, mentre il concetto di **biosintesi** è relativo ad un dato sperimentale che ha permesso il riconoscimento di tutte, o gran parte, delle fasi e dei fattori, come ad es. gli enzimi coinvolti, che contribuiscono alla trasformazione di un precursore in un dato prodotto finale (processo biochimico).

Nello studio degli schemi biosintetici sono stati usati essenzialmente tre metodi:

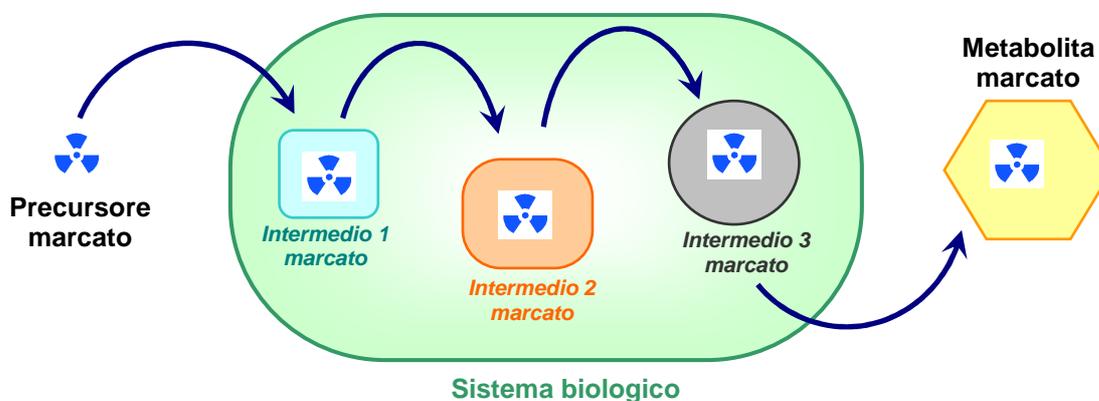
1. l'uso di composti marcati come traccianti,
2. l'uso in vitro di sistemi enzimatici estratti e purificati,
3. l'uso in vivo di organismi con stadi biosintetici bloccati (blocco endogeno causato da mutazioni genetiche\* o esogeno indotto da inibitori chimici).

\* La mutazione è in genere il risultato di un danno provocato da raggi-X, raggi-UV o da alcuni composti chimici che, agendo a livello del gene (es. DNA cromosomiale), porta alla produzione di un enzima aberrante. Così per esempio l'enzima che catalizza la conversione di un precursore **A** in intermedio **B**, potrebbe essere assente o insufficiente e quindi il metabolita **A** può accumularsi o seguire una via metabolica alternativa. Questo sarebbe il risultato ideale, ma molto spesso le mutazioni letali sono le più probabili, e perciò il metabolismo primario e secondario è talmente carente da non permettere nemmeno la sopravvivenza dell'organismo. In questo senso le ipotesi biogenetiche divengono dimostrazioni biosintetiche.

Il primo metodo ha sicuramente giocato un ruolo fondamentale per la determinazione di sequenze biosintetiche, sfruttando in modo adeguato un presunto precursore o intermedio "marcato" con uno specifico isotopo, che viene metabolizzato una volta introdotto nel ciclo biologico di un organismo. Marcare un precursore vuol dire sostituire un atomo che lo costituisce con un suo isotopo: tra i più usati troviamo il trizio ( $^3\text{H}$ ) ed il carbonio-14 ( $^{14}\text{C}$ ) (Figura 3.1).

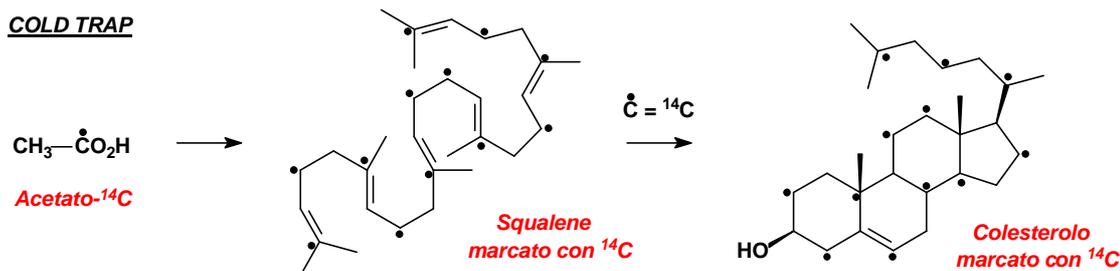
A questo punto il metabolita oggetto della ricerca viene isolato, purificato ed analizzato per valutarne il contenuto isotopico; se si è verificata l'incorporazione dell'isotopo, è ragionevole pensare ad una relazione tra precursore e metabolita, ed in seguito sarà possibile suggerire una via biosintetica per tale trasformazione.

Da notare che è possibile isolare anche degli intermedi che hanno incorporato la molecola del precursore marcato e che a loro volta si comportano da precursori per il metabolita studiato.



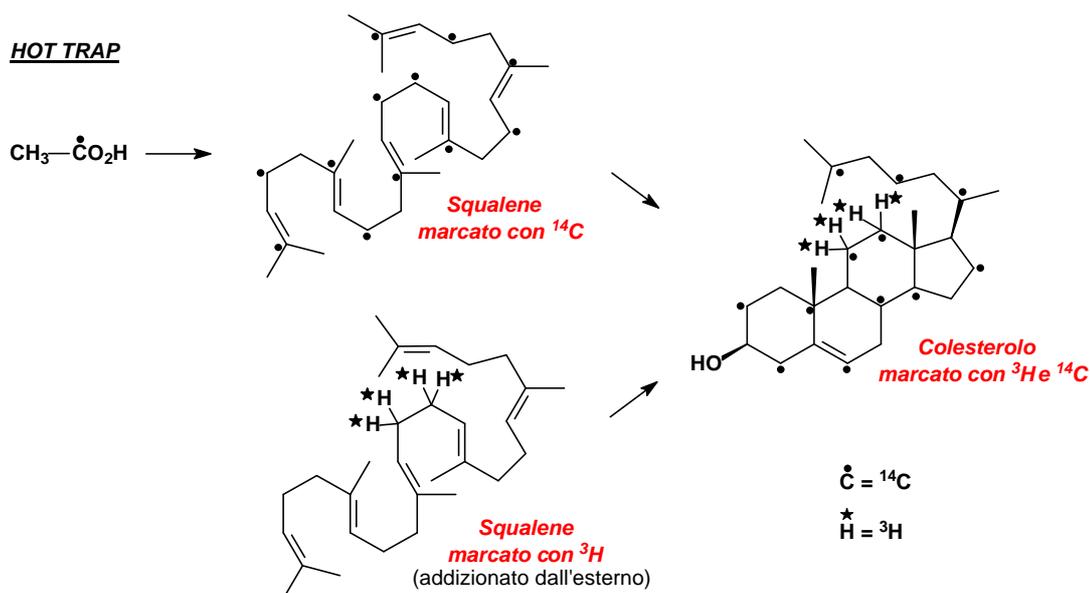
**Figura 3.1.** Schematizzazione delle trasformazioni di un precursore marcato.

Questa tecnica prevede diverse modalità operative, come ad esempio la “cold trap” e la “hot trap”. La “cold trap” (Schema 3.1) è stata usata ad esempio da Bloch per dimostrare che lo squalene è un intermedio tra acetato e colesterolo e prevede l’uso di un precursore contenente un solo tipo di isotopo. In questo caso il precursore marcato era costituito da acetato marcato con il  $^{14}\text{C}$ . Nello schema seguente si osserva la formazione di squalene marcato che a sua volta dà origine al colesterolo marcato.



Schema 3.1.

La “hot trap” (Schema 3.2) prevede invece l’introduzione di un presunto intermedio marcato con un isotopo, in un sistema che sta già utilizzando un precursore marcato con un altro isotopo. In questo caso il presunto intermedio è costituito dallo squalene marcato con trizio ( $^3\text{H}$ ) ed il precursore dall’acetato marcato con  $^{14}\text{C}$ . L’incorporazione di entrambi gli isotopi nel metabolita finale e dell’isotopo del precursore nel presunto intermedio, può essere così controllato con un singolo esperimento.



Schema 3.2.

Queste tecniche, sebbene molto importanti, incontrano due principali difficoltà:

- l'incorporazione di una percentuale di precursore marcato sufficientemente elevata, da rendere i risultati significativi
- la necessità di analizzare il metabolita marcato in modo da stabilire quali atomi sono stati marcati.

### ***Somministrazione di un precursore***

Un precursore marcato può essere somministrato all'organismo in toto o ad un suo estratto cellulare. In generale le piante incorporano l'agente marcato in piccola parte (spesso ancor meno di  $10^{-2}$ - $10^{-4}$  % del nutrimento totale), per il fatto che esso non riesce ad entrare nella via biosintetica o che è degradato lungo il percorso. Risultati migliori si sono ottenuti in genere con estratti cellulari e con colture batteriche o fungine (con incorporazione compresa tra l'1% ed il 10%).

Molti ricercatori hanno rivolto la loro attenzione all'uso di sistemi cellulari (ad esempio miscele di enzimi estratti da organismi) e alle colture di tessuti. Queste ultime sono di solito ottenute a partire da piccole porzioni di tessuto in crescita della pianta, in modo tale che diano luogo alla formazione di cellule indifferenziate del "callus" (callus cultures); esse conservano la capacità di produrre alcuni metaboliti secondari, ma perdono quella di produrne altri.

Un eventuale scopo commerciale di questa tecnica è di ottenere una linea cellulare che produca solamente alcuni alcaloidi o terpenoidi utili in medicina o in profumeria. Una estensione di questa metodica è invece la produzione di cloni dei geni che regolano la biosintesi di metaboliti secondari. Ciò, non solo permette la produzione su vasta scala di metaboliti secondari selezionati, ma offre anche l'interessante possibilità di sintetizzare metaboliti completamente nuovi, attraverso l'uso di cloni genici modificati (ingegneria genetica).

E' importante però considerare che la somministrazione di tutto ciò che porta alla produzione di grosse quantità di substrati artificiali, può alterare l'equilibrio dell'organismo. Inoltre, poiché molti metaboliti secondari sono isolati dopo la distruzione dell'organismo, non possiamo essere assolutamente certi che essi siano i metaboliti reali e non piuttosto dei prodotti di modificazioni chimiche che avvengono post mortem.

Per questi motivi i risultati ottenuti negli esperimenti biosintetici devono sempre essere interpretati con cautela e provenire possibilmente da più esperimenti diversificati tra loro.

## Esami sui metaboliti marcati

Prima di iniziare l'analisi è necessario un composto puro marcato isotopicamente. Sono stati ottenuti risultati erronei quando dei metaboliti, supposti puri, sono stati contaminati con piccole quantità di composti altamente radioattivi.

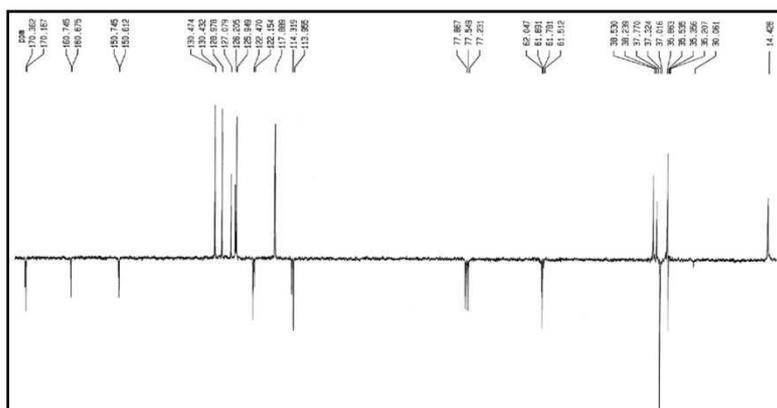
I radioisotopi impiegati comunemente sono il trizio ( $^3\text{H}$ ), che emette particelle  $\beta$  con un tempo di emivita di 12.1 anni ed il carbonio-14 ( $^{14}\text{C}$ ), anch'esso con emissione  $\beta$  e tempo di emivita di 5640 anni. I metaboliti radiomarcati sono in genere degradati per identificare l'atomo marcato.

A tal fine vengono impiegate tutte le più comuni reazioni di degradazione della chimica organica: ozonolisi, decarbossilazione termica o fotochimica, rottura dei legami ecc. Comunque ciascun passaggio degradativo riduce la quantità di materiale marcato necessario ai passaggi successivi, per cui è spesso impossibile completare una sequenza degradativa.

Il fatto di ottenere con difficoltà un campione completamente marcato quando vengono utilizzati  $^3\text{H}$  e  $^{14}\text{C}$ , è stato compensato in parte con l'introduzione della tecnica spettroscopia NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Questa tecnica ha avuto un enorme sviluppo in questi ultimi 20 anni e permette di osservare diversi tipi di atomi (C, F, H, P, etc.) tramite spettri che vengono registrati con una adatta strumentazione, sfruttando il particolare spin presentato da alcuni loro isotopi. Da questo punto di vista assume un ruolo determinante per la risoluzione delle problematiche sopra riportate, la possibilità di osservare ad esempio l'isotopo  $^{13}\text{C}$ .

Tale isotopo è presente in natura in quantità intorno all'1.1% e possiede uno spin del nucleo pari ad  $\frac{1}{2}$ , per cui si possono ottenere spettri NMR (Figura 3.2).

La degradazione dei composti marcati diventa allora mirata, dal momento che gli atomi di carbonio arricchiti isotopicamente ( $^{14}\text{C}$ ) possono essere localizzati per confronto tra gli spettri del composto marcato e quelli del composto presente in natura. Negli ultimi anni anche la spettroscopia NMR del deuterio ( $\text{D} = ^2\text{H}$ ) ha avuto per lo stesso motivo un grande risalto.



**Figura 3.2.** Esempio di uno spettro  $^{13}\text{C}$ -NMR ottenuto con un esperimento di tipo "jmod". Questo tipo di esperimento consente di differenziare i CH ed i  $\text{CH}_3$  (picchi positivi) dai  $\text{CH}_2$  e C-quaternari (picchi negativi).

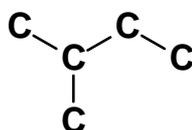
## 4. TERPENI



I terpeni sono una grande classe di composti presenti in natura come metaboliti secondari di piante e animali. Sono in genere classificati fra i lipidi non saponificabili, in quanto ne condividono molte proprietà, prima fra tutte quella di essere solubili in solventi poco polari, ed in virtù della loro origine biosintetica vengono anche definiti isoprenoidi. Essi si suddividono in varie sottoclassi quali ad esempio i monoterpeni, i sesquiterpeni, i diterpeni, i triterpeni e loro possibili derivati. Vista la loro importanza e la loro varietà, ogni sottoclasse verrà trattata separatamente.

### *Isoprenoidi*

Una definizione biogenetica dei composti isoprenoidi è stata data verso il **1953** e **Ruzicka** ha avuto una parte fondamentale nel gettare le basi di quella che ancora oggi viene chiamata **regola isoprenica**. La maggior parte dei terpeni naturali può essere costruita sulla carta a partire da “unità isopreniche”.



**Unità isoprenica**

Esistono delle eccezioni, ma va subito detto che quando queste irregolarità strutturali sono presenti possono provenire da logiche trasposizioni di regolari poliisopreni, i quali costituiscono la base per la regola biogenetica degli isoprenoidi. Questa considerazione costituisce una importante teoria unificatrice, ma non permette di identificare i precursori biogenetici. Ad esempio per lungo tempo è stata studiata l'origine del colesterolo: di questo importante metabolita secondario era stata accertata derivazione dall'acetato di sodio ed era stata anche ipotizzata una sua relazione con i triterpeni. I precursori degli isoprenoidi sono rimasti ambigui fino a quando, per puro caso, è stato dimostrato che l'acido mevalonico poteva essere un fattore che sostituiva l'acetato di sodio per lo sviluppo di alcuni batteri. Dopo questa scoperta c'è stata una rapida convergenza di studi chimici, biochimici ed enzimatici particolarmente legati al lavoro di Cornforth e Lynen.

Nel discutere la biogenesi degli isoprenoidi verrà considerata per prima l'origine dell'unità

isoprenica, la sua polimerizzazione e poi le altre reazioni della catena isoprenica.

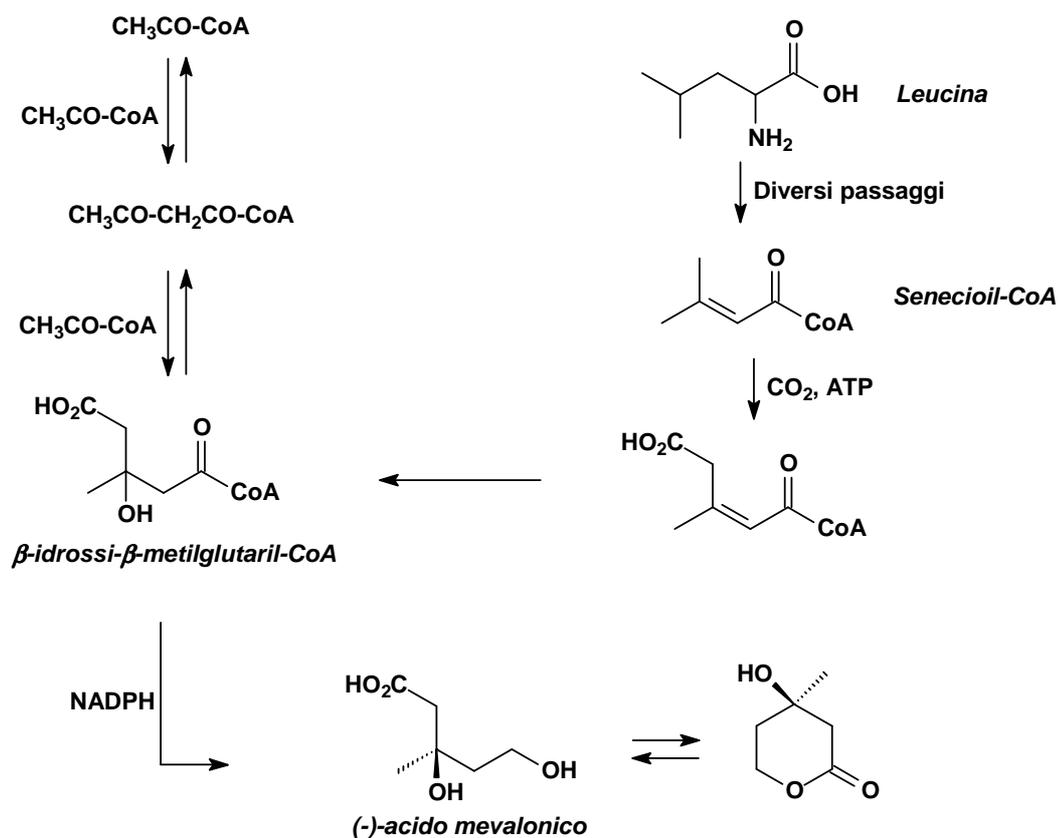
Da un punto di vista meccanicistico la sintesi degli isoprenoidi si realizza in tre fasi successive:

- 1) *sintesi dell'acido mevalonico a partire da esteri tiolici*
- 2) *formazione delle catene poliisopreniche via derivati fosforilati*
- 3) *ciclizzazione*

### Formazione dell'unità isoprenica

Il precursore dell'unità isoprenica è l'**acido mevalonico**.

Di seguito (schema 4.1) vengono riassunte le vie che conducono a questo importante intermedio a partire dall' acetil-CoA e dalla leucina. La via metabolica a partire dalla leucina è normalmente meno importante.

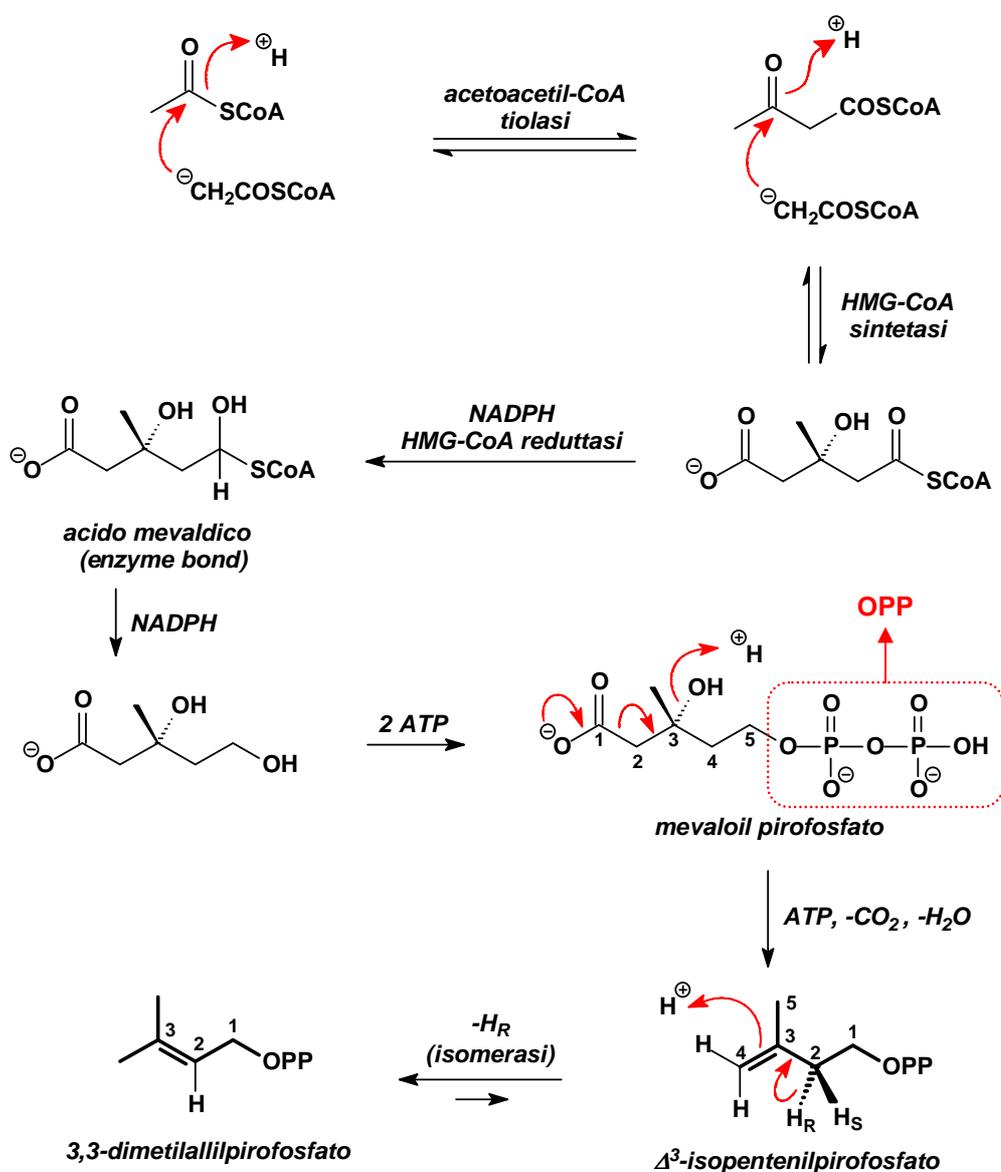


Schema 4.1. Biosintesi dell'acido mevalonico.

La via più comune per la sintesi dell'acido mevalonico è quindi la cosiddetta via dell'acetato, per la

quale sono richieste inizialmente tre unità di acetil-CoA (acetil-coenzima A).

Nello schema 4.2 è rappresentata la condensazione delle tre unità di acetil-CoA, che avviene secondo un meccanismo di “tipo Claisen”. Si ottiene così il  **$\beta$ -idrossi- $\beta$ -metilglutaril-CoA** che in seguito a processi riduttivi (tramite il cofattore NADPH), viene trasformato in **acido mevalonico**. Una volta ottenuto, l'acido mevalonico verrà fosforilato tramite ATP, formando così il mevaloil pirofosfato. Uno dei passaggi chiave in questo processo biosintetico è la reazione di eliminazione e decarbossilazione concertata che subisce il mevaloil pirofosfato, per arrivare al  **$\Delta^3$ -isopentenilpirofosfato**.

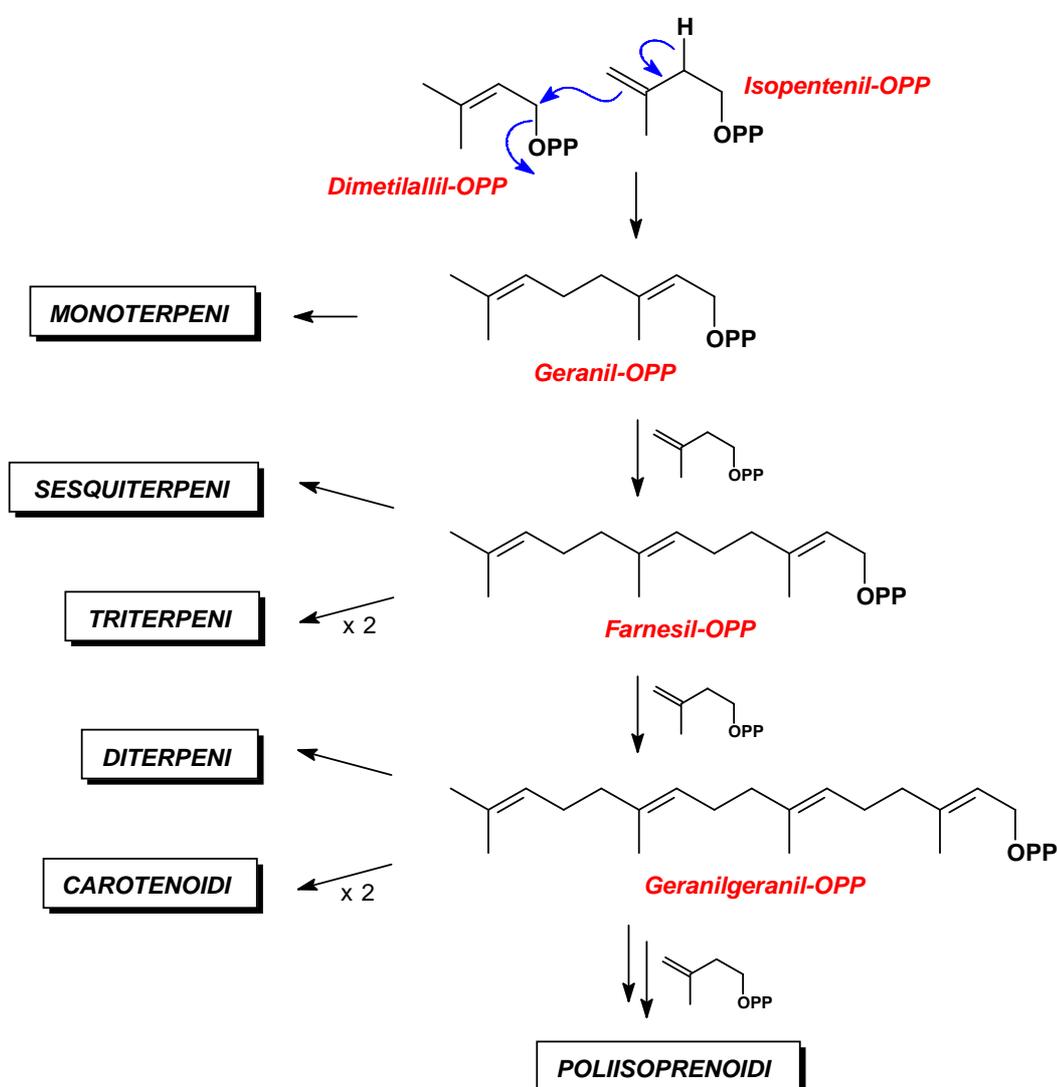


Schema 4.2. Meccanismi biosintetici coinvolti nella formazione dell'IPP e del DMAP.

Il  **$\Delta^3$ -isopentenilpirofosfato (IPP)** è l'unità isoprenoidica che per trasposizione protonica si

trasforma nel **3,3-dimetilallilpirofosfato (DMAP)**, il quale è l'effettivo agente alchilante nella biosintesi degli isoprenoidi e la forma biologica dell'unità isoprenica. La stereochimica di queste reazioni è logicamente sotto controllo enzimatico. Va ricordato ad esempio come il C(2) dell'acido mevalonico fornisca il gruppo metilenico dell'isopentenilpirofosfato ed il gruppo metile *trans* del dimetilallilpirofosfato.

L'acido mevalonico marcato in C(2) è spesso usato come tracciante negli esperimenti e questo permette di effettuare alcune considerazioni sulla possibilità di distinguere il C(2) dal metile legato al C(3) dell'acido mevalonico in alcuni casi incerti. L'alchilazione del dimetilallilpirofosfato è il mezzo attraverso il quale vengono costruite le unità poliisoprenoidiche (Schema 4.3).



*Schema 4.3. Rappresentazione delle varie classi di terpeni lineari.*

Nello schema 4.2.3 è possibile vedere come i terpeni che contengono dieci atomi di carbonio, i

**monoterpeni**, provengono dall'alchilazione del precursore dimetilallilpirofosfato con isopentenilpirofosfato. Il meccanismo di tale reazione prevede che il doppio legame dell'isopentenilpirofosfato migri come mostrato nello schema 8, probabilmente con l'assistenza del vicino gruppo pirofosforico che risulta essere un buon gruppo uscente, formando così il **geranilpirofosfato**. Dato che questo è ancora un estere allilico, il processo può essere ripetuto con formazione di un'unità a quindici atomi di carbonio, ovvero il **farnesilpirofosfato**, da cui derivano i **sesquiterpeni**, ed a venti atomi di carbonio, il **geranilgeranilpirofosfato**, da cui derivano i **diterpeni**. Nella formazione delle gomme (**poliisoprenoidi**) il processo prosegue indefinitamente, ma per la formazione di unità a trenta atomi di carbonio, i **triterpeni**, concorrono due unità a quindici atomi di carbonio con un processo che sarà visto nei dettagli in seguito.

### *Ciclizzazione delle catene isopreniche.*

Caratteristica straordinaria dei terpeni naturali è il numero sbalorditivo di strutture carbocicliche ritrovate. Fino ad ora sono stati individuati oltre 250 differenti scheletri carboniosi, le strutture dei quali si diversificano in quanto possono avere sia catene acicliche che anelli di varia grandezza da tre a quattordici atomi. Sebbene un numero elevato di questi scheletri venga prodotto per ossidazione (apertura di un anello), la maggioranza è rappresentata da strutture primarie formate in natura dai cinque precursori aciclici di base, attraverso sequenze di ciclizzazioni e trasposizioni.

A questo punto è opportuno discutere certi aspetti della biosintesi dei terpeni. I singoli passaggi negli schemi biogenetici possono essere rappresentati come processi di **iniziazione**, **propagazione** e **terminazione**. Esistono soprattutto due tipi di reazioni che permettono l'iniziazione del processo:

- *protonazione di un doppio legame o di un epossido*
- *ionizzazione di un fosfato.*

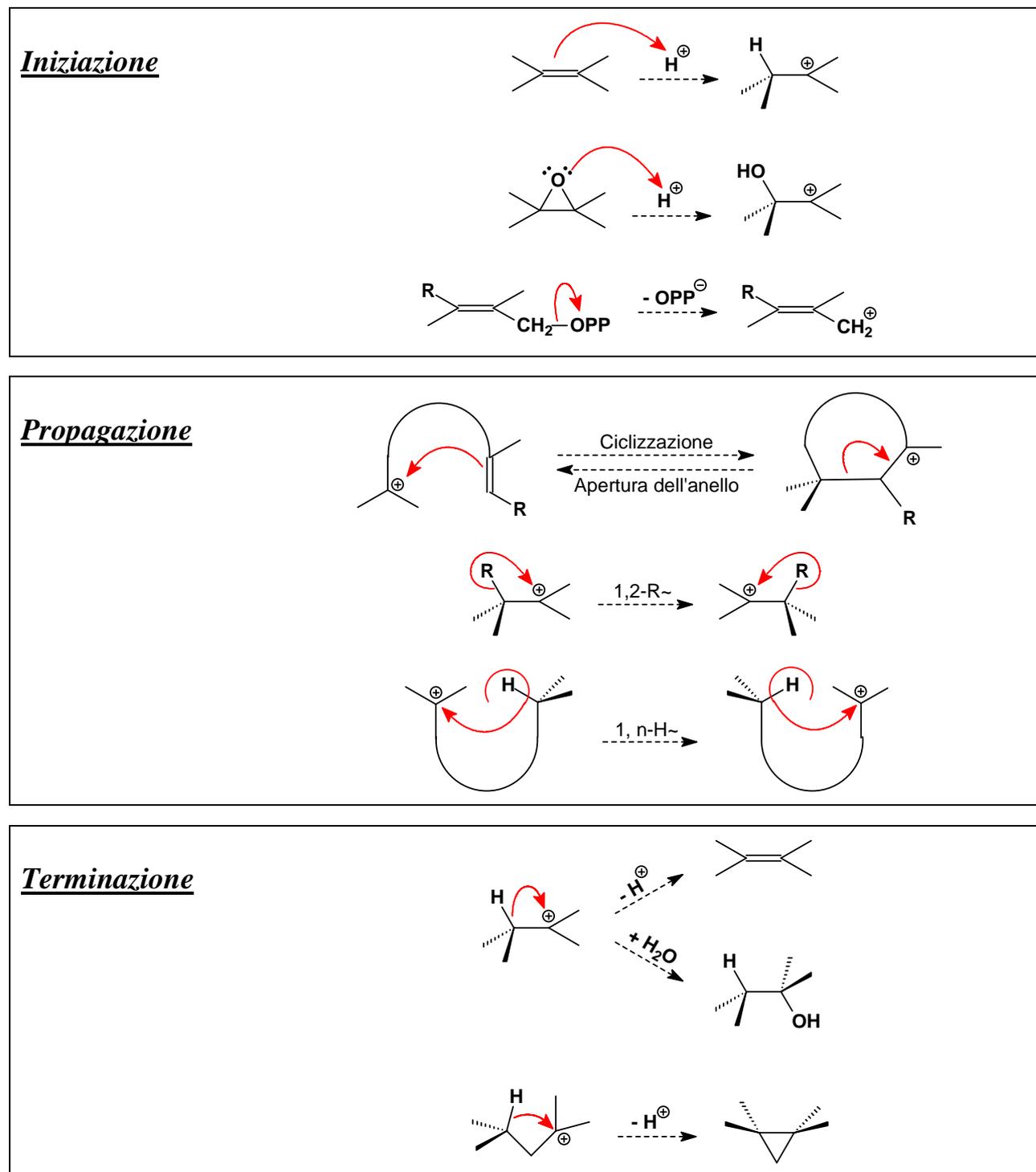
In molti schemi biogenetici sono richiesti alcuni passaggi di propagazione prima della terminazione. Un esempio eccezionale è dato dal triterpene chetonico friedelina la cui biogenesi si realizza con ben quindici successive tappe di propagazione.

L'ipotesi più accreditata è quella che prevede che questi schemi a molti passaggi siano *non-stop* ed il processo finale di terminazione non reversibile. Questa ipotesi è stata verificata nella biosintesi dei triterpeni. Nella biosintesi dei sesquiterpeni e dei diterpeni sono spesso stati osservati anche processi *single-stop* e *double-stop*.

Un'altra ipotesi fondamentale della regola isoprenica è legata alla stereochimica. E' stato ipotizzato

che tutti i passaggi della propagazione come pure quello della terminazione devono avvenire in modo sincronizzato ed antiparallelo.

I diversi schemi generali degli “*step*” di **iniziazione**, **propagazione** e **terminazione** vengono riportati di seguito.



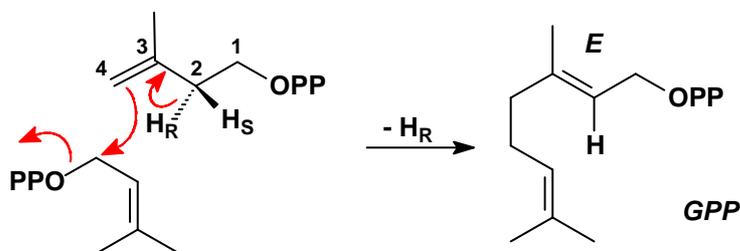
## 5. MONOTERPENI



Tutti i monoterpene naturali derivano biogeneticamente da un precursore comune, il geranilpirofosfato; devono quindi contenere dieci atomi di carbonio e possedere uno scheletro carbonioso in accordo alla regola isoprenica. Fino ad ora sono stati isolati ed identificati oltre 500 monoterpene che differiscono tra loro per lo scheletro carbonioso e per il grado di funzionalizzazione. Sono presenti scheletri aciclici e ciclici (mono-, bi-, e triciclici) con anelli da tre a sette termini.

### *Biosintesi dei monoterpene*

Il processo biosintetico dei monoterpene prevede l'interazione tra l'isopentenilpirofosfato (IPP) e il dimetilallilpirofosfato (DMAPP) con formazione del **geranilpirofosfato (GPP)**. Si ritiene che dalla ionizzazione del DMAPP si formi un carbocatione allilico che si addiziona al doppio legame dell'IPP che perde anche un protone (più esattamente l' $H_R$ , lo stesso che viene rimosso nell'isomerizzazione dell'IPP a **DMAPP** - Schema 4.2.2), generando un doppio legame con isomeria *trans* (*E*) (Schema 5.1).

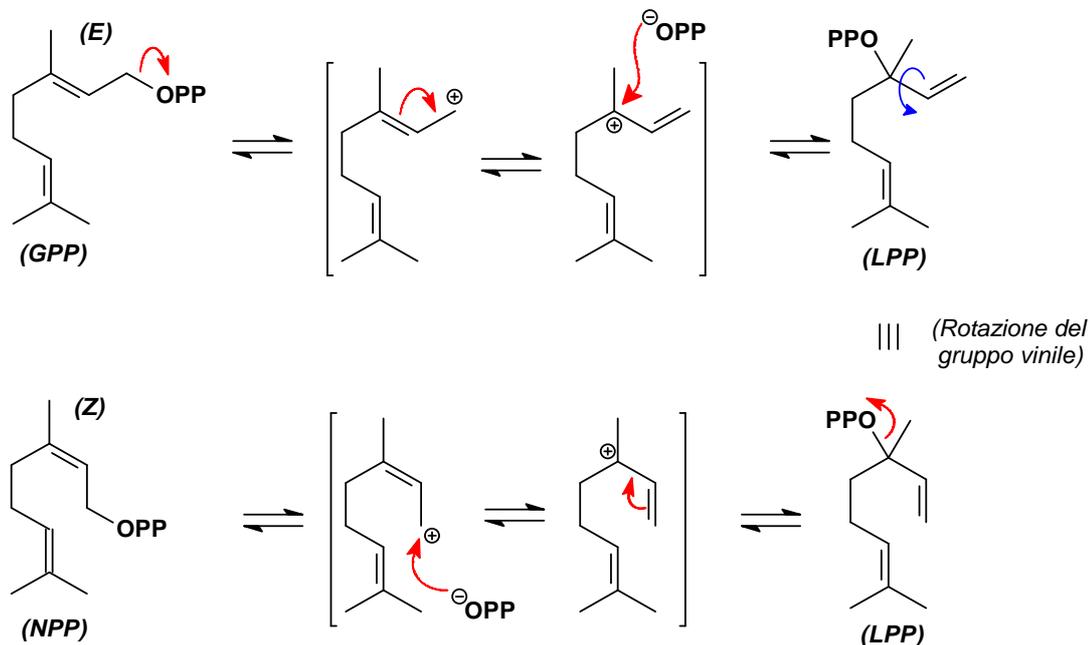


Schema 5.1. Formazione del geranyl pirofosfato (GPP).

Esistono inoltre altri due isomeri lineari, il **nerilpirofosfato (NPP)** (isomero geometrico di tipo *cis*) ed il **linalilpirofosfato (LPP)** (isomero costituzionale), i quali si possono ottenere dalla ionizzazione del GPP (schema 5.2).

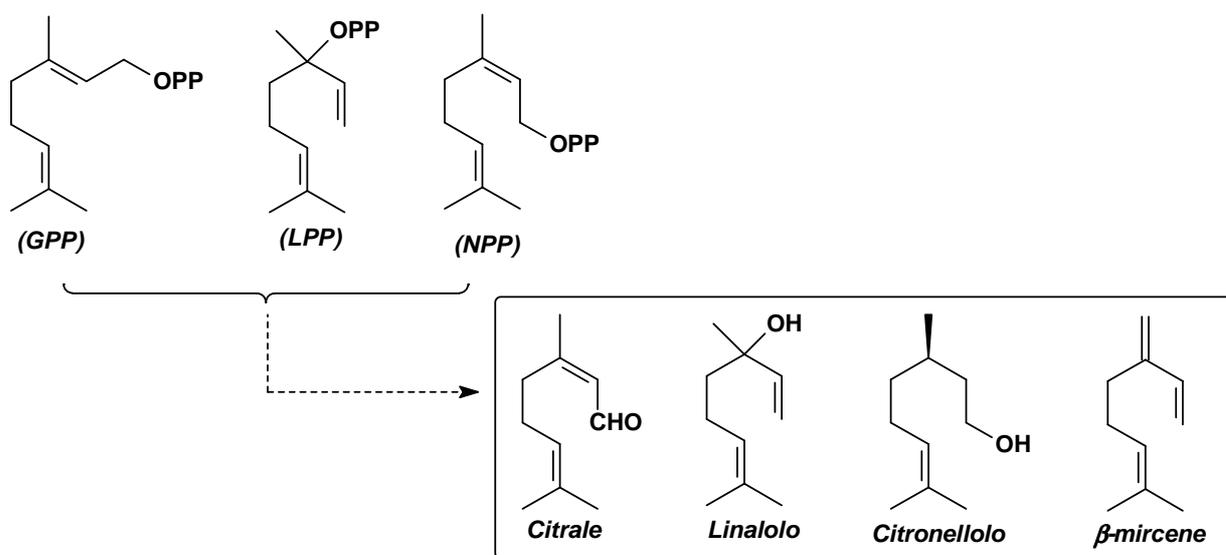
Dalla ionizzazione del gruppo pirofosfato (OPP), che è un buon gruppo uscente, si ha la formazione di un carbocatione allilico delocalizzato su più carboni, grazie al meccanismo della risonanza. Questo consente di convertire il doppio legame *trans* (*E*) del GPP nel doppio legame *cis*

del NPP, passando attraverso la formazione di un carbocatione linalile.

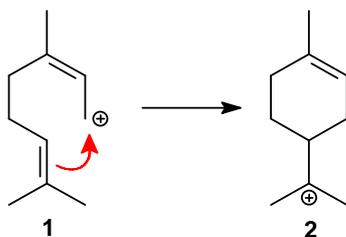


*Schema 5.2. Conversione del GPP in NPP e LPP.*

Il **GPP**, il **NPP** ed il **LPP** possono dar luogo alla formazione di svariati monoterpeni lineari (Schema 5.3) oppure a tutta una serie di monoterpeni ciclici passando attraverso il carbocatione mentile intermedio **2** (Schema 5.4).

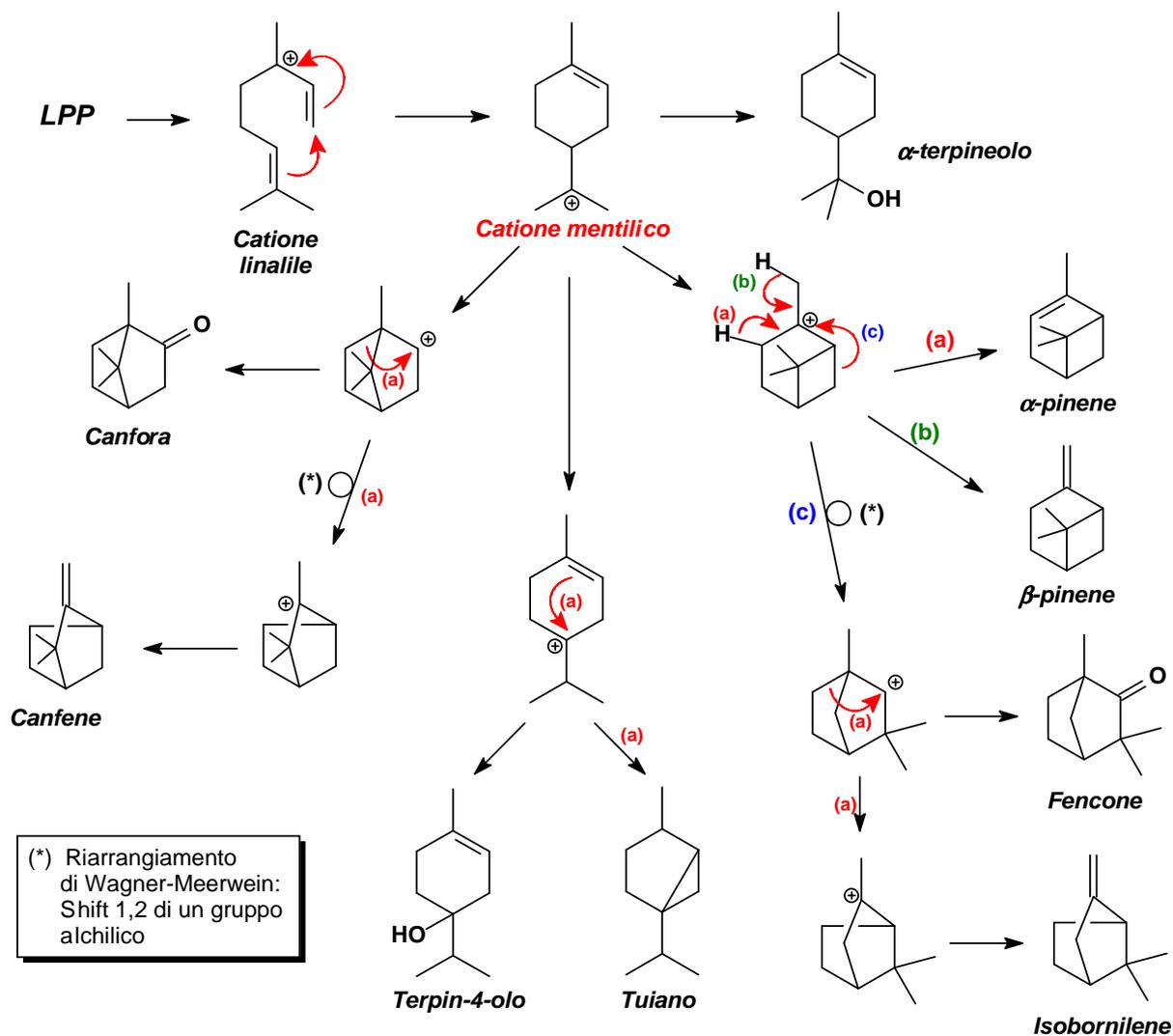


*Schema 5.3. monoterpeni lineari.*



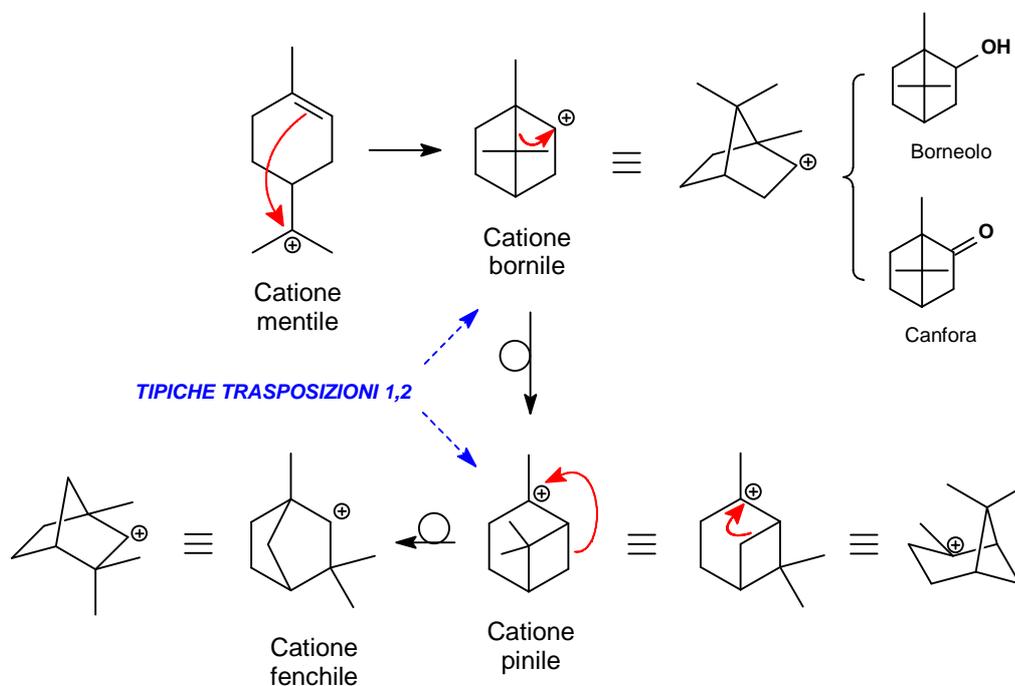
**Schema 5.4.** Esempio di ciclizzazione del catione nerile (1) nel catione ciclico mentile (2).

Diversi processi di propagazione possono essere ipotizzati per la formazione di scheletri monoterpici ciclici chiave, i quali a loro volta sono coinvolti nella formazione di altri monoterpici, anche apparentemente molto diversi tra di loro. Nello schema 5.5 viene riportato il carbocatione mentilico (2), dal quale si ottengono, attraverso diverse trasposizioni, anche scheletri policiclici (in genere biciclici) altamente differenziati.



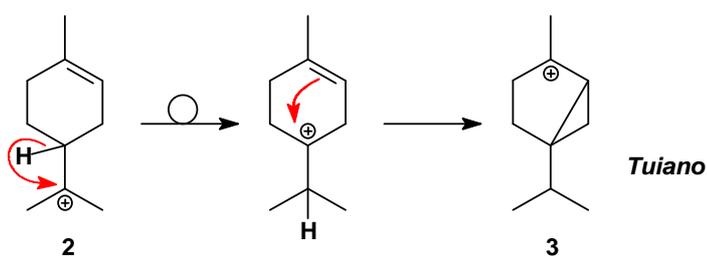
**Schema 5.5.** Rappresentazione della formazione di vari scheletri monoterpici ciclici.

Un tipico meccanismo che si verifica nella biosintesi dei monoterpeni, riguarda processi di trasposizione cationotropica di tipo **Wagner-Meerwein**. Nella maggior parte dei casi si osserva uno “shift” 1,2 di un gruppo “R” con formazione di un nuovo carbocatione terziario o secondario (Schema 5.6).



**Schema 5.6.** Esempi di trasposizione cationotropica di tipo Wagner-Meerwein.

L’ampia varietà di scheletri monoterpenici esistenti deriva dalla facilità con cui il carbocatione mentilico **2** dà reazioni di propagazione. Ad esempio il composto biciclico **3** (Tuiano) deriva dalla propagazione di **2**.



Anche il carano **4** è un prodotto di terminazione di **2**, da cui si ottiene attraverso una deprotonazione e successiva ciclizzazione.

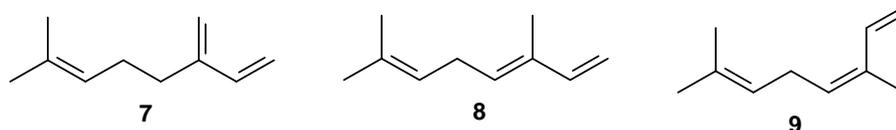


### ***Monoterpeni che contribuiscono all'aroma.***

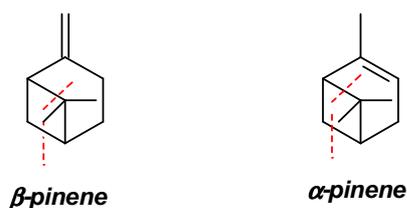
La maggior parte delle sostanze impiegate a scopo alimentare contiene alcuni costituenti che sono presenti solo in tracce quali: minerali, vitamine ed aromi. Questi ultimi hanno un ruolo importante nell'alimentazione umana: sono infatti parzialmente responsabili della scelta del cibo in base alla gradevolezza ed accettabilità e giocano un ruolo importante nel processo digestivo. Gli aromi possono essere considerati come le risposte neurofisiologiche degli stimoli chimici che contemporaneamente provengono sia dal senso del gusto che dal senso dell'olfatto. I componenti dell'aroma sono nella maggior parte dei casi metaboliti secondari prodotti da organismi vegetali ed animali; qualità e quantità di aroma dipendono da fattori genetici e possono essere influenzati da problemi di maturazione e di conservazione. L'aroma degli alimenti può essere anche prodotto da processi extracellulari quali ad esempio la fermentazione o trasformazioni chimiche delle sostanze alimentari durante la lavorazione, per degradazione di precursori ad elevato peso molecolare. Le proteine, gli zuccheri ed i grassi presenti negli alimenti sono le tre principali fonti di aromi degli alimenti anche se qualche volta altri precursori quali polifenoli, nucleotidi, pigmenti, vitamine o politerpeni, possono contribuire in certa misura all'aroma totale. La conservazione, la fermentazione, la disidratazione, la bollitura l'arrostimento sono i processi più comuni, dopo la raccolta, che modificano l'aroma degli alimenti.

Le vie attraverso le quali vengono formate le sostanze che producono aroma sono caratterizzate da normali reazioni chimiche quali ossidazioni, trasposizioni, frammentazioni e reazioni di condensazione. Il profumo non viene mai attribuito ad un singolo componente, la maggior parte degli alimenti sono profumati da molti componenti odoriferi che spesso sono presenti solo in tracce. Così ad esempio i componenti volatili presenti nella frutta sono presenti in quantità che non superano le 10 ppm. L'isolamento dell'aroma originale, senza sostanziali modifiche, richiede tecniche speciali che devono essere adattate con una certa cura ad ogni specifico alimento. Fino ad ora sono noti circa 150 differenti gusti, la maggior parte dei quali è composta da 300 a 800 singoli componenti. Fino ad ora sono stati isolati ed identificati oltre 2600 singoli componenti che possiedono un aroma, ma questo numero può essere soggetto a variazioni nel tempo. Gran parte delle sostanze che possiedono un aroma fanno riferimento a strutture terpeniche, in modo particolare ai monoterpeni e secondariamente ai sesquiterpeni. Da notare che l'aumento del peso molecolare comporta la diminuzione delle capacità aromatiche e delle loro intensità, mentre ne influenza la durevolezza, in quanto meno volatili.

**Monoterpeni aciclici.** Il mircene **7** come pure i due ocimeni isomeri **8** e **9** sono presenti in più di 200 differenti profumi e fragranze e sono particolarmente abbondanti negli oli essenziali di molte specie appartenenti alla famiglia delle *Labiatae* e delle *Compositae*.

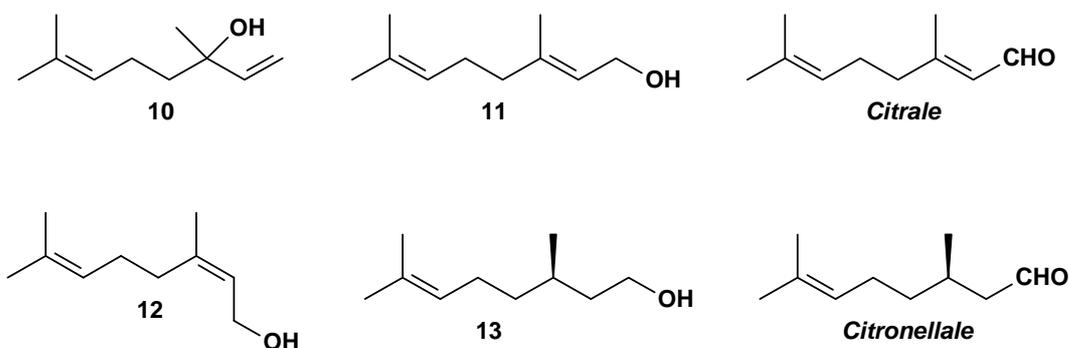


Il mircene **7** ed il *trans*-ocimene **8** sono stati identificati quali componenti dell'olio essenziale presente nell'*Ocimum basilicum*. Il *cis*-ocimene **9** è il componente principale presente nell'olio essenziale estratto dalla *Salvia officinalis* L.. E' stato anche riportato che i tre monoterpeni contribuiscono all'aroma del té nero giapponese. A scopi industriali il mircene **7** ed il *cis*-ocimene **9** vengono rispettivamente preparati per pirolisi del  $\beta$ -pinene e dell' $\alpha$ -pinene.



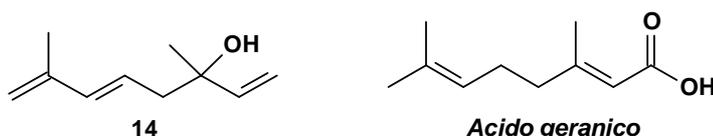
Questa reazione è una retro-cicloaddizione 2 + 2, che comporta la formazione di due nuovi doppi legami carbonio-carbonio.

Il linalolo **10**, il geraniolo **11**, il nerolo **12** e il citronello **13** sono i derivati ossigenati della serie dei monoterpeni che si ritrovano più frequentemente in natura.



In natura sono anche presenti gli esteri di **11**, **12** e **13** come pure le corrispondenti aldeidi. Di particolare interesse è il citrale che deriva da **11**. Due dei quattro terpeni ossigenati esistono in forma otticamente attiva (**10** e **13**), e gli enantiomeri differiscono per le loro proprietà odorifere.

Gli alcoli monoterpeneici **10**, **11**, **12** e **13**, in molti casi costituiscono, assieme ai loro derivati, la base di molti olii essenziali e di molti profumi naturali. L'acido geranico che deriva da **11** è stato trovato in forma libera ed è presente in molti tipi di uve. Nelle uve e nei vini (moscatelli) è stato ritrovato il monoterpene **14**.



L'alcool **15** (*lavandulolo*) contribuisce all'aroma della *Lavandula hybrida*.

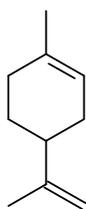
L'alcool **16**, che ora viene prodotto anche per sintesi insieme al suo acetato e all'addotto acroleinico, è da considerare materiale base nella moderna tecnologia dei profumi e viene pertanto usato in larga quantità.



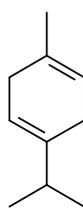
Il monoterpene **16** viene preparato per idratazione del mircene **7**.

**Monoterpeni monociclici e biciclici.** Il più rappresentativo tra i monoterpeni monociclici è senza dubbio il limonene **17** che è presente quale componente di molti aromi.

Negli olii essenziali di molte specie di Citrus il limonene è presente nella sua forma destrorica ed in alcuni casi raggiunge la concentrazione del 90%. La sua forma enantiomera (levogira) è più comune nelle specie Menta e Pinus. In natura sono stati ritrovati molti isomeri del limonene a livello delle insaturazioni, come ad esempio il composto **18**, che è presente nella *Majorana hortensis* (*Origanum majorana* L.)

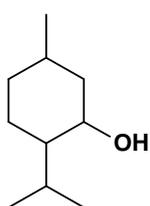


17

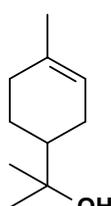


18

La presenza e l'importanza dei derivati ossigenati dei monoterpeni ciclici in natura è nota da tempo. Tra questi il mentolo **19** e l' $\alpha$ -terpineolo **20** sono ad esempio iscritti nella Farmacopea Ufficiale.

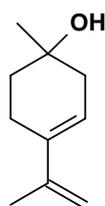


19

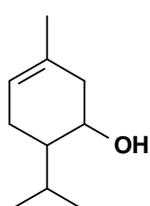


20

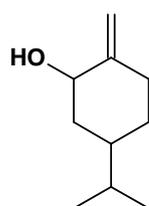
Sono stati isolati ed identificati una serie di monoterpeni monociclici ossigenati isomeri di **20**. I composti **21**, **22**, **23** e **24** sono presenti negli oli essenziali del pepe nero (*Piper nigrum*) anche se i veri responsabili dell'aroma del pepe non sono ancora stati identificati.



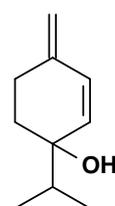
21



22

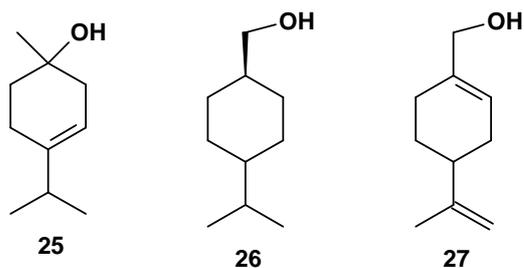


23

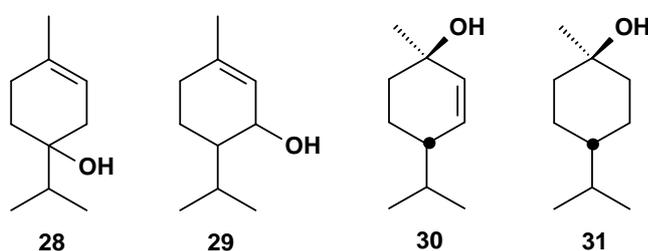


24

Il monoterpene **25** è presente nell'*Origanum vulgare*, mentre **26** è presente nelle bacche di *Juniperus communis*. Il particolare odore delle varie specie di salvia è stato attribuito ad alcuni derivati metilati di **27**

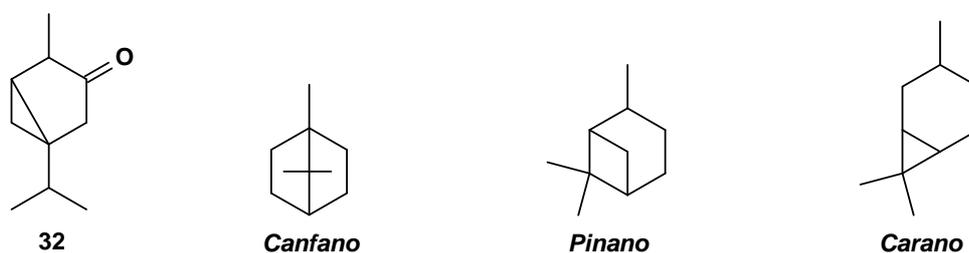


Il distillato alcoolico della *Majorana hortensis*, che viene usato per profumare alcuni liquori, contiene circa il 15% degli eteri etilici di **28**, **29**, **30** e **31**.



Quando la funzione alcoolica è primaria sono spesso presenti in natura i corrispondenti composti di natura aldeidica.

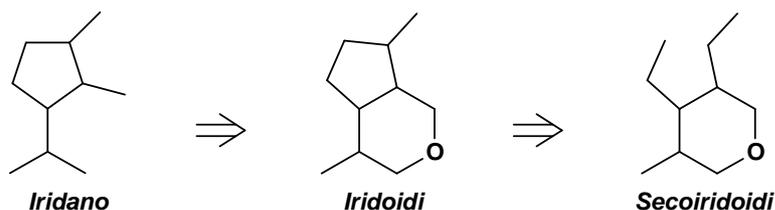
In natura sono presenti molti composti monoterpenici con uno scheletro biciclico riferibile al tuiano. Molti di questi sono presenti nella *Salvia officinalis* (es. **32** = **tuione**). Molti altri composti monoterpenici biciclici possiedono scheletri riferibili al pinano, al canfano ed al carano.



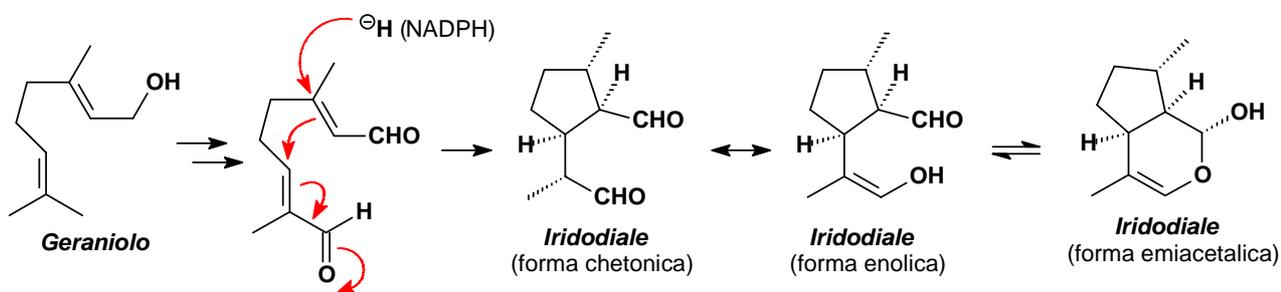
Molti di questi scheletri possono essere ossigenati, dando origine a composti di estremo interesse commerciale e biologico. A tale proposito basta ricordare la canfora **33** che è iscritta nella nostra Farmacopea Ufficiale.



**Iridoidi.** Sono composti riferibili allo scheletro dell'*iridano*, che presentano un anello ciclopentanico generalmente fuso ad un anello eterociclico ossigenato a sei termini.

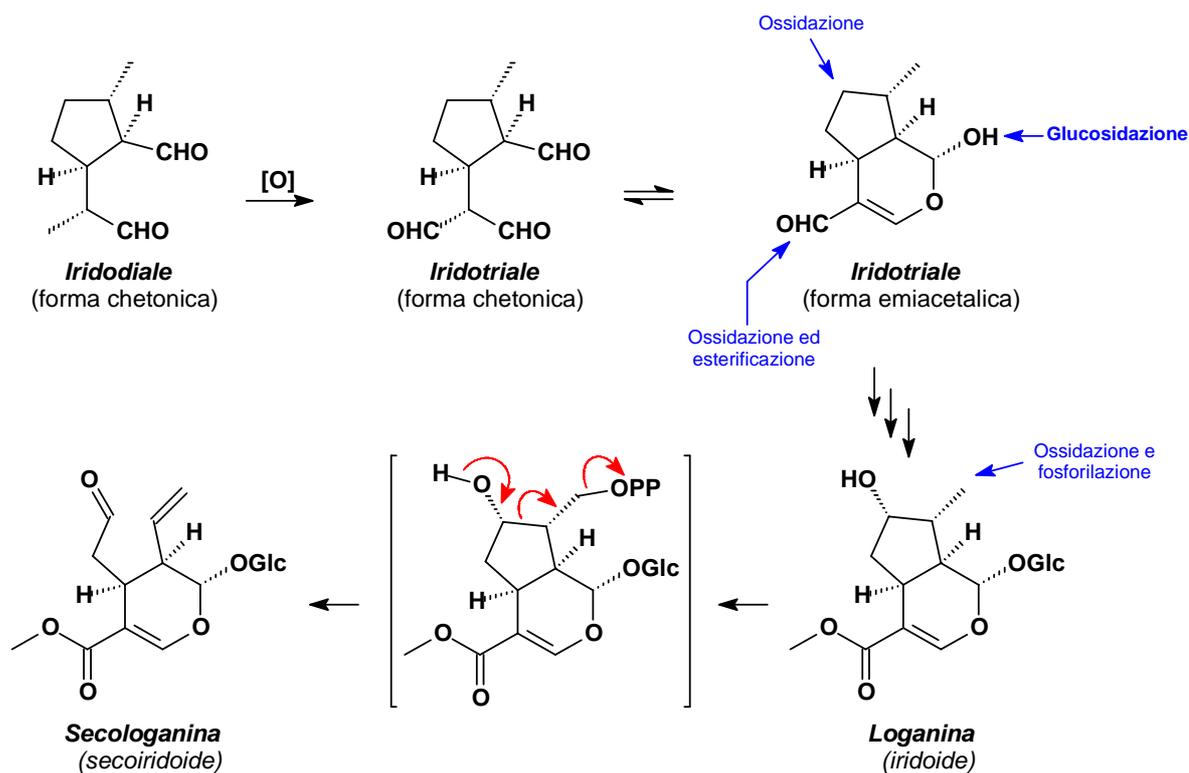


Il sistema iridoide deriva dal geraniolo attraverso un tipo di ripiegamento diverso da quello visto negli altri monoterpenoidi (Schema 5.7).



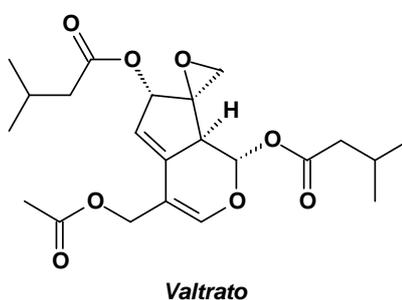
Schema 5.7

La forma chetonica dell'*iridodiale* viene successivamente ossidata ad *iridotriale*, la cui forma emiacetalica subisce diverse trasformazioni, fino ad arrivare alla *loganina* (Schema 5.8).



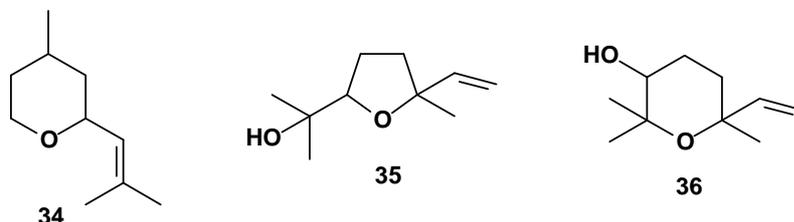
Come si può vedere nello schema precedente, dalla loganina, per rottura di un legame carbonio-carbonio, si ottiene la secologanina (un secoiridoide). Questi composti hanno diversa importanza, infatti strutture che presentano grosse analogie con quella della loganina, vengono ritrovate in una classe di composti denominati **valepotriati** (esteri epossiridoide), che con il **valtrato** (0,4-2%), sono i componenti principali estratti dalla valeriana (Figura 5.2).

**Figura 5.2.** I valepotriati presentano delle blande proprietà sedative e tranquillanti. Questa proprietà viene mantenuta però solamente se l'estrazione (ad es. da valeriana officinalis), viene effettuata su radici fresche accuratamente essiccate (40°C), per evitare la decomposizione di questi componenti termolabili.



La secologanina invece è un precursore, insieme alla triptamina, di diversi alcaloidi tra cui quelli a struttura chinolinica (pag. 97).

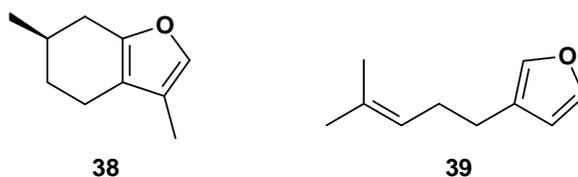
**Eteri e lattoni monoterpenici:** L'importanza degli eteri monoterpenici ciclici come composti che contribuiscono all'aroma, è stata riconosciuta solo durante l'ultima decade ed in particolare dopo la scoperta e l'identificazione del "rose oxide" **34** e dei linaloli ossidi **35** e **36**.



L'etere biciclico **37**, (1,8-cineolo), noto come eucaliptolo, è stato ritrovato in molte specie botaniche.



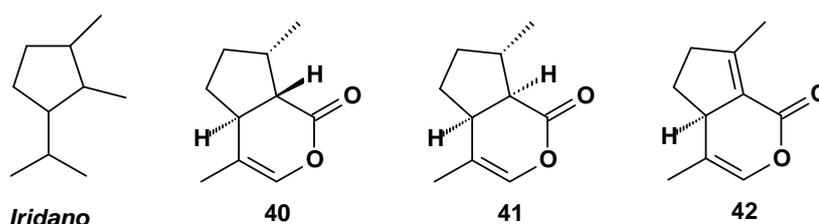
I monoterpeni **35** e **36** vengono spesso ritrovati accanto al linalolo **10** da cui vengono formati attraverso un processo iniziale di epossidazione (enzimatica o autossidazione). Questi due terpeni vengono anche trovati in molti olii essenziali delle piante appartenenti al genere *citrus* e contribuiscono all'aroma di frutta come ad esempio: albicocche, ananas, uva moscatella ecc. I composti diastereoisomeri di **35** e **36** esercitano un certo ruolo nel profumo di molte specie di té. Il "rose oxide" **34**, come pure molti altri monoterpeni ciclici, può derivare da un processo di fotoossidazione (in presenza di ossigeno molecolare) catalizzato dalla luce; nel caso specifico **34** deriva dal citronellolo **13**. L'olio di verbena contiene un numero elevato di monoterpeni tra cui **38** e **39**, che sono composti di natura eterociclica, in quanto contengono anelli furanici.



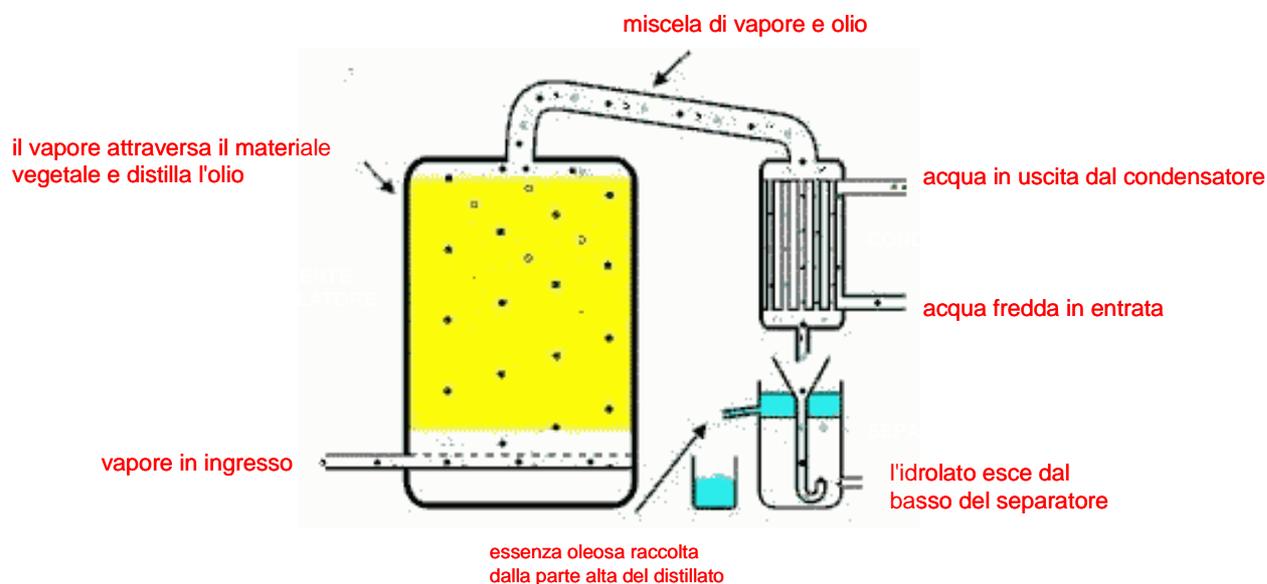
Il composto mentofuranico **38** è abbastanza diffuso in natura ed è sempre presente negli olii

essenziali di *menta piperita*. **38** non è mai stato trovato ad esempio nell'olio essenziale di *menta avernis* che è una varietà meno apprezzata.

I monoterpeni di natura lattonica che contribuiscono all'aroma hanno una importanza limitata e sono tutti riferibili al nucleo dell'iridano. Alcuni esempi possono essere i composti **40**, **41** e **42**.



### Schema di un apparato di distillazione in corrente di vapore (*steam distillation*) per l'estrazione degli oli essenziali.

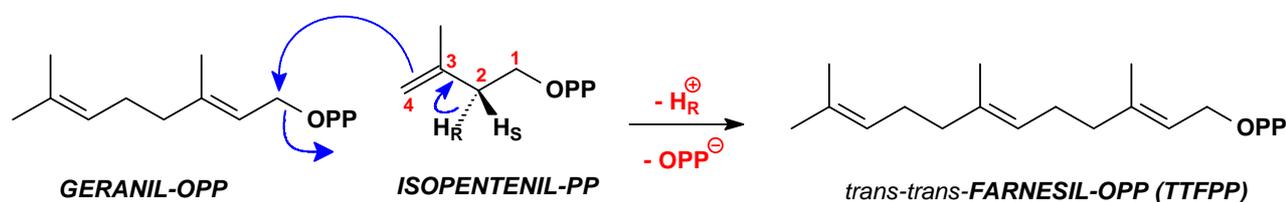


## 6. SESQUITERPENI



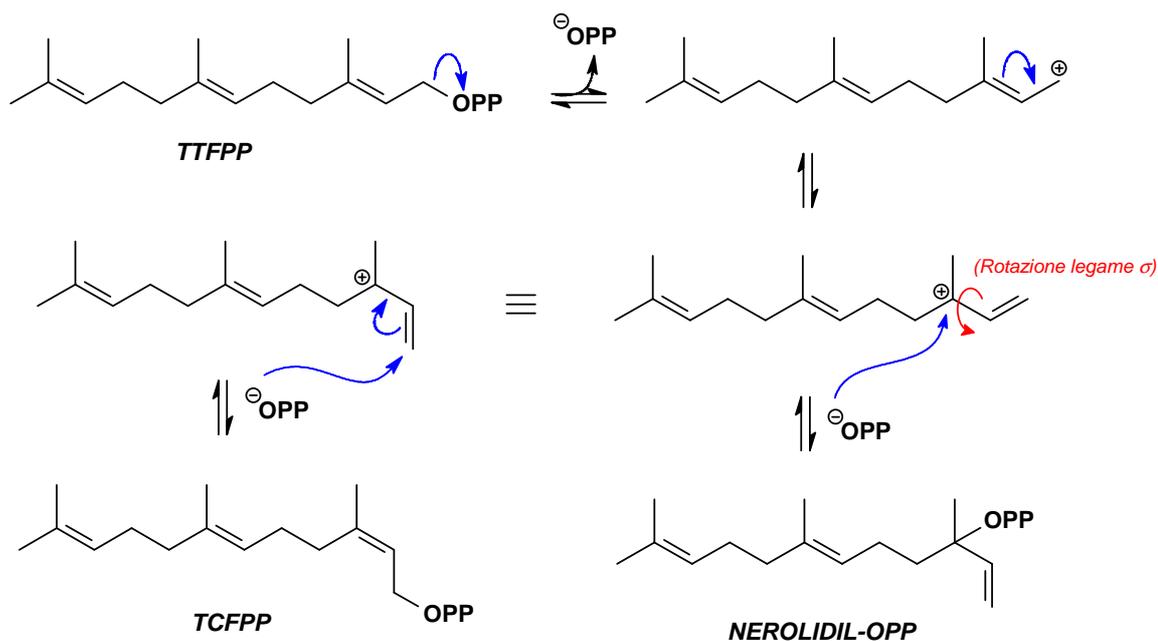
I sesquiterpeni sono metaboliti secondari di piante e funghi che incorporano uno scheletro a quindici atomi di carbonio. Il precursore di questi composti è il **farnesilpirofosfato**, che si origina per condensazione del geranilpirofosfato e dell'isopentenilpirofosfato con meccanismo identico a quello già osservato per i monoterpeni. Caratteristica dei sesquiterpeni è il fatto che essi possono incorporare scheletri molto diversi (a catena aperta, monociclici, biciclici e triciclici) che portano numerose funzioni ossigenate (alcoli, aldeidi, chetoni, acidi etc.) e legami multipli carbonio-carbonio, dando origine a composti con strutture particolarmente complesse. Dalla condensazione del geranilpirofosfato e dell'isopentenilpirofosfato, con un meccanismo analogo a quello già visto per la biosintesi dei monoterpeni, si origina il *trans-trans*-farnesilpirofosfato (**TTFPP**).

Il meccanismo di iniziazione del processo biosintetico, presumibilmente, coinvolge la ionizzazione del GPP con formazione del corrispondente carbocatione allilico che si addiziona ad una unità IPP. Contemporaneamente la rimozione dell' $H_R$  dell'IPP porta alla formazione del corrispondente doppio legame  $\Delta^2$ -*trans* del farnesilpirofosfato (TTFPP) (Schema 6.1).



Schema 6.1. Biosintesi del  $\Delta^2$ -*trans* farnesilpirofosfato.

Anche in questo caso la formazione dei possibili isomeri del farnesilpirofosfato sono dovuti alla ionizzazione del gruppo OPP, che innesca la formazione di un carbocatione allilico delocalizzato per risonanza (Schema 6.2). La diversa conformazione del carbocatione allilico terziario consente la conversione dell'isomero geometrico *trans* (TTFPP) in quello *cis* (TCFPP).



**Schema 6.2.** Conversione del TTFPP nei rispettivi isomeri TCFPP e nerolidol-OPP via ionizzazione del gruppo OPP.

La diversa isomeria geometrica del TTFPP e del TCFPP è responsabile delle differenti forme conformazionali che le due molecole possono assumere e da cui si generano due classi distinte di composti con scheletri carbociclici differenti.

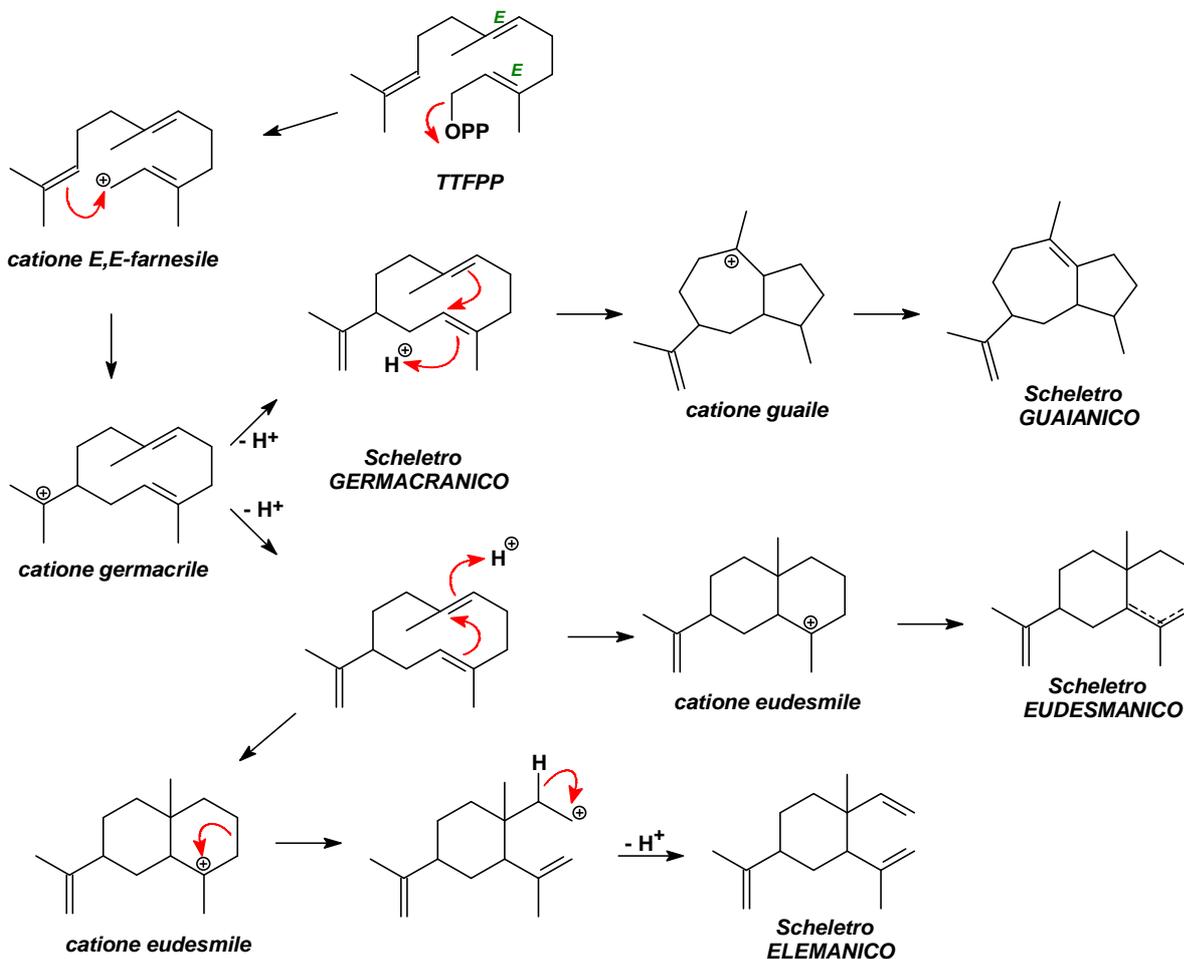
Negli schemi 6.3 e 6.4 vengono riportati degli esempi di ipotesi biogenetiche per la formazione di scheletri sesquiterpenici ciclici a partire dal TTFPP e TCFPP.

Con un meccanismo simile a quello già visto per la biosintesi dei monoterpeni ciclici, i due farnesil pirofosfati, subiscono una iniziale ionizzazione del gruppo OPP, e quindi diversi passaggi di propagazione a cui segue un processo di terminazione.

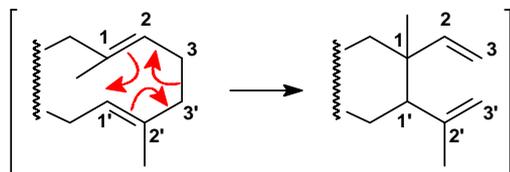
Nel caso dei sesquiterpeni i processi di propagazione sono largamente diffusi dando origine a composti che incorporano oltre cento scheletri carbociclici differenti.

Le vie biosintetiche che compaiono negli schemi sono state nella maggior parte dei casi dimostrate attraverso l'impiego di precursori marcati; altre purtroppo, fino ad oggi, sono frutto di ragionevoli ipotesi biogenetiche.

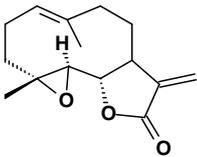
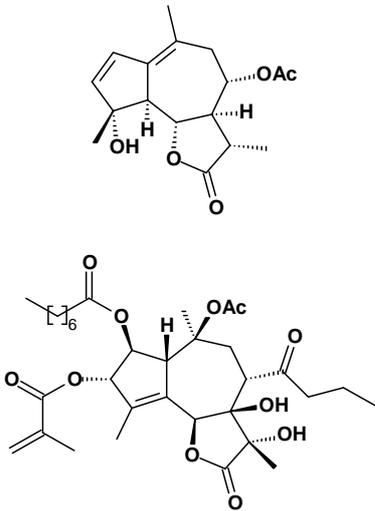
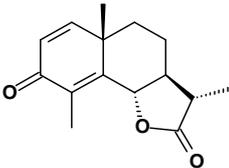
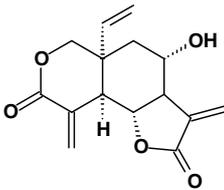
## Ipotesi biogenetiche di scheletri sesquiterpenici a partire da TTFPP



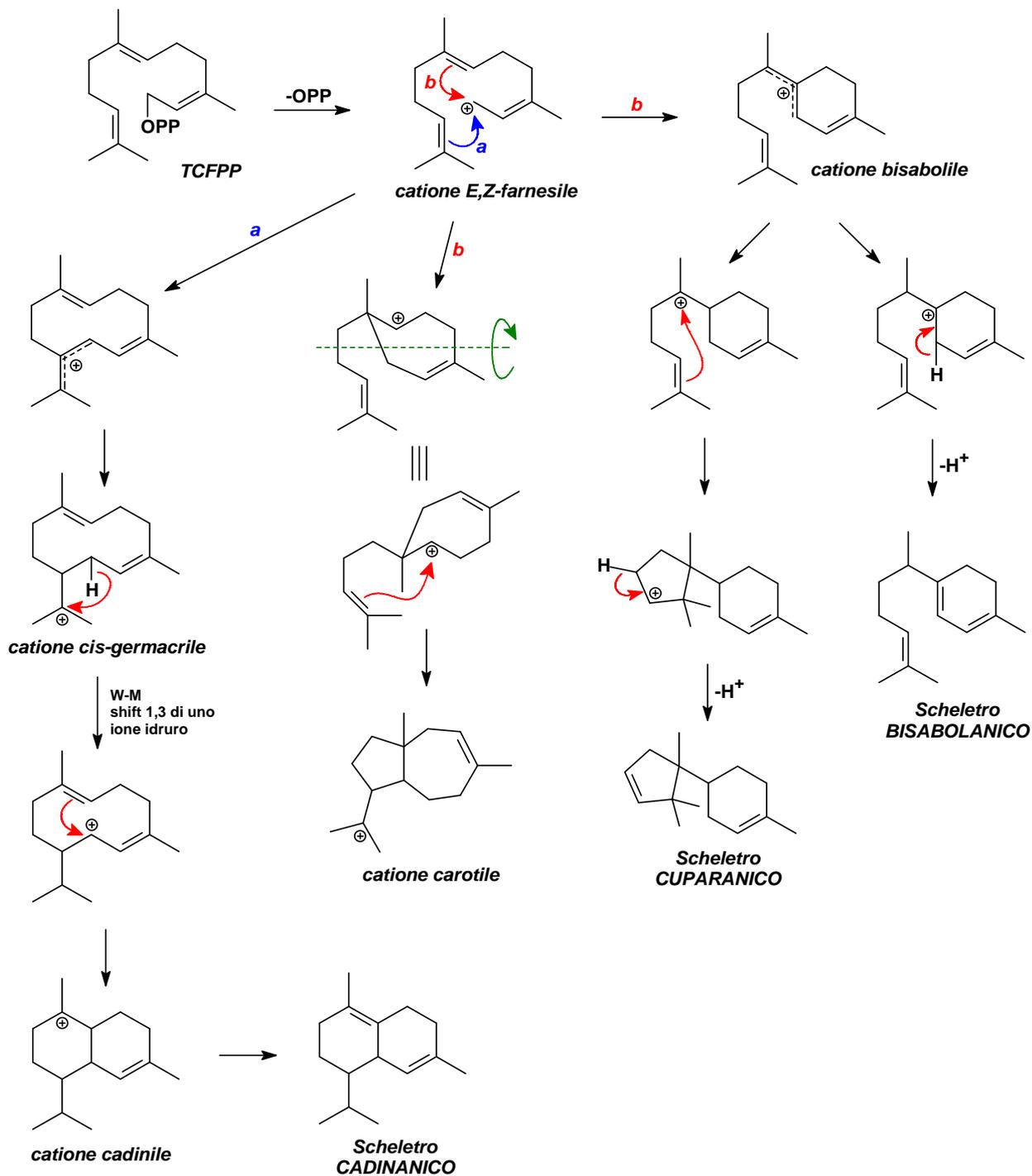
Schema 6.3



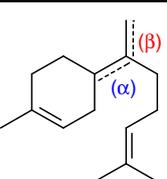
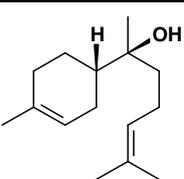
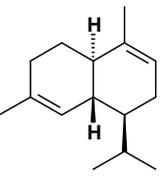
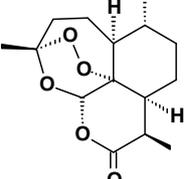
**Nota.** La trasformazione dello scheletro germacranico in scheletro elemanico potrebbe essere vista come un riarrangiamento [3,3]-sigmatropico, un processo intramolecolare non catalizzato, che coinvolge la migrazione di un legame "σ" adiacente ad uno o più legami "π" in una nuova posizione nella molecola, e la riorganizzazione dei legami "π" stessi durante il processo.

| Scheletro         | Sesquiterpene  |   |
|-------------------|--|---|
| <b>Germacrano</b> | <p><b>Partenolide:</b> agente antiemivrania presente nel partenio (<i>Tanacetum parthenium</i>).</p>   |    |
| <b>Guaiano</b>    | <p><b>Matricina:</b> presente nei fiori di matricaria, in seguito a riscaldamento decompone per dare il camazulene.</p> <p><b>Tapsigargina:</b> questo composto è di notevole interesse farmacologico come "tumor promoter" e come potente attivante di cellule coinvolte nella risposta infiammatoria.</p>                                  |    |
| <b>Eudesmano</b>  | <p><b><math>\alpha</math>-santonina:</b> identificata come il principale componente antielmintico di varie specie di Artemisia, come ad esempio del chenopodio (<i>A. cinia</i>; <i>Compositae</i>) ed ha trovato un notevole impiego nell'eliminazione di vermi parassitari, sebbene una potenziale tossicità ne limiti l'applicazione.</p> |  |
| <b>Elemmano</b>   | <p><b>Vernolepina:</b> possiede interessanti proprietà biologiche, come ad es. le capacità antitumorali dimostrate sia in vitro che in vivo; inoltre sono presenti anche attività anti-aggregante, spasmolitica, antiparassitaria ed antibiotica.</p>  |  |

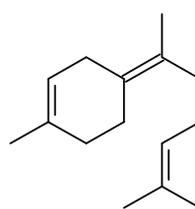
### *Ipotesi biogenetiche di scheletri sesquiterpenici a partire da TCFPP*



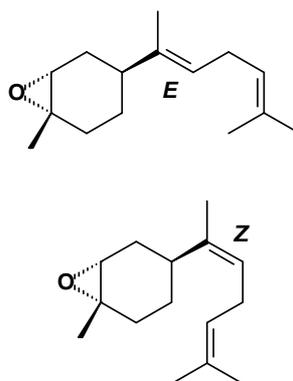
**Schema 6.4**

| Scheletro  | Sesquiterpene  | Sesquiterpene   |
|------------|--|---|
| Bisabolano | $\alpha$ e $\beta$ Bisabolene<br> | $\alpha$ -bisabololo<br> |
| Cadinano   | $\alpha$ -cadinene<br>            | Artemisinina<br>         |

Il  $\gamma$ -bisabolene è un composto che contribuisce all'aroma dello zenzero (*Zingiber officinale*; Zingiberaceae) insieme ad altre strutture correlate.

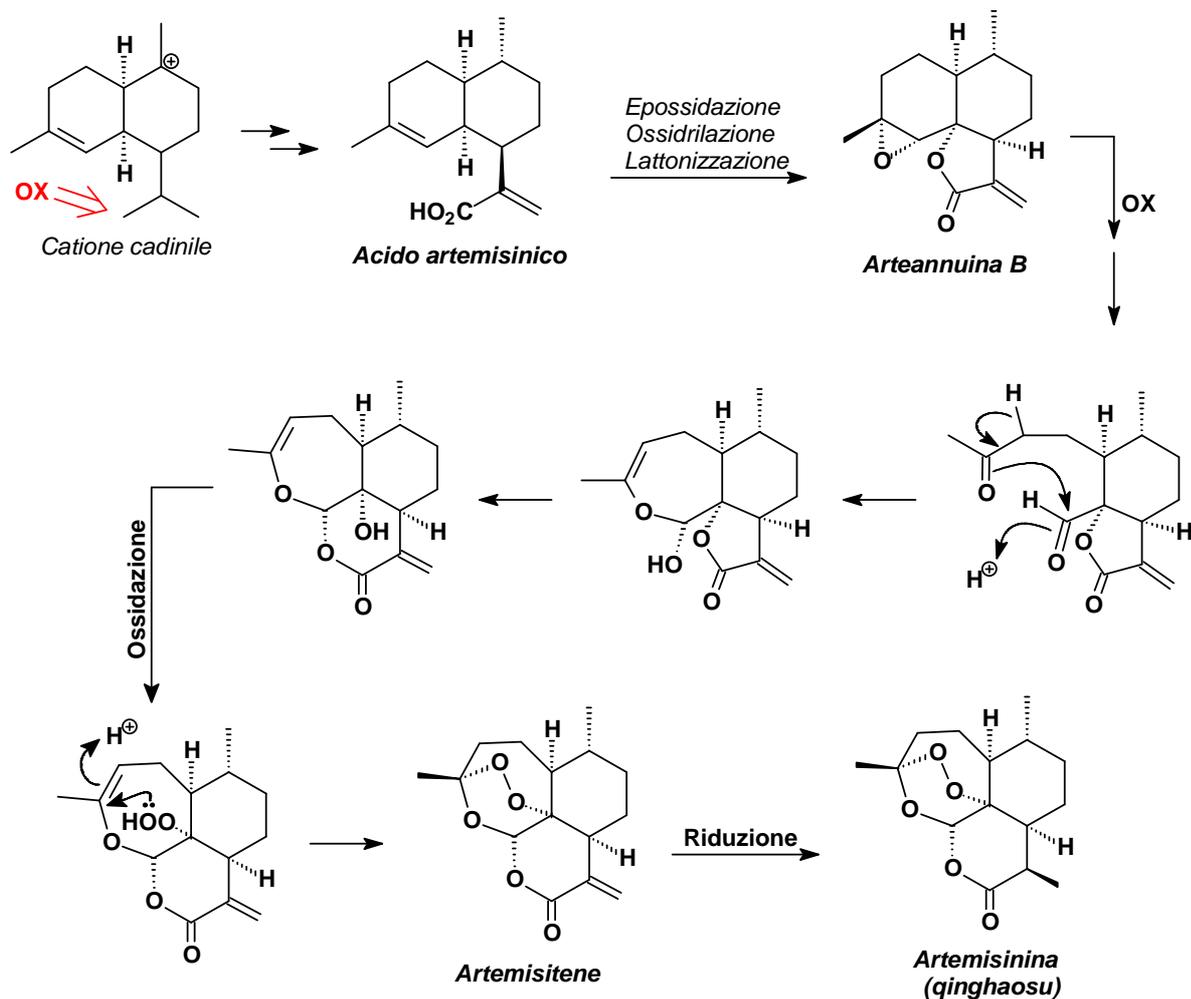
 $\gamma$ -bisabolene

Questi **epossidi bisabolenici** isomeri sono stati riconosciuti essere il componente principale del feromone di aggregazione della *Nezara viridula*, insetto infestante diverse coltivazioni come ad esempio quelle della soia.



In alcuni paesi il problema della *nezara v.* è così grave da necessitare adeguate contromisure al fine di salvaguardare le coltivazioni. Oggi sono disponibili diversi tipi di controllo biologico nei confronti di questo insetto, come ad esempio la cosiddetta "trappola a feromoni". Questa è costituita da un contenitore che permette solo l'ingresso dell'insetto, ed al cui interno sono presenti adeguate quantità degli epossidi bisabolenici, che, essendo appunto un feromone di aggregazione, attrae l'insetto all'interno del recipiente, intrappolandolo.

La cosa interessante è che i vegetali di cui si nutrono questi insetti non sembrano contenere dei precursori bisabolanici, per cui è ipotizzabile che la *Nezara* sia in grado di biosintetizzare questi epossidi sesquiterpenici. Questa ipotesi è sorretta dall'osservazione che anche altri insetti sono in grado di sintetizzare sostanze di natura terpenoidica, confermando ancora una volta che tale classe di composti non è relegata al solo mondo vegetale.

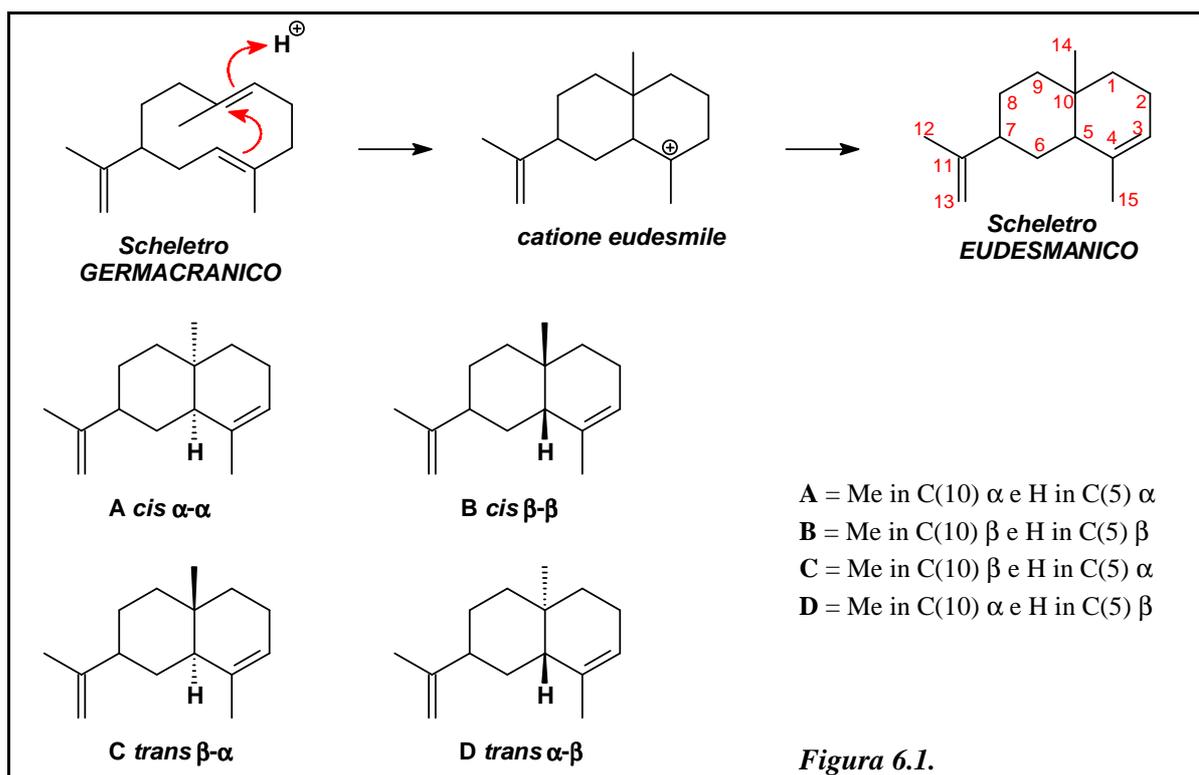
**Biosintesi dell'artemisinina**

L'*Artemisia annua* (Compositae), conosciuta come "qinghao" nella medicina tradizionale cinese, è stata utilizzata per secoli nel trattamento di febbri e malaria, a volte viene chiamata anche assenzio annuo o dolce ed è abbastanza diffusa sia in Cina che in Europa e nell'America del Nord e del Sud. Dalla pianta viene estratta l'artemisinina (qinghaosu), un sesquiterpene lattonico caratterizzato dalla presenza di un legame perossidico, fondamentale per l'attività biologica. Questa sostanza è il principio attivo che esplica l'attività antimalarica nel sangue di uomini affetti da malaria con un'azione schizontocida, senza causare particolari effetti tossici. La malaria è una malattia molto grave che in alcune zone della terra risulta essere endemica, causando ogni anno circa 2 milioni di morti. Gli agenti patogeni di questa malattia sono dei protozoi del genere *plasmodium* (*P. falciparum*) che entrano nel sistema circolatorio umano in seguito a punture di zanzare (ad es. la *z. anopheles*), tramite le loro secrezioni salivari. La quantità di artemisinina estratta dalla pianta *Artemisia annua* è alquanto bassa 0,06-0,16%, per cui molti chimici hanno rivolto l'attenzione alla sintesi organica di questa particolare molecola, ma generalmente con scarso successo.

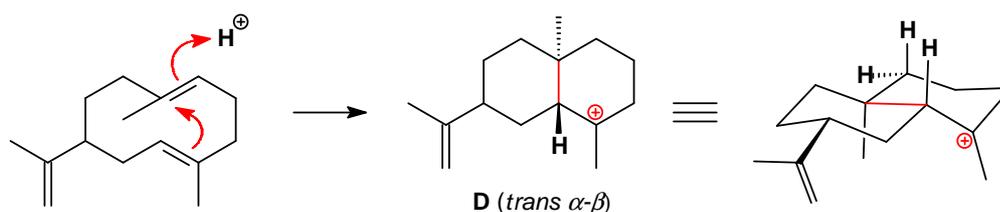
Per quanto riguarda i processi di ciclizzazione che si verificano nella formazione di sistemi policiclici, risulta particolarmente interessante osservare che questi si verificano sempre con una

particolare stereospecificità, la quale è una caratteristica fondamentale nella biosintesi dei metaboliti secondari. Nonostante per ogni ciclizzazione ci sia la possibilità di formare più stereoisomeri, tutte le reazioni di ciclizzazione sono altamente stereospecifiche.

Per esempio la ciclizzazione dello scheletro *germacranico* a scheletro *eudesmanico*, potenzialmente potrebbe portare a quattro diversi stereoisomeri (Figura 6.1).



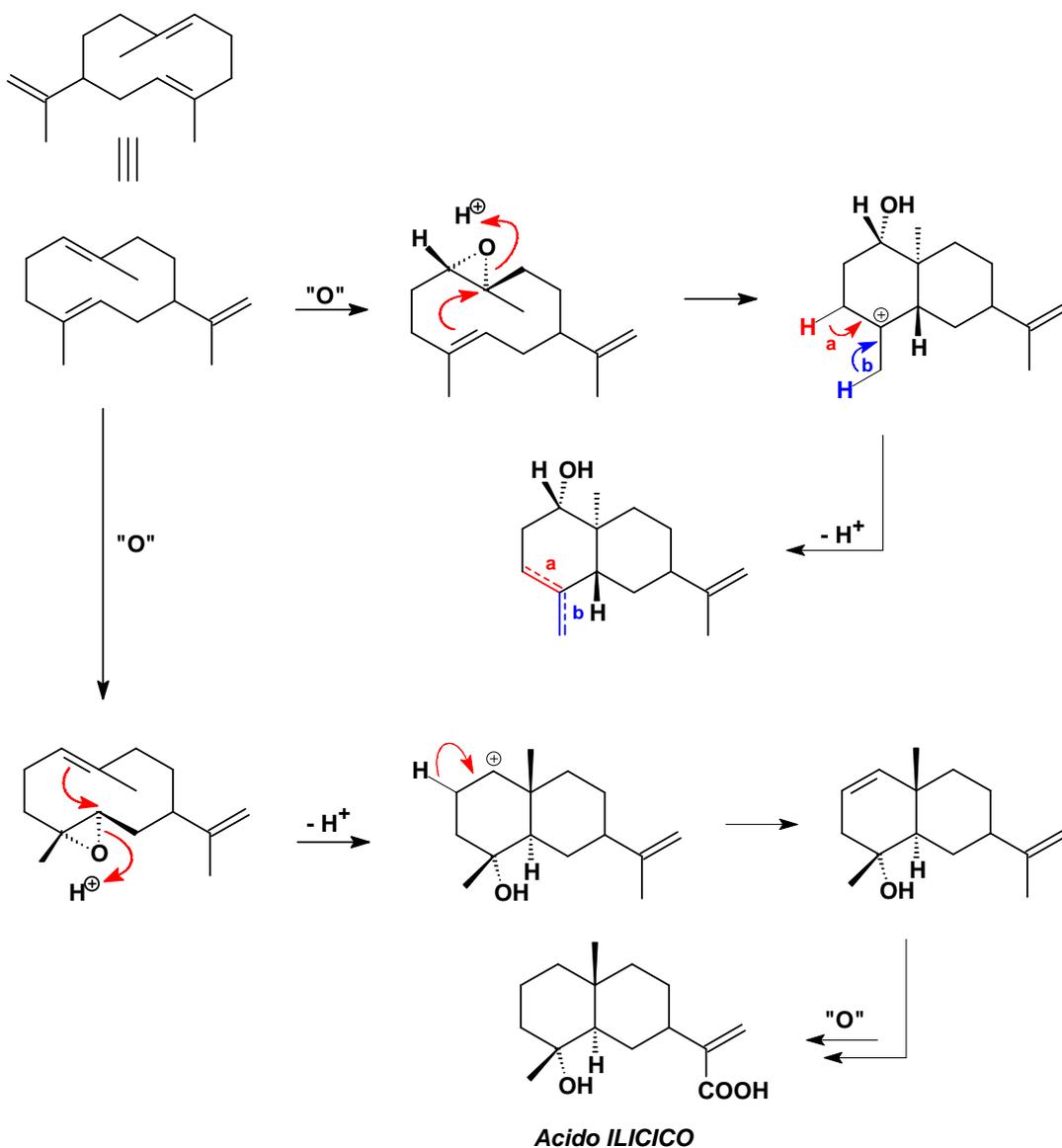
In realtà il prodotto di ciclizzazione **D** corrisponde allo scheletro eudesmanico più ricorrente nei composti naturali. Ciò implica che il governo stereospecifico, in questo passaggio biosintetico, favorisce una conformazione dello scheletro *germacranico* che conduce preferenzialmente alla molecola con struttura di tipo **D** come raffigurato nello schema riportato di seguito.

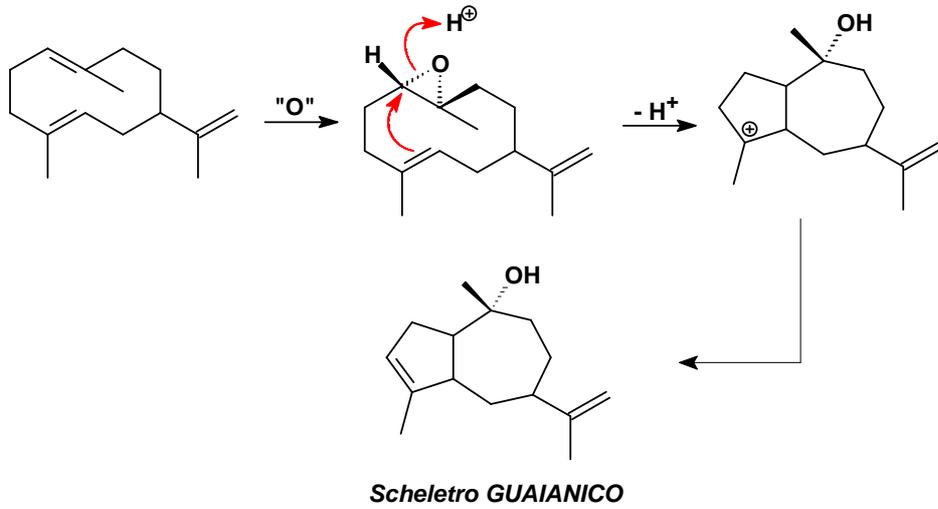
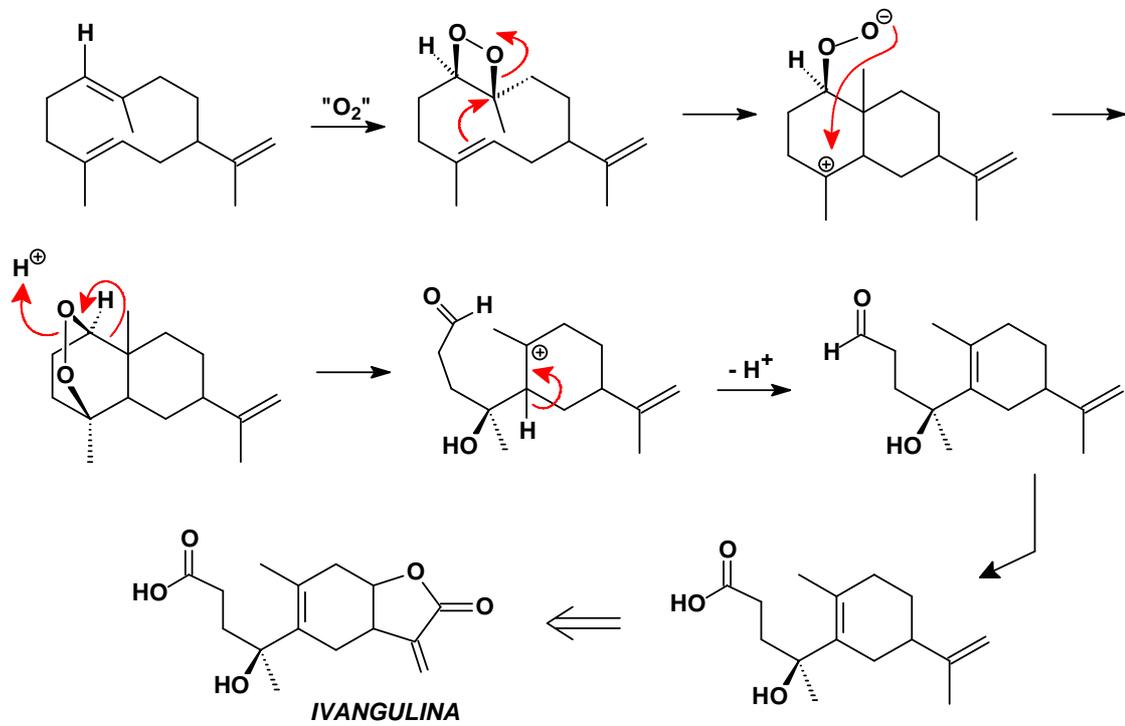


## Teorie biogenetiche dei composti ossigenati

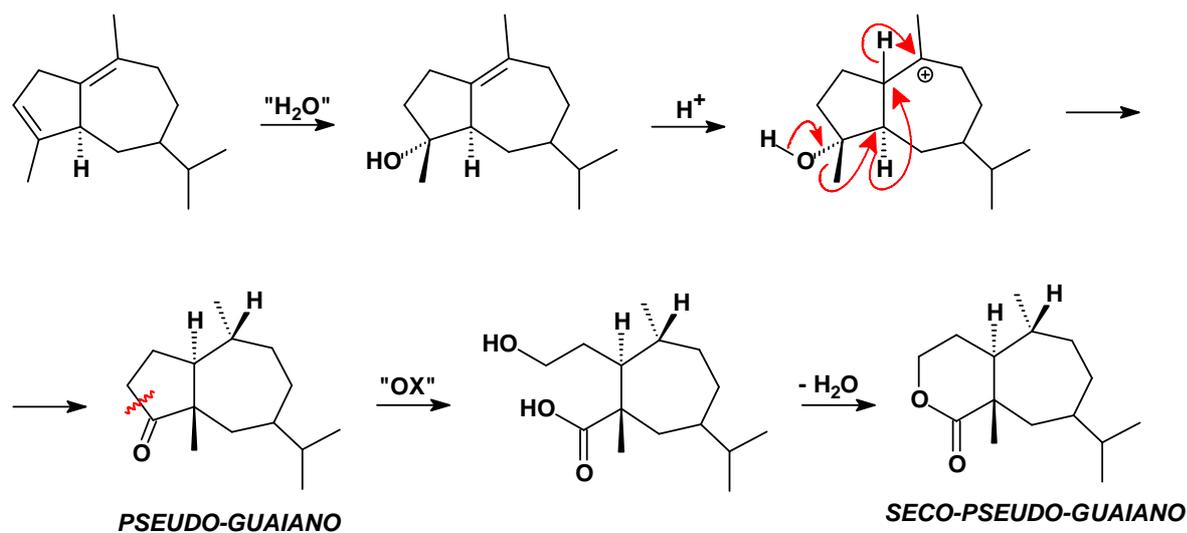
Per i composti sesquiterpenici che incorporano funzioni ossigenate sono state proposte ipotesi biogenetiche che prevedono degli intermedi ossigenati di varia natura (epossidi, perossidi, idroperossidi, etc.).

### Germacatriene $\rightarrow$ Eudesmani “via epossido”

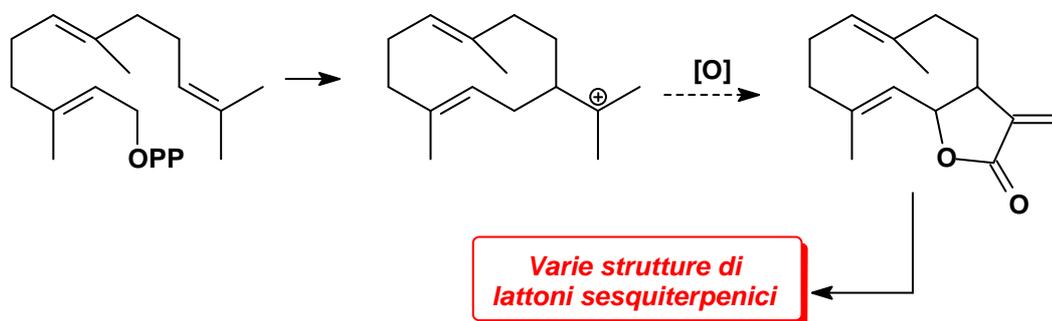


**Germacatriene → Guaiani “via eossido”****Germacatriene → Seco-eudesmani “via perossido”**

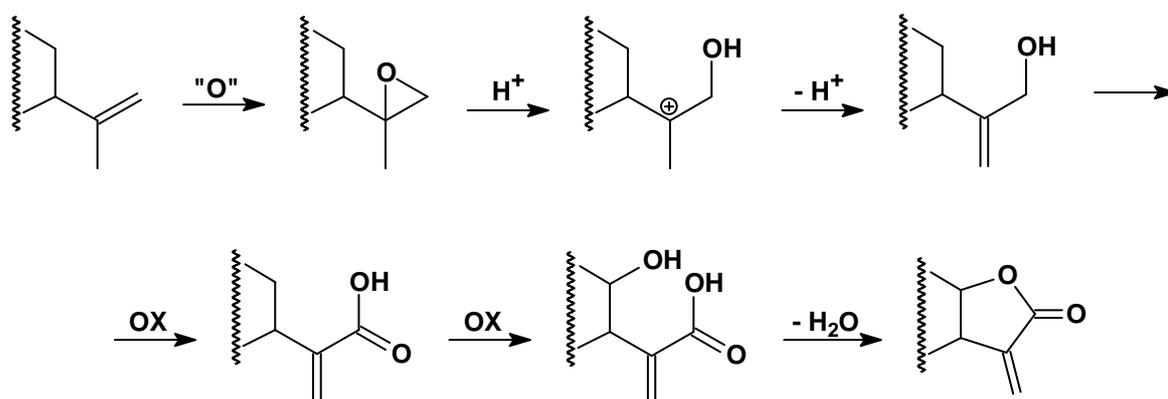
Gli pseudo-sesquiterpeni possiedono uno scheletro anomalo rispetto alla sequenza isoprenica a causa della migrazione di un metile nel processo biogenetico. Nell'esempio seguente si descrive una ipotesi biogenetica che parte da uno scheletro guaianico e conduce ad uno scheletro pseudo-guaianico (ad esempio l'*elenalina* – pag 49), il quale a sua volta viene trasformato in uno scheletro seco-pseudo-guaianico (ad esempio la *secoelenalina*) per rottura ossidativa di un legame C-C.



### Biogenesi di composti sesquiterpenici con un anello $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -lattonico

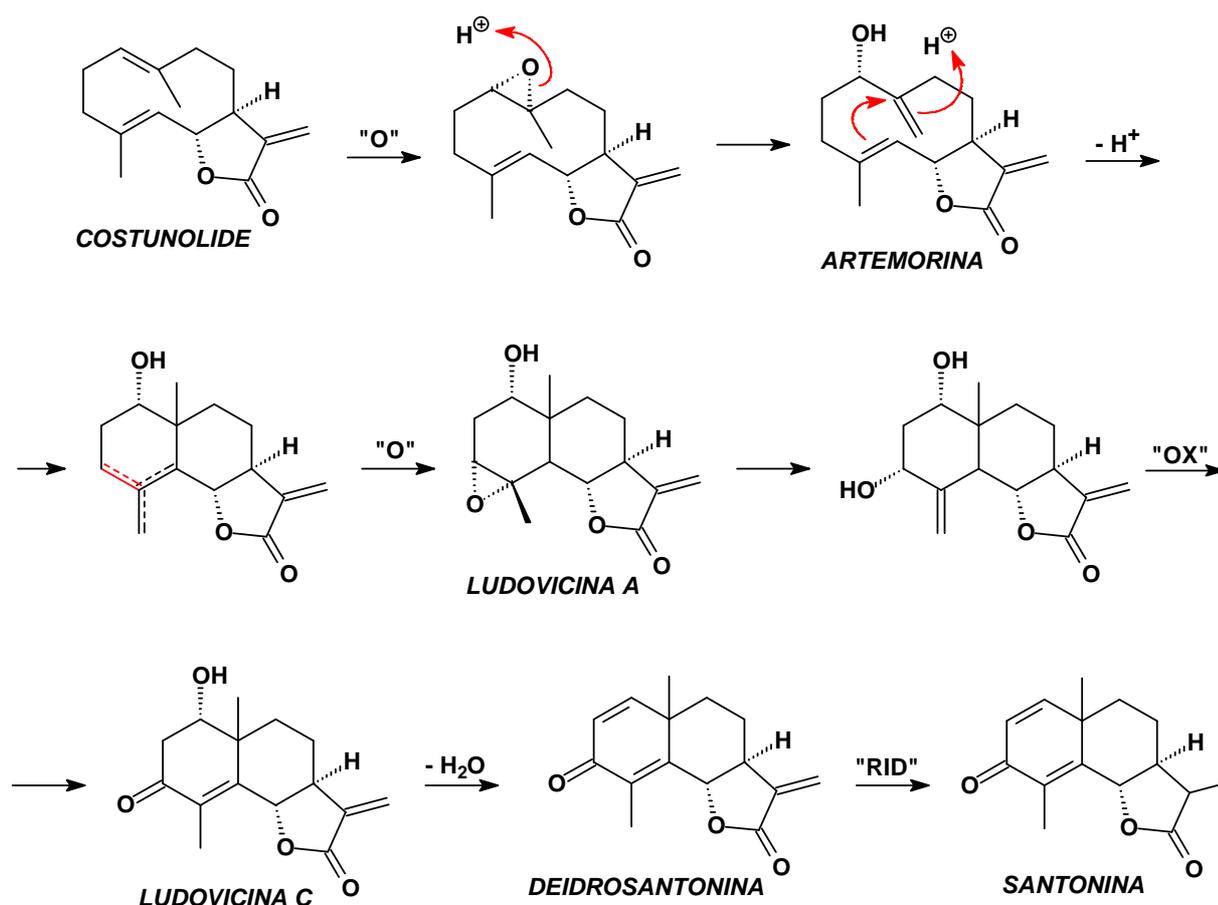


Tutti i composti naturali che incorporano un anello  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -lattonico derivano dal trans-trans-farnesil-pirofosfato. Questo subisce un processo di iniziazione e propagazione fino ad intermedio germacranico, il quale viene ossidato a germacranolide, da cui derivano tutti i sesquiterpeni lattonici. Nello schema 6.5 viene proposto un meccanismo di ossidazione del gruppo isopropilidenico a funzione  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -lattonica.



Schema 6.5.

L'attendibilità di una via biogenetica ipotizzata può essere verificata, a volte, quando alcuni supposti intermedi e precursori vengono isolati ed identificati. Uno di questi casi è la trasformazione biogenetica di un germacranolide, il *Costunolide*, in un eudesmanolide come la *Santonina* (Schema 6.6).

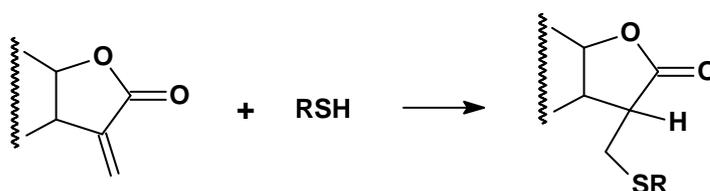


Schema 6.6

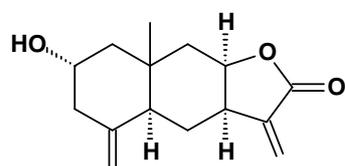
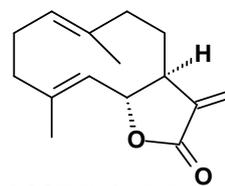
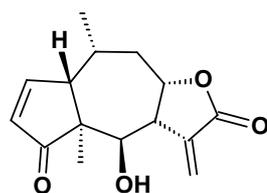
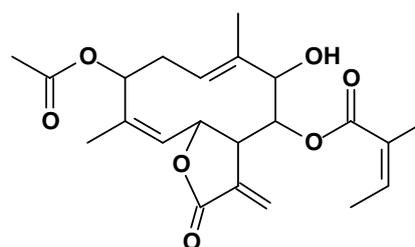
Questa via biosintetica è suffragata dal fatto che artemorina, ludovicina (A, B e C), e deidrosantonina sono composti isolati dalle stesse piante da cui vengono isolati sia il costunolide che le santonine.

Come detto questi composti hanno diverse attività farmacologiche fra cui quella antineoplastica, che si esplicherebbe grazie ad una capacità alchilante verso le proteine sulfidrilate.

Il gruppo  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -lattonico interagisce infatti con i gruppi tiolici della cisteina (rappresentato nello schema seguente con RSH) innescando un processo di addizione tipo Michael, formando degli addotti stabili che bloccherebbero gli enzimi preposti alla divisione cellulare.



Alcuni sesquiterpeni  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -lattonici con alta attività citotossica sono riportati di seguito:

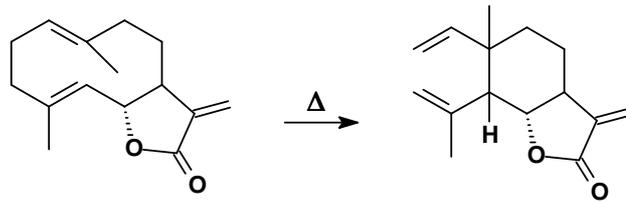
**IVALINA****COSTUNOLIDE****ELENALINA****EUPATOCUNINA**

## Artefatti dovuti ai metodi di isolamento dei metaboliti secondari: formazione di addotti.

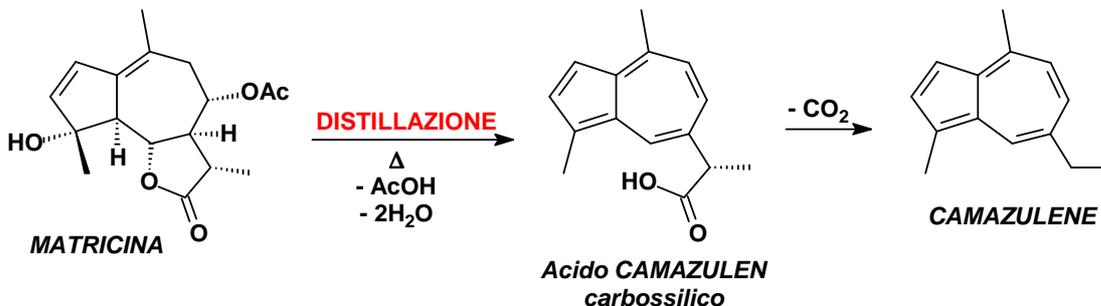
In genere, l'isolamento dei metaboliti secondari da una pianta o qualsivoglia organismo biologico, prevede particolari manipolazioni, che non sempre riescono a garantire il mantenimento delle strutture originarie dei metaboliti stessi.

Può infatti accadere che alcune sostanze non siano effettivamente biosintetizzate dai substrati da cui sono state isolate, come ad esempio una pianta, ma costituiscono prodotti di trasformazione artificiale a seguito delle operazioni chimico-fisiche eseguite sul materiale naturale di origine; la distillazione in corrente di vapore, la cromatografia ed i trattamenti termici sono esempi di operazioni chimico-fisiche che possono indurre artefatti. Due esempi classici di artefatti che portano a prodotti di riarrangiamento sono:

1. **Trasposizione di Cope** (riarrangiamento [3,3] sigmatropico di 1,5-dieni, vedere anche pag. 38)



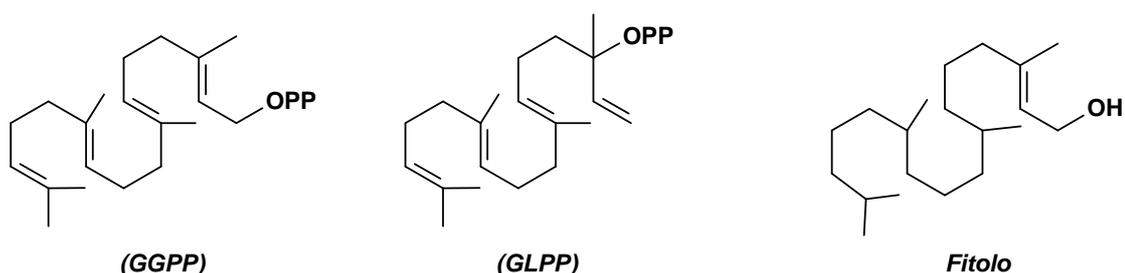
2. **Aromatizzazione**



## 7. DITERPENI



Tutti i diterpeni naturali provengono da un precursore comune: il **geranilgeranilpirofosfato (GGPP)**, un terpene a venti atomi di carbonio che viene biosintetizzato a partire da quattro unità isopreniche unite tra loro testa-coda con un meccanismo identico a quello già descritto per la biosintesi del geranilpirofosfato e del farnesilpirofosfato.



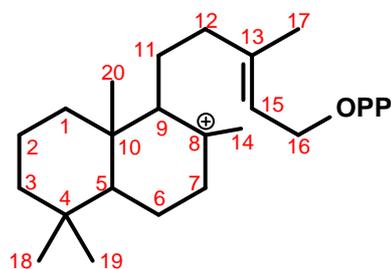
E' bene notare come in alcuni casi, al fine di razionalizzare alcuni processi metabolici, anche l'isomero **geranil-linalilpirofosfato (GLPP)** possa essere considerato un precursore dei diterpeni.

Fino ad oggi sono stati isolati ed identificati oltre mille diterpeni naturali che possono essere raggruppati in venti classi principali in relazione al loro scheletro carbonioso. In queste venti classi sono distribuiti circa l'85% dei diterpeni. I rimanenti composti, che possiedono uno scheletro meno comune, sono stati collocati in quattro sottoclassi. Tutti i diterpeni naturali provengono da processi di iniziazione, propagazione e terminazione a partire dal geranilgeranilpirofosfato.

Un aspetto importante della biogenesi dei diterpeni è costituito dalla contemporanea presenza di due serie stereochimiche, normale e antipoda (ai nomi della serie antipoda vengono aggiunti i prefissi enantio- o ent-), che per semplicità sono stati raggruppati nella stessa classe.

Il geranilgeranilpirofosfato può dare origine a tre differenti classi di scheletri diterpenici: aciclici, policiclici e macrociclici. I composti che possiedono uno scheletro carbonioso aciclico sono poco frequenti; uno dei più diffusi è il geranilgeraniolo che ovviamente viene prodotto per semplice defosforilazione del geranilgeranilpirofosfato. I composti che possiedono uno scheletro policiclico sono largamente distribuiti in natura; sono stati isolati ed identificati composti con solo due anelli fino a composti con ben cinque anelli. Meno frequenti sono i composti di natura macrociclica ed in questi casi l'anello è spesso formato da ben quattordici atomi di carbonio.

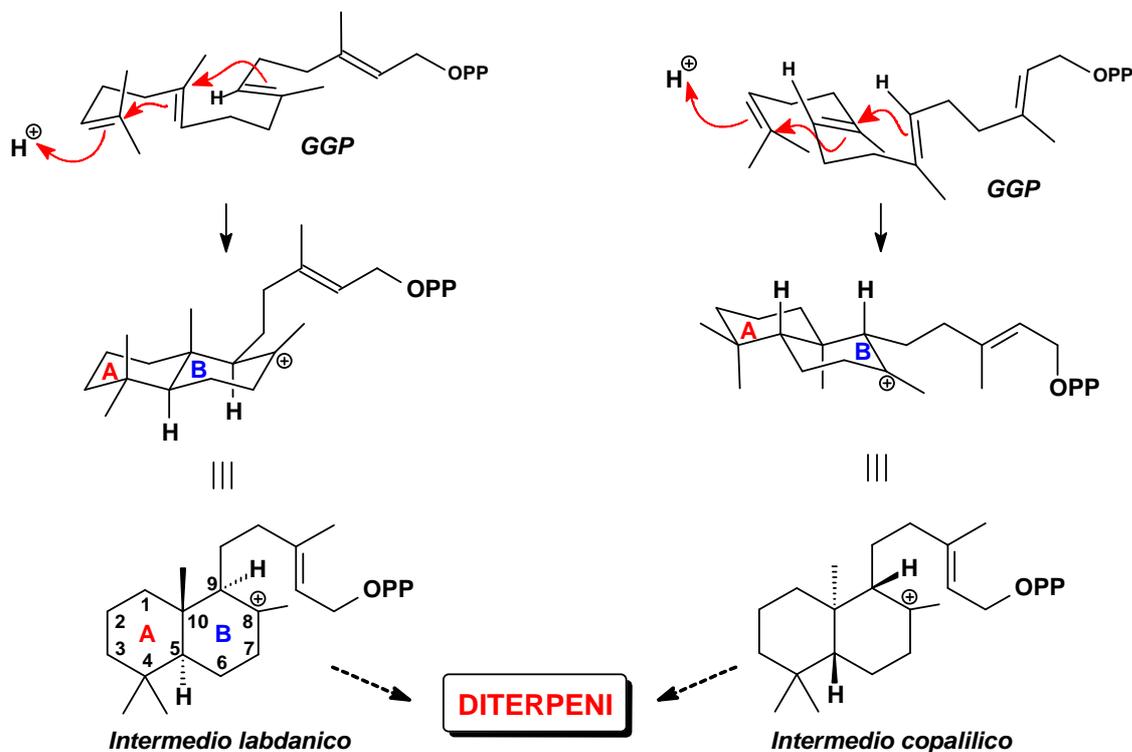
Tra i composti che possiedono un nucleo carbonioso policiclico gioca un ruolo fondamentale l'intermedio **labdanico** che incorpora un centro positivo in C-8 ed un pirofosfato allilico che può generare un carbocatione delocalizzato su tre centri: C-13, C-15 e C-16.



**Intermedio LABDANICO**

Questo intermedio può dunque dare origine sia a prodotti di terminazione che a prodotti di propagazione, con formazione di composti derivanti da processi di semplice ciclizzazione o ciclizzazione con trasposizioni. La maggior parte degli scheletri diterpenici policiclici biogeneticamente proviene dall'intermedio labdanico.

Lo scheletro carbonioso del labdano viene generato a partire dal geranylgeranylpirofosfato, tramite due processi di ciclizzazione dienica, che portano rispettivamente alla formazione degli anelli A e B di tale sistema (schema 7.1).

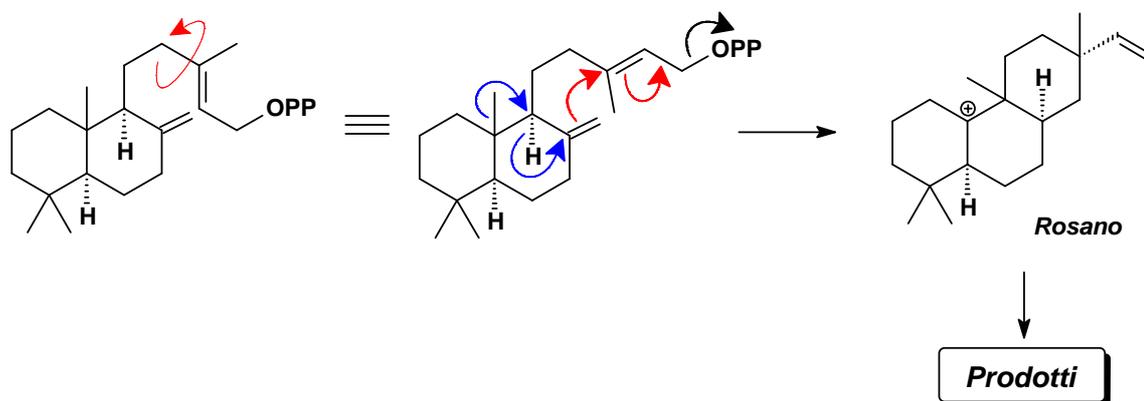


**Schema 7.1.**

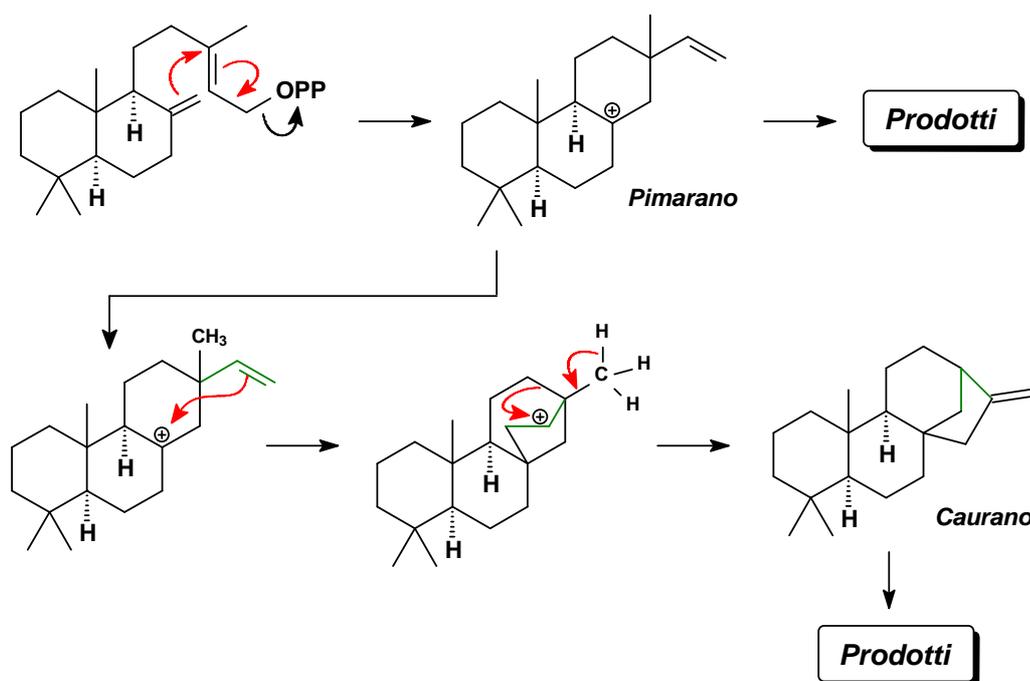
L'intermedio labdanico e l'intermedio copalilico sono enantiomeri.

I processi di ciclizzazione che conducono alla formazione dell'intermedio labdanico possono condurre sia alla formazione di isomeri  $5\alpha$ ,  $10\beta$  (più comuni in natura) che di isomeri  $5\beta$ ,  $10\alpha$ , a livello della giunzione degli anelli A-B. In generale, i processi di trasformazione dell'intermedio labdanico possono essere schematizzati nel modo seguente e prevedono:

- trasposizione di gruppi posizionati nell'anello A (es. **rosano**, schema 7.2),
- ciclizzazione che coinvolge i gruppi che andranno a concorrere alla formazione del nuovo anello (es. **pimarano**) o dei nuovi anelli (es. **caurano**) (Schema 7.3).



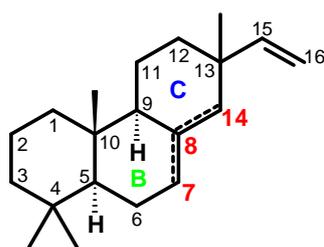
Schema 7.2.



Schema 7.3.

I meccanismi proposti per la formazione dei tre scheletri, rosano, pimarano e caurano, sono stati confermati con esperimenti di biosintesi condotti in presenza di precursori radioattivi (es. acido acetico, acido mevalonico). Inoltre la natura dei prodotti finali è in accordo con i meccanismi formulati.

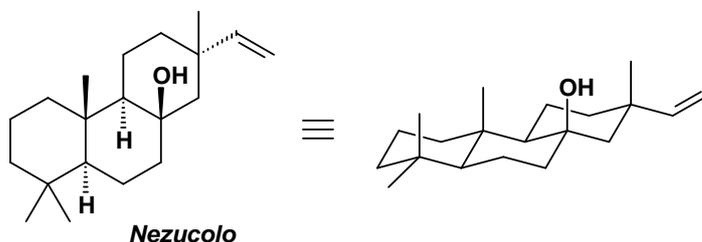
Ad esempio molti composti con uno scheletro pimarano contengono due doppi legami: uno interessa gli atomi di carbonio C-15 e C-16, l'altro, endociclico, può essere delocalizzato tra i carboni C-7, C-8 e C-14.



**Scheletro pimarano**

Il doppio legame tra C-15 e C-16 viene formato durante l'eliminazione del gruppo -OPP dell'intermedio **labdanico**, mentre il doppio legame endociclico tra C-7 e C-8 o tra C-8 e C-14 si potrebbe formare in seguito al processo di terminazione del carbocatione che si era generato in C-8. Da notare che non sono stati mai isolati ed identificati diterpeni naturali riferibili allo scheletro del pimarano che presentano un doppio legame tra C-8 e C-9, mentre da un punto di vista rigorosamente chimico, la presenza di un carbocatione in C-8 porterebbe ad ipotizzare ad una deprotonazione in C-9, con conseguente formazione di un doppio legame tetrasostituito ("in teoria" termodinamicamente più stabile).

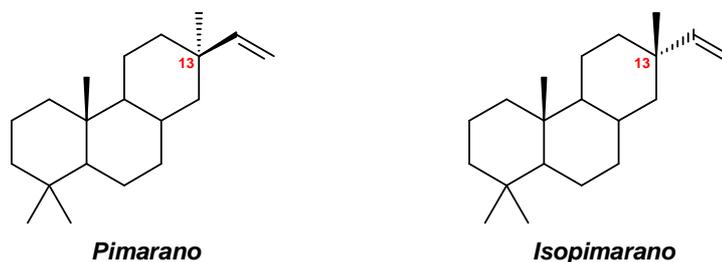
E' noto invece un solo diterpene che in C-8 contiene una funzione alcolica  $\beta$  assiale, il **nezucolo**.



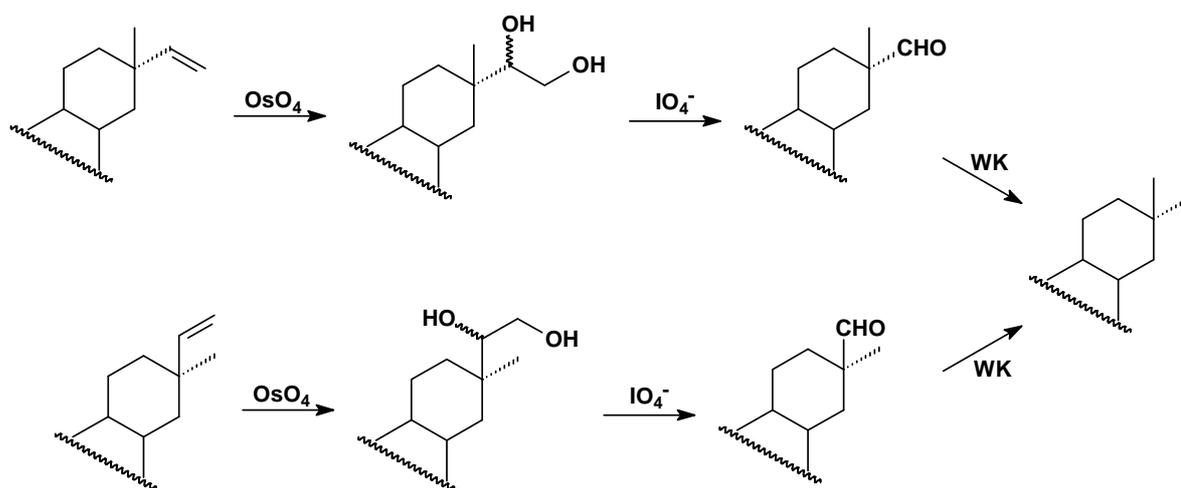
**Nezucolo**

Un'altra osservazione importante è che durante il processo di ciclizzazione che porta allo scheletro del **pimarano** (Schema 7.3), l'atomo di carbonio C-13 del doppio legame dello scheletro **labdanico** può subire un attacco da entrambe le facce. La catena laterale è infatti in grado di ruotare per dare due conformazioni diverse, dalle quali hanno origine lo scheletro **pimarico** ed

*isopimarico*. Da notare che le due serie sono epimere in C-13.



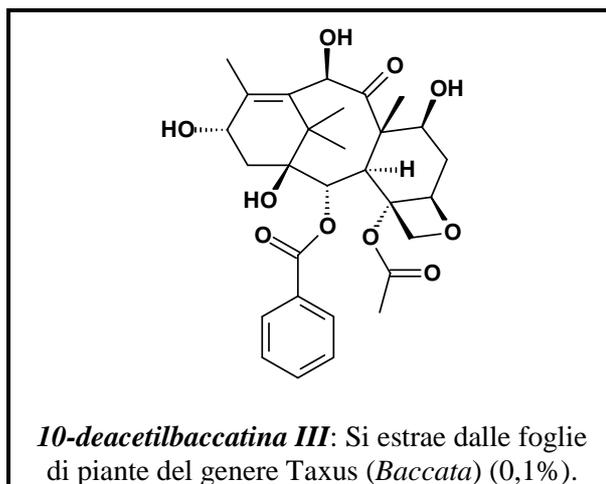
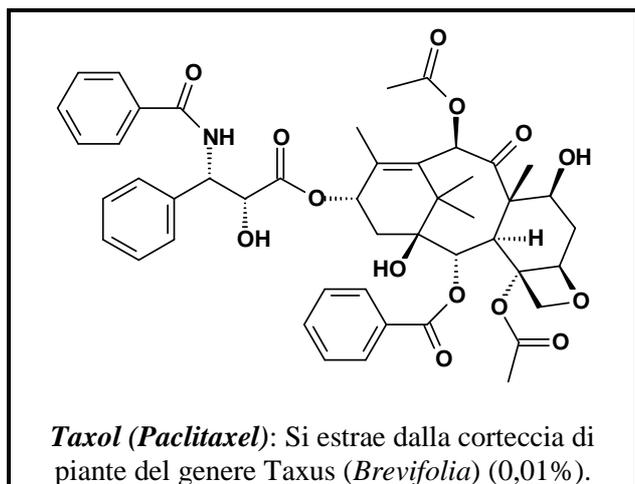
Composti della serie pimarica ed isopimarica sono stati correlati tra loro sfruttando una serie di trasformazioni chimiche, che portano alla formazione di un composto *nor*-diterpenico (Schema 7.4).



**Schema 7.4.**

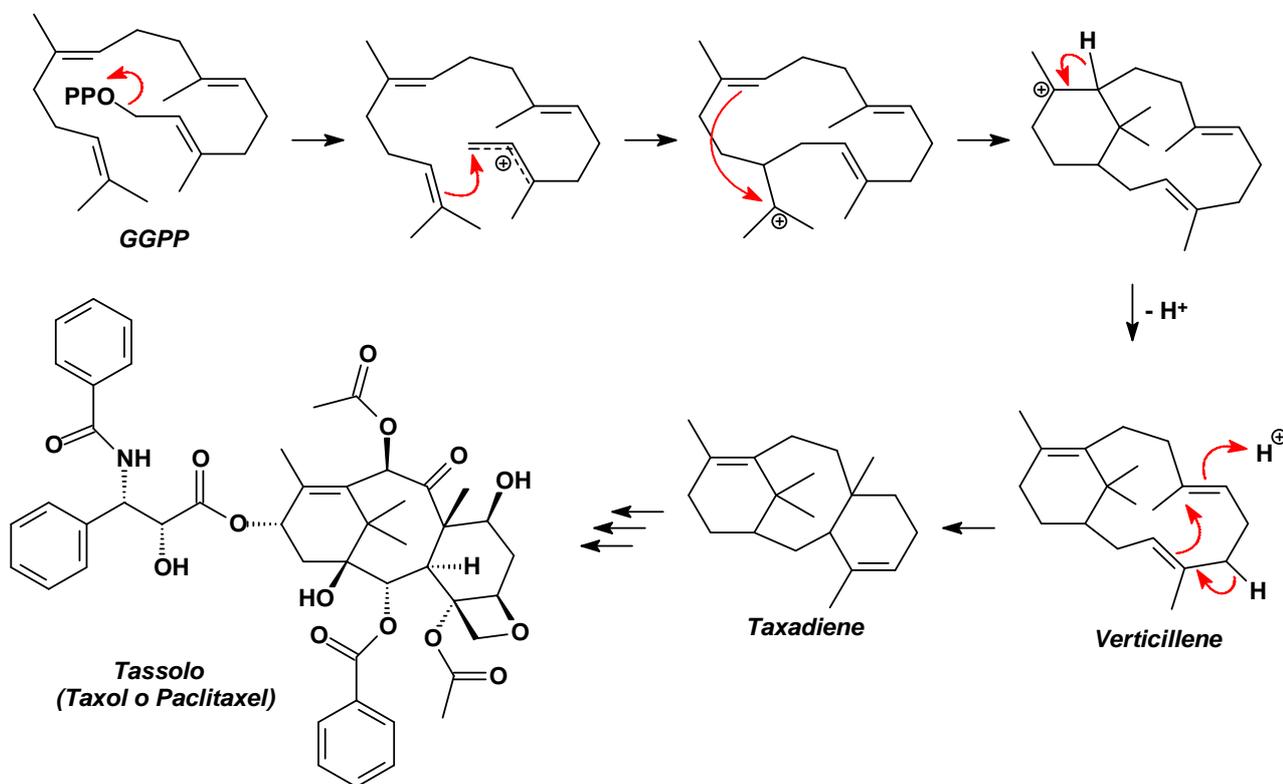
Molte piante del genere *Pinus* producono resine prevalentemente costituite da diterpeni tricyclici e tetracyclici in cui spesso composti pimarici ed isopimarici risultano presenti in larga maggioranza. La possibilità di separare da queste miscele i singoli componenti allo stato puro è legata al grado di funzionalizzazione presente nei singoli composti. Spesso nella stessa miscela è possibile trovare composti che differiscono solo per la posizione del doppio legame endociclico. Le isomerie più frequenti sono legate alle posizioni C-7/C-8 ( $\Delta^7$ ) e C-8/C-14 ( $\Delta^{8-14}$ ).

## TAXOL (tassolo): un diterpene importante.



Il **tassolo** è un diterpene molto interessante, infatti dal punto di vista chimico possiede uno scheletro carbonioso molto complesso incorporando ben 9 centri chirali. Sono inoltre presenti numerose funzioni ossigenate ed una catena laterale importante ai fini dell'attività.

Biosinteticamente lo scheletro del tassano deriva da geranyl-geranyl-pirofosfato attraverso il solito meccanismo carbocationico che coinvolge tre successive ciclizzazioni (Schema 7.5). La catena laterale del taxolo, che contiene anelli aromatici, deriva dallo shikimato *via* fenilalanina.



Schema 7.5.

Notizie sugli effetti tossici del Tasso sono noti già da molto tempo. E' possibile ritrovare in alcuni manoscritti del I secolo D.C., quali "DeMateria medica" di **Dissorides**, descrizioni di questa classe di piante e degli effetti tossici a livello umano. In epoca successiva, **Giulio Cesare**, nella narrazione "De Bello Gallico" riferisce delle vicende di Catuvolcus, capo della tribù degli Eburoni, che si suicidò ingerendo bacche di Tasso.

Al di là delle considerazioni storiche, è da notare come i primi studi di tipo fitochimico sul genere *Taxus*, siano stati effettuati nel 1856 da Lucas, il quale riporta l'isolamento di miscele di composti a cui attribuisce una struttura di tipo alcaloideo (secondo le vecchie definizioni di alcaloide era sufficiente la presenza di un azoto: anche se effettivamente presente, questo azoto è di natura amidica). Nel tempo le cose si sono chiarite e sono noti molti contributi sulla determinazione della struttura di queste sostanze nel periodo tra il 1856 e il 1943. In realtà oggi queste sostanze sono classificate nella classe dei **diterpeni** e non in quella degli alcaloidi; ad esempio la "taxina", il principio tossico isolato dal tasso comune, è risultata una miscela di almeno undici composti, tutti basati sullo scheletro del **taxadiene**. La struttura del nucleo base dei tassani fu correttamente stabilita da tre distinti gruppi di ricercatori nel 1963 (Lythogae, Nakanishi e Uyeo).

Il tassolo o paclitaxel (Taxol®) è una molecola molto importante per il trattamento di alcune forme di cancro che non rispondono ad altri rimedi farmacologici (ad es. tumori alle ovaie, sperimentazione clinica contro i tumori metastatici della mammella).



*Una pianta di tasso in un giardino*

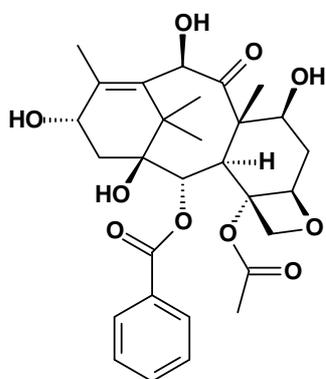


*Bacche e foglie di Tasso*

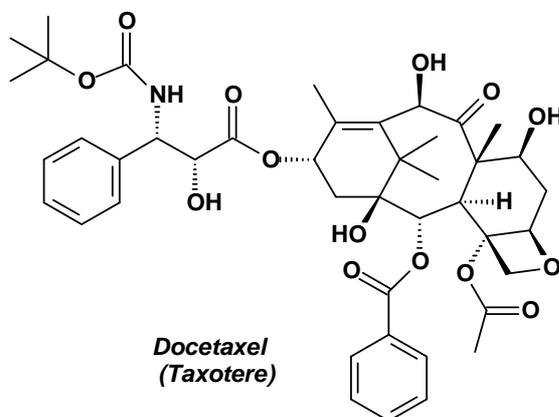
Il fabbisogno di tassolo a livello mondiale è molto elevato (Negli USA si aggira tra i 100 e 200 Kg l'anno), purtroppo per ottenerne un solo grammo occorre decorticare 3 alberi vecchi di 100 anni (che poi muoiono). Di conseguenza per soddisfare tali richieste sarebbe necessario un sacrificio in piante di Tasso così alto che nel giro di pochi anni se ne metterebbe a rischio l'esistenza stessa.

D'altra parte, nonostante siano state messe a punto diverse sintesi totali del tassolo, la via sintetica risulta impraticabile per i troppi passaggi chimici e rese finali bassissime, che porterebbero a costi di produzione troppo elevati. Per fortuna è possibile isolare un precursore del tassolo, la *10-deacetilbaccatina III*, dalle foglie del Tasso; l'operazione di raccolta di una certa percentuale di foglie non danneggia la pianta, che dunque viene preservata.

Tramite un processo semisintetico, alla *10-deacetilbaccatina III* viene aggiunta la catena laterale, ottenendo così una molecola identica al tassolo naturale. Attualmente la via semisintetica è quella utilizzata industrialmente per la preparazione del tassolo e dei suoi analoghi strutturali come ad esempio il docetaxel (Taxotere®).



**10-deacetilbaccatina III**

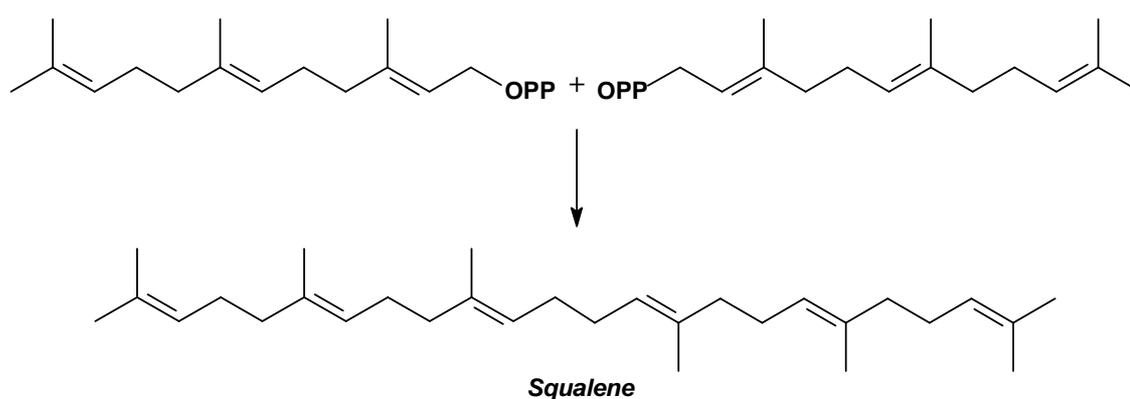


**Docetaxel  
(Taxotere)**

## 8. TRITERPENI E STEROIDI



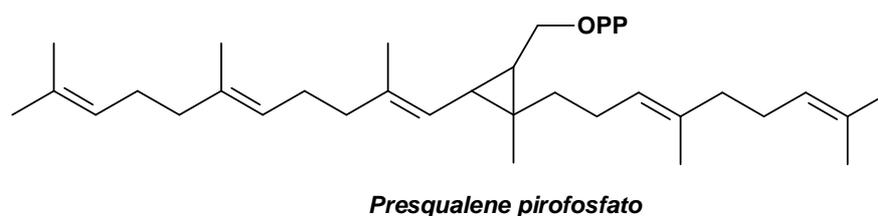
I triterpeni sono composti a 30 atomi di carbonio che provengono biogeneticamente da un composto lineare chiamato **squalene**. Lo squalene, il cui nome deriva dal fatto che è stato isolato la prima volta dalla frazione non saponificabile dell'olio di fegato di squalo, è un composto che si forma biogeneticamente da due unità di farnesil-pirofosfato. La particolarità di questa biosintesi è che le due unità non si condensano testa-coda, ma testa-testa (Schema 8.1).



Schema 8.1.

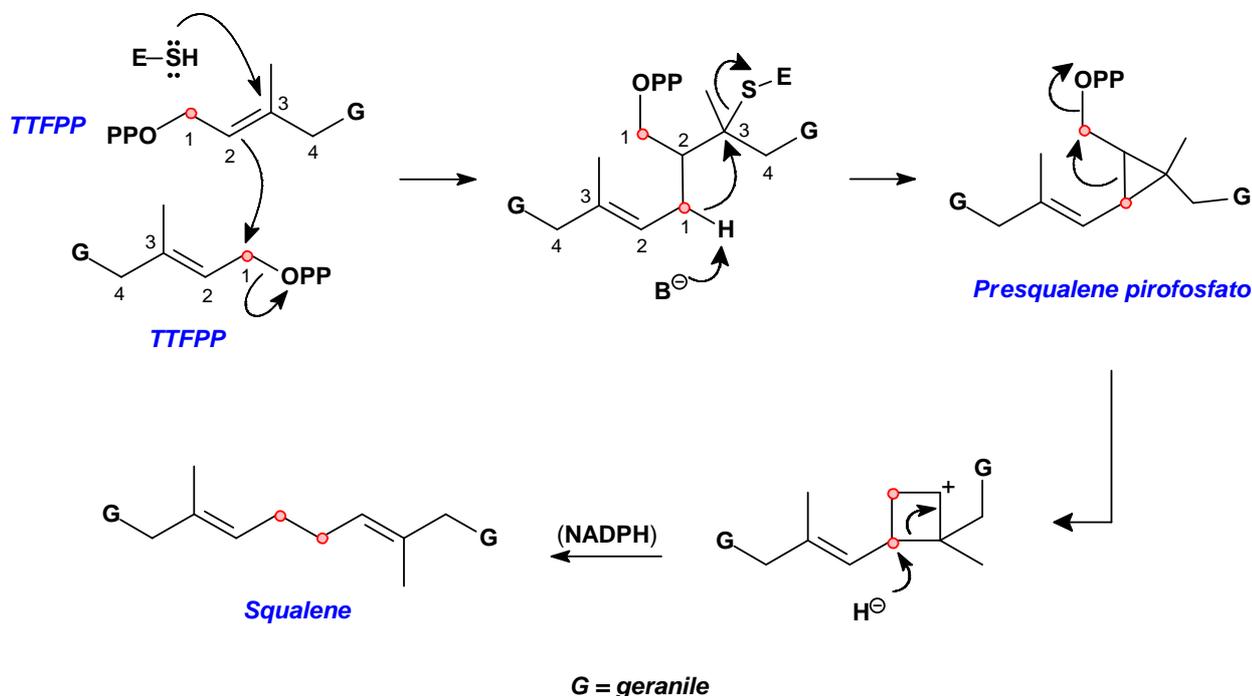
### Formazione del precursore ciclopropanico

L'origine dello squalene, da due unità di farnesile, è stata a lungo studiata ed è stata elucidata solo quando è stato isolato un composto ciclopropanico, chiamato **presqualene pirofosfato**, che *in vitro* ed *in vivo* viene trasformato in squalene.



Sono stati effettuati molti studi e proposti diversi schemi biosintetici dello squalene.<sup>(\*)</sup> Un possibile

meccanismo biosintetico dello squalene, attraverso la formazione dell'intermedio presqualene pirofosfato, è riportato nello schema 8.2:



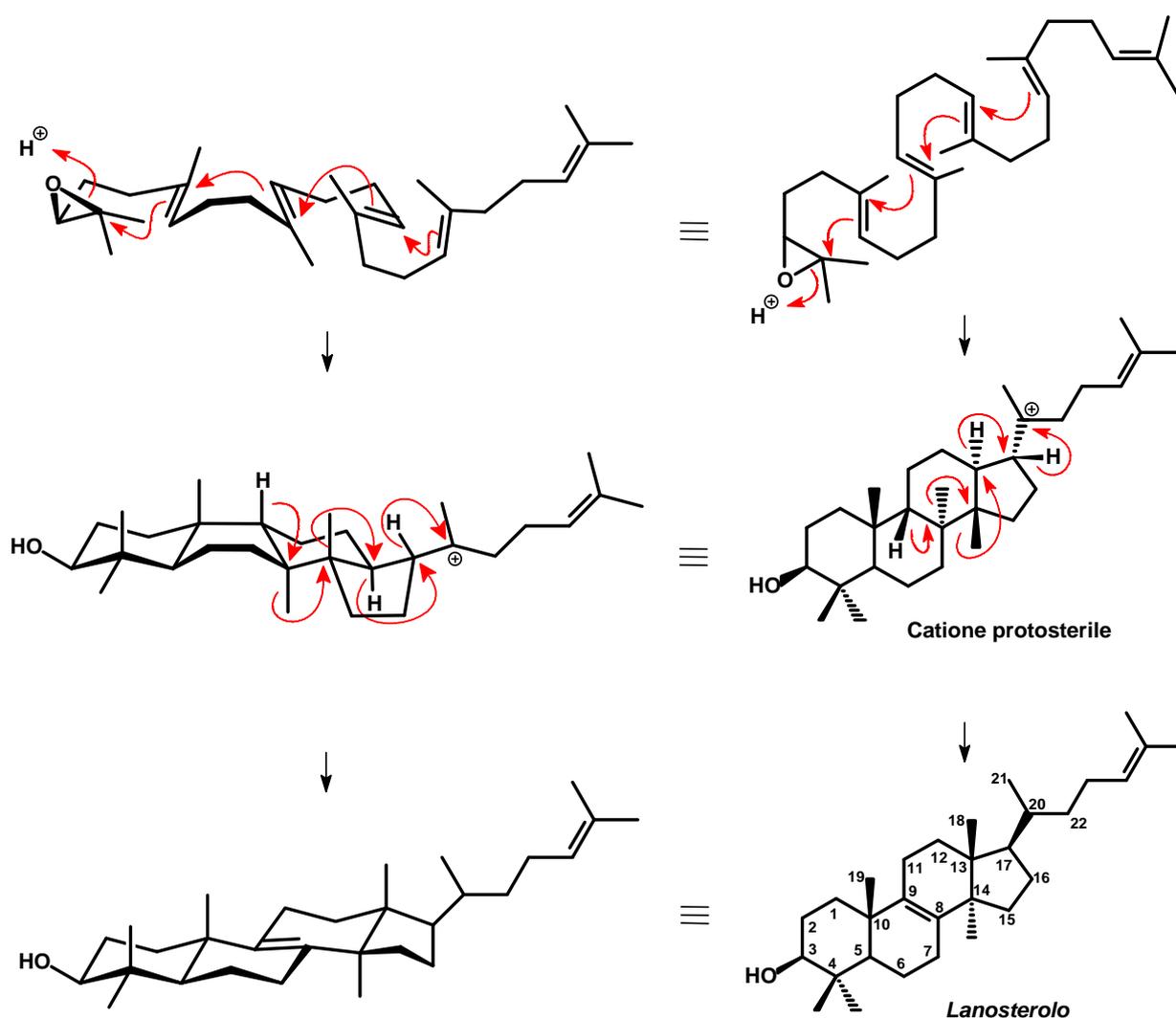
**Schema 8.2.** (\*) G. Popjak, J. W. Cornforth *Biochem. J.* **1966**, 553; W. W. Epstein, H. C. Rilling *J. Biol. Chem.* **1970**, 4597-4605; E. E. Van Tamelen, M A Schwartz *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, 1780-1782; C. D. Poulter *Acc. Chem. Res.*, **1990**, 70-77; B. D. Levy *J. Biol. Chem.* **2006**, 9490-9497.

Da notare che, inizialmente, i carboni coinvolti nella formazione del legame C-C tra le due unità farnesile corrispondono al C-1 di un'unità ed al C-2 della seconda unità. Di seguito si verificano dei meccanismi di trasposizione sugli intermedi ciclici, che portano, come risultato finale, alla molecola dello squalene, in cui le due unità farnesile sono entrambe unite attraverso il C-1. La trasformazione dello squalene in triterpeni e quindi in steroidi è un processo molto studiato dai chimici. La ciclizzazione dello squalene avviene attraverso una iniziale epossidazione. L'eossido viene protonato e quindi attaccato dai doppi legami in un processo di ciclizzazione dienica. I componenti della famiglia dei triterpeni sono numerosi, ma tenendo presente il numero degli atomi di carbonio in confronto ad esempio con quello dei sesquiterpeni, si vede che tutto sommato gli scheletri esistenti sono un numero limitato. Lo squalene è un composto estremamente flessibile e può assumere diverse conformazioni. Tali conformazioni determinano, durante il processo di ciclizzazione, la formazione di diversi scheletri carbociclici.

Innanzitutto possiamo distinguere i triterpeni in due grandi gruppi: i **triterpeni tetraciclici** e i **triterpeni pentaciclici**.

## Triterpeni tetraciclici

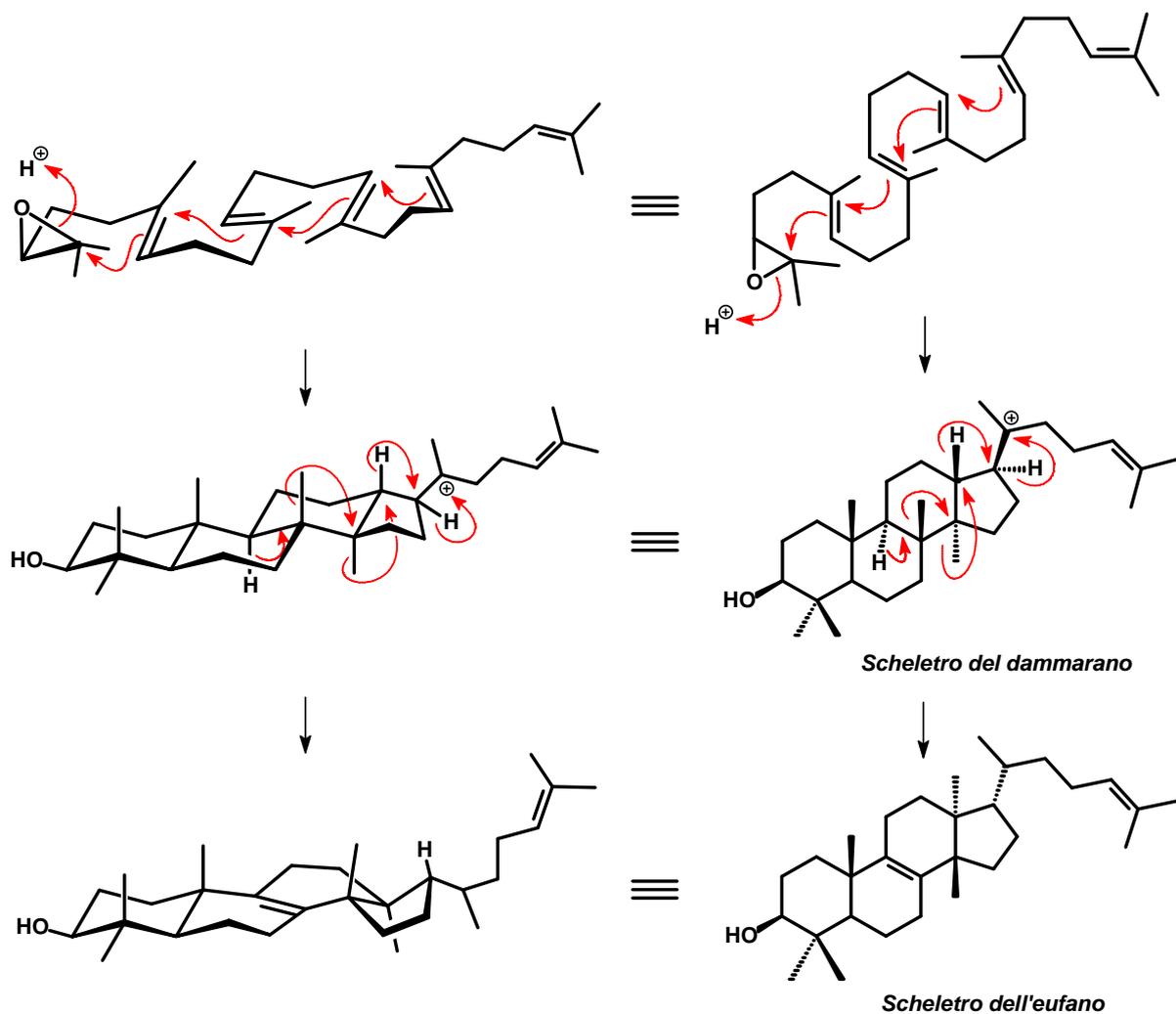
I triterpeni tetraciclici sono molto importanti da un punto di vista biologico in quanto sono i precursori di tutti gli ormoni steroidei. Fra tutti gli scheletri carbociclici che possono formarsi dallo squalene, quello che sicuramente è il più importante è il **lanostano** che proviene da un ripiegamento della catena dello squalene secondo una conformazione del tipo sedia-barca-sedia-barca-catena (Schema 8.3).



Schema 8.3.

Altri scheletri importanti, provengono da una conformazione dello squalene di tipo sedia-sedia-sedia-barca-catena, come ad esempio il **dammarano** e l'**eufano**.

Nello schema 8.4 viene riportato il meccanismo della ciclizzazione e le trasposizioni che si verificano nella biosintesi di questi due composti.



*Schema 8.4.*

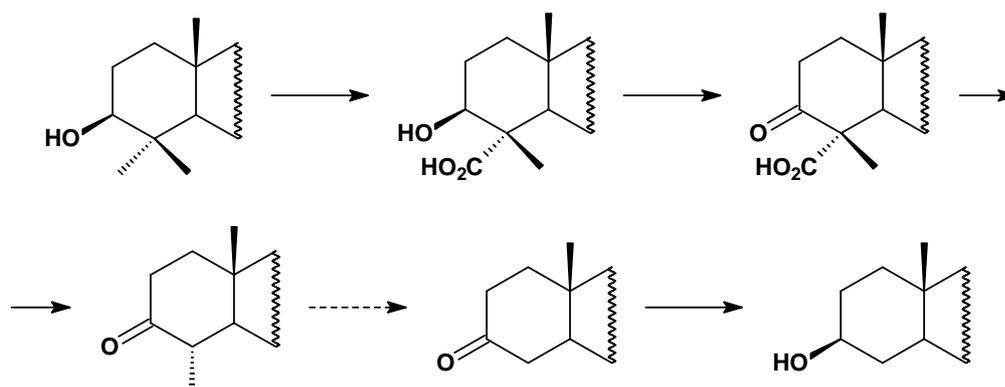
## Steroidi e steroli

Il lanosterolo è il precursore diretto degli steroli e degli steroidi. Normalmente per steroli s'intendono i composti tetraciclici con una catena laterale di almeno 8 carboni, mentre negli steroidi la catena laterale è stata parzialmente o totalmente degradata. Nella trasformazione lanosterolo  $\rightarrow$  steroli/steroidi si ha una modificazione per quanto riguarda il numero degli atomi di carbonio dello scheletro.

Nei vertebrati il lanosterolo viene trasformato in colesterolo che poi funge da precursore di numerosi steroidi. La biotrasformazione lanosterolo  $\rightarrow$  colesterolo avviene in diversi stadi: riduzione del  $\Delta^{24}$ , isomerizzazione del  $\Delta^8$  a  $\Delta^5$ , demetilazione in C-4 e C-14.

**Riduzione del  $\Delta^{24}$ :** la riduzione di questo doppio legame può avvenire in momenti diversi della biosintesi in funzione degli organismi e sembra essere una *cis* addizione di idrogeno.

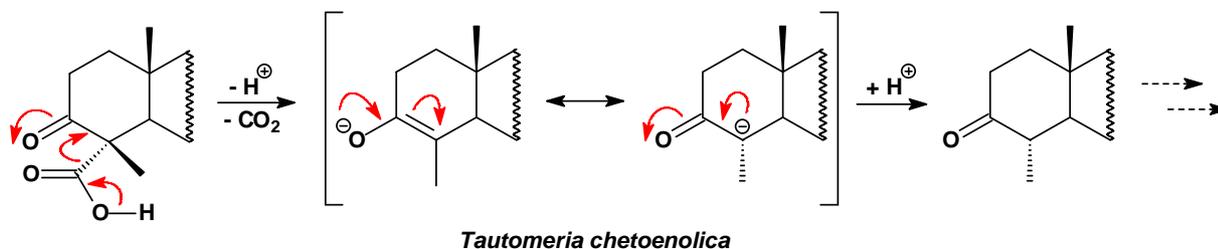
**Demetilazione:** sembra che la demetilazione in C-14 avvenga prima di quella in C-4, e che la demetilazione in C-4 interessi prima il metile in  $\alpha$  e poi quello in  $\beta$ . Il processo di demetilazione in C-4 avviene tramite l'azione di una ossidasi che trasforma il metile in acido carbossilico, che successivamente viene eliminato con un processo di **decarbossilazione** (Schema 8.5).



Schema 8.5.

Per quanto riguarda il meccanismo della decarbossilazione, questo viene facilitato dalla presenza del chetone in C-3 che si è originato dall'ossidazione della corrispondente funzione alcolica. Infatti, come si può vedere nello schema 8.6, in seguito alla perdita di  $\text{CO}_2$ , si ha la formazione di un

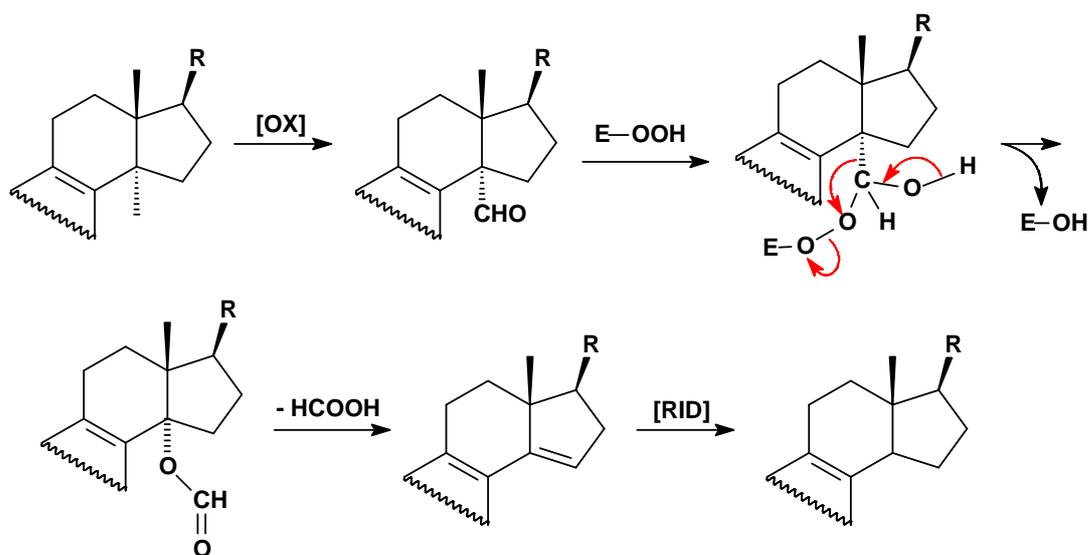
carboanione terziario che viene stabilizzato dalla presenza del chetone secondo un meccanismo di tautomeria cheto-enolica. Notare come tramite questo meccanismo il metile rimasto venga convertito da  $\beta$  ad  $\alpha$  grazie alla presenza di una forma enolica (caratterizzata da una struttura planare: carboni con ibridazione  $sp^2$ ).



*Schema 8.6.*

In seguito, il meccanismo di ossidazione si ripete, permettendo l'eliminazione anche del secondo metile.

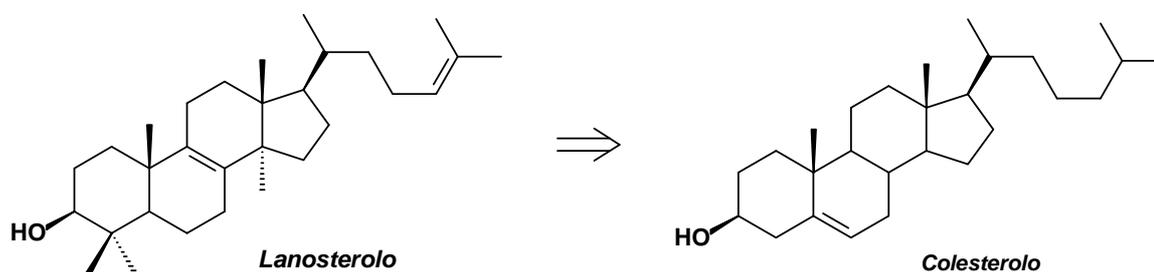
La demetilazione in C-14, pur passando attraverso l'ossidazione del metile, non avviene per semplice decarbossilazione. Nello schema 8.7 viene mostrato il processo di ossidazione del metile in C-14, in cui interviene anche l'azione di una perossidasi, che porta alla formazione di un estere formico intermedio. A questo punto avviene una vera e propria **reazione di eliminazione**, che porterà alla formazione di un doppio legame, il quale successivamente verrà successivamente ridotto.



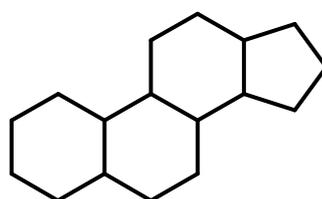
*Schema 8.7.*

**Trasposizione:** molto probabilmente avviene come ultimo stadio, cioè dopo le demetilazioni.

Come detto, attraverso questi processi metabolici, il lanosterolo viene trasformato in colesterolo.

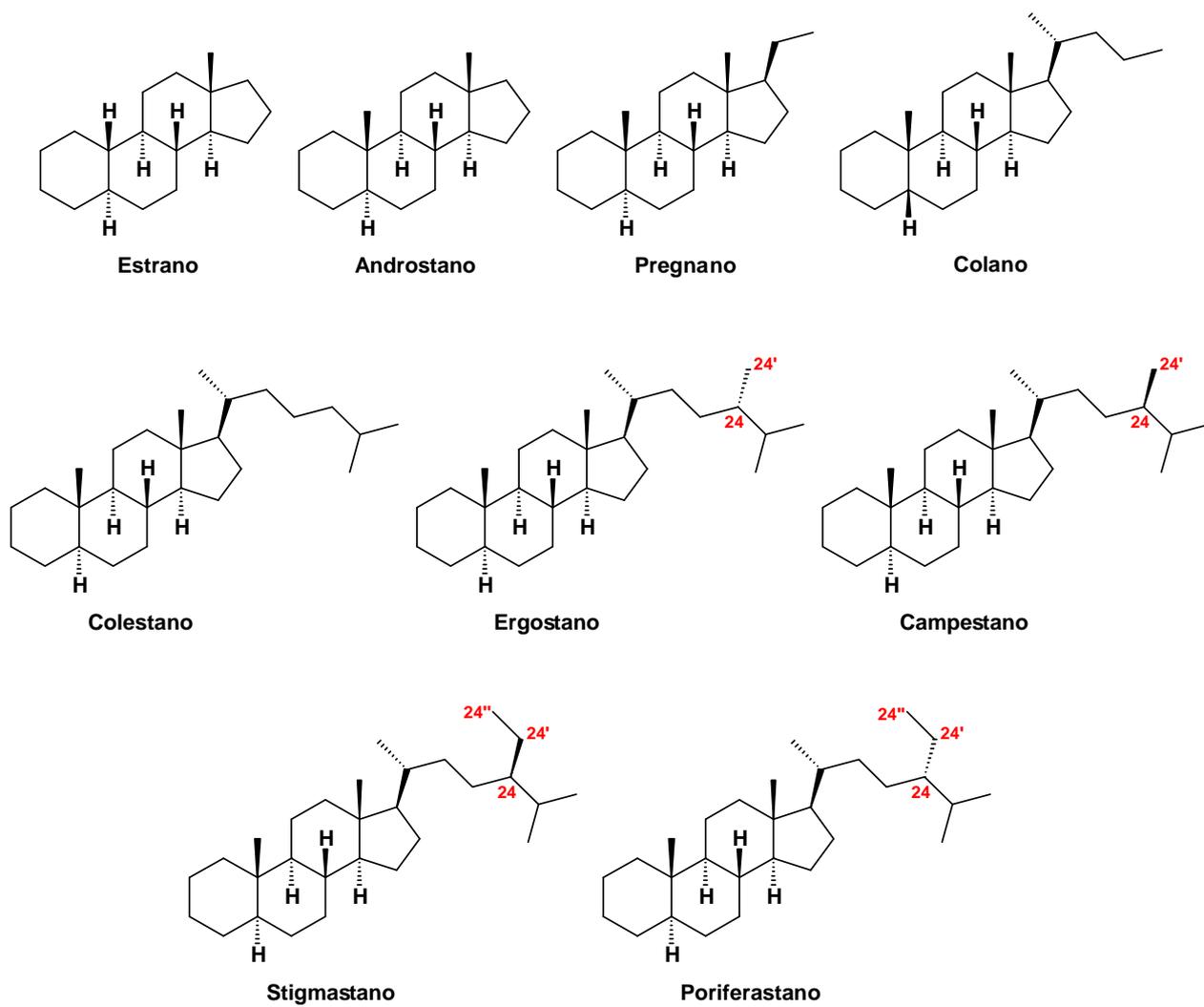


Il colesterolo è un metabolita fondamentale per la vita di numerosi organismi. Nei mammiferi la biosintesi del colesterolo avviene nel fegato. L'importanza del colesterolo è legata al fatto che è il precursore degli ormoni steroidei, degli ormoni corticosteroidi e degli acidi biliari, e in genere di tutti i composti che incorporano il nucleo del **ciclopentanoperidrofenantrene**.



**Ciclopentanoperidrofenantrene**

Nonostante molti triterpeni siano contraddistinti dalla presenza di questo nucleo, possono esistere ulteriori differenziazioni strutturali (ad es. stereochimica delle giunzioni, differenziazione della catena laterale, etc.) che necessitano di essere ulteriormente contraddistinte. Per questo motivo la nomenclatura sistematica degli steroidi è basata su una serie di idrocarburi capostipiti (Schema 8.8) come l'**estrano** (es. estrogeni), l'**androstano** (es. testosterone), il **pregnano** (es. pregnenolone), il **colano** (es. acidi biliari), il **colestano** (es. colesterolo), l'**ergostano** (es. ergosterolo), il **campestando** (es. campesterolo) e lo **stigmastano** (es. stigmasterolo), di cui vedremo diversi esempi.



*Schema 8.8. Nomenclatura degli steroidi.*

## Ormoni Steroidei

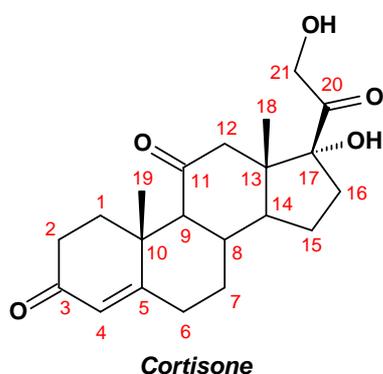
Gli ormoni steroidei raggruppano diverse classi di composti, quali i corticosteroidi, gli ormoni sessuali maschili e quelli femminili.

I **corticosteroidi** sono gli ormoni prodotti dalla corteccia surrenale e si dividono in due grandi gruppi:

- **GLUCOCORTICOIDI**
- **MINERALCORTICOIDI**

I glucocorticoidi regolano il metabolismo del glucosio e hanno il capostipite nel **cortisolo**, mentre i mineralcorticoidi regolano l'equilibrio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (es. **aldosterone**).

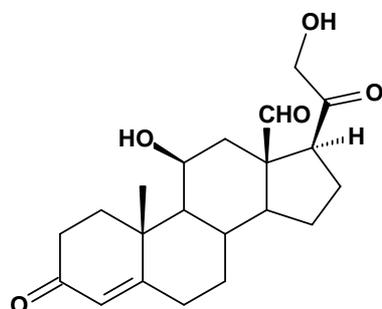
Tutti questi composti hanno la caratteristica strutturale di avere un gruppo chetonico in C-3, un  $\Delta^4$ , una catena laterale in C-17 di soli due atomi di carbonio (con un carbonile in C-20 e un ossidrilico in C-21) e soprattutto una funzione ossigenata in C-11, indispensabile per l'attività biologica (es. **cortisone**).



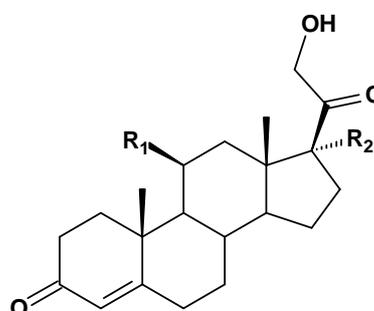
Cortisone e adrenalina sono ormoni rilasciati nel sangue dalle ghiandole surrenali in situazioni di stress. Essi elevano la pressione arteriosa e preparano l'organismo alla reazione di lotta o fuga.

Il cortisone è usato spesso nel trattamento di eventi infiammatori e viene somministrato per via orale, endovenosa e cutanea. Uno degli effetti del cortisone sull'organismo, potenzialmente dannoso per certi aspetti, è di deprimere il sistema immunitario; ciò spiegherebbe l'evidente correlazione tra uno stress elevato e numerose malattie.

Il cortisone fu scoperto per primo dal chimico americano Edward Calvin Kendall, al quale venne attribuito il Premio Nobel per la medicina e la fisiologia insieme a Philip S. Hench e Tadeusz Reichstein, per la scoperta degli ormoni della corteccia surrenale e delle loro strutture e funzioni.

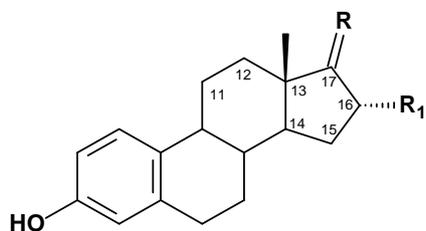
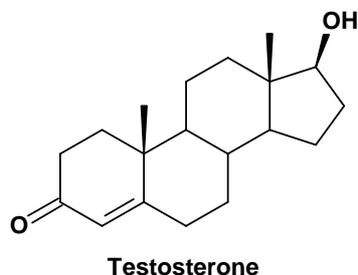
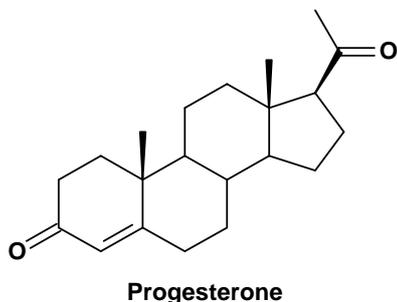


| MINERALCORTICOIDE |
|-------------------|
| Aldosterone       |



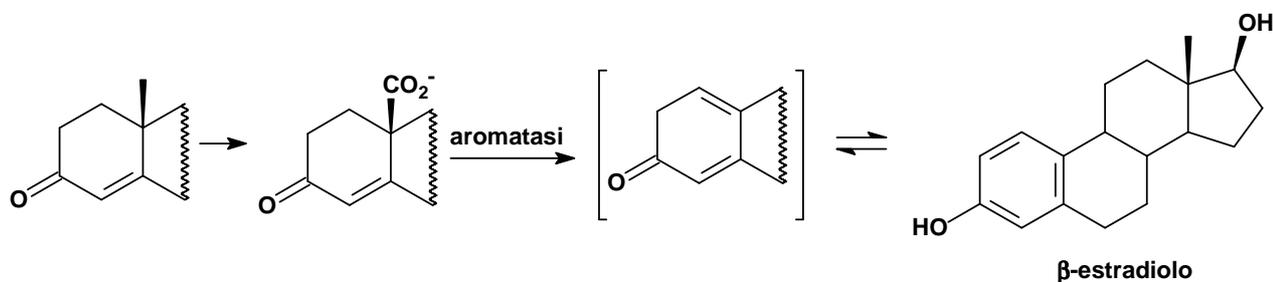
| GLUCOCORTICOIDE | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> |
|-----------------|----------------|----------------|
| Cortisolo       | OH             | OH             |
| Corticosterone  | OH             | H              |

Gli **ormoni sessuali**, prodotti dalle gonadi e deputati allo sviluppo dei caratteri sessuali, possono incorporare tre diversi scheletri: quello del *pregnano* (progesterone), dell'*estrano* (estradiolo, estrone ed estriolo) e dell'*androstano* (testosterone e androsterone).



| ESTROGENI  | R           | R <sub>1</sub> |
|------------|-------------|----------------|
| Estrone    | O           | H              |
| Estriolo   | $\beta$ -OH | OH             |
| Estradiolo | $\beta$ -OH | H              |

La trasformazione del testosterone in estrogeni è legata alla aromatizzazione dell'anello A. Questa avviene attraverso una demetilazione ossidativa del metile in C10 (via acido carbossilico) con formazione di un doppio legame  $\Delta^{1,10}$  (Schema 8.9). Il chetone  $\alpha,\beta-\gamma,\delta$ -insaturo aromatizza velocemente, per semplice tautomeria cheto-enolica, formando il  $\beta$ -estradiolo. Questo è l'estrogeno principale, che viene poi trasformato in **estrone** (17-cheto) e in **estriolo** (17 $\beta$ , 16 $\alpha$ -diolo).



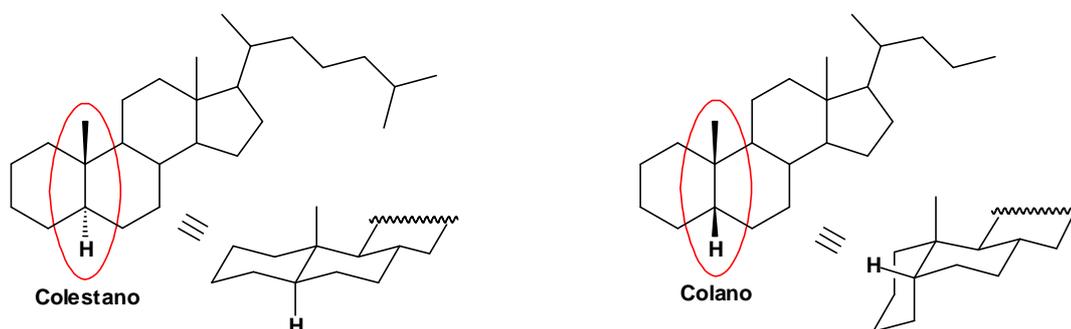
Schema 8.9.

## Acidi biliari

Gli acidi biliari rappresentano la principale via di degradazione del colesterolo. Vengono prodotti nel fegato e secreti nell'intestino tenue, dove favoriscono l'assorbimento dei lipidi.

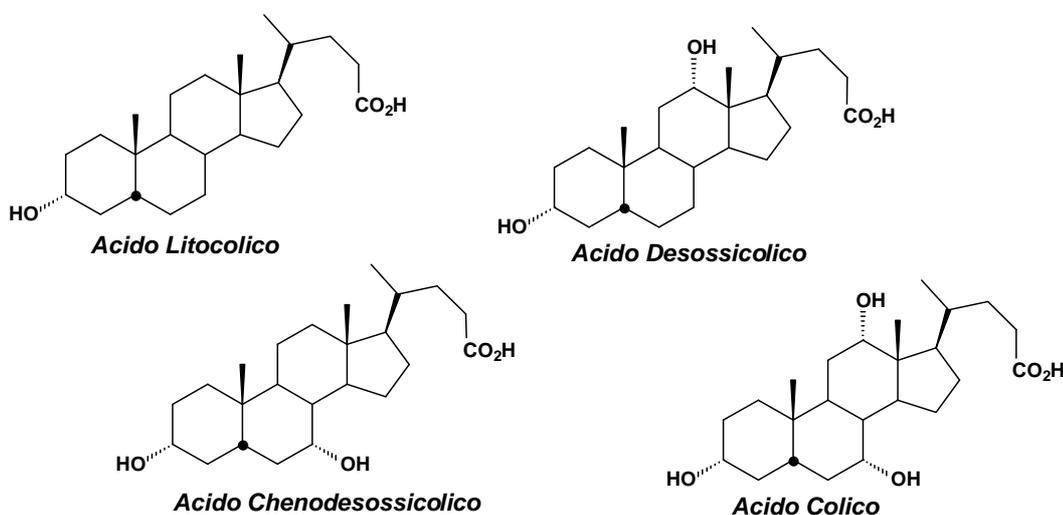
Tutti gli acidi biliari posseggono le seguenti caratteristiche:

- Presenza di una giunzione fra gli anelli A e B di tipo *cis*, tipico del nucleo del **colano** (ciclopentanoperidrofenantrene con giunzione *cis-trans-trans*):



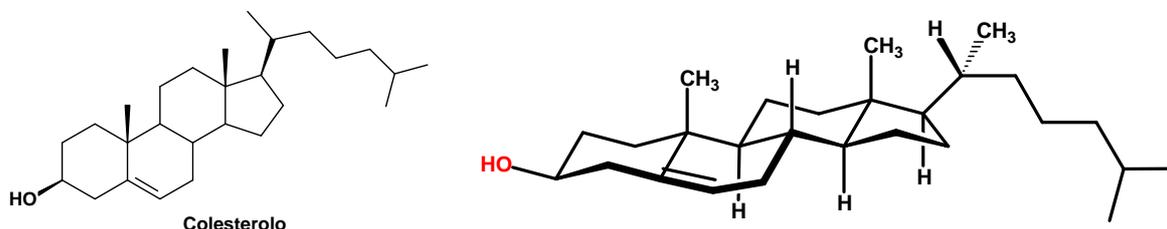
- Presenza di una catena in C17 a 5 atomi di carbonio terminante con una funzione carbossilica;
- Presenza di una funzione  $3\alpha$ -OH,  $7\alpha$ -OH e  $12\alpha$ -OH.

Gli acidi biliari sono composti estremamente polari in quanto presentano una catena laterale a cinque atomi di carbonio ossidata ad acido carbossilico e funzioni alcoliche che possono essere presenti in C3 (ac. **Litocolico**), in C3 e C12 (ac. **Desossicolico**), in C3 e C7 (ac. **Chenodesossicolico**) e in C3, C7 e C12 (ac. **Colico**).

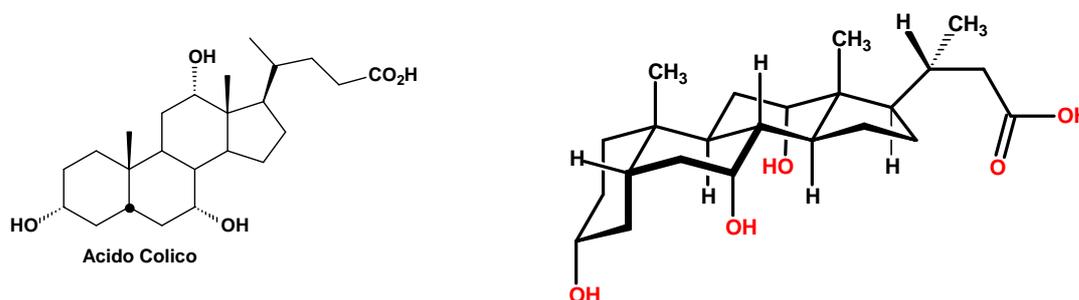


Gli acidi biliari sono delle molecole **anfipatiche**, in quanto la loro struttura presenta una regione polare ed una apolare. La porzione polare è caratterizzata dalla presenza di una catena laterale con una funzione carbossilica, che viene normalmente coniugata con aminoacidi quali glicina o taurina. Inoltre la presenza di funzioni alcoliche assiali (rivolte verso il piano inferiore della molecola), comporta una maggiore polarità della faccia inferiore della porzione ciclopentanoperidrofenantrenica degli acidi biliari; cosa particolarmente evidente nell'acido colico che presenta ben tre funzioni alcoliche assiali. La porzione apolare è invece circoscritta principalmente alla faccia superiore della porzione ciclopentanoperidrofenantrenica, caratterizzata esclusivamente dalla presenza di gruppi metilici ed idrogeni, come si può vedere dal modello molecolare (Figura 8.1-B). Questa caratteristica li rende dei detergenti efficienti in quanto permette loro di formare soluzioni micellari, dovute alle interazioni idrofobiche tra le porzioni lipofile che vengono a contatto eliminando l'acqua all'interno, generando così una porzione polare esterna, che rimane in contatto con il mezzo acquoso, ed una lipofila interna, che può contenere lipidi o vitamine liposolubili. Grazie a questa struttura "micellare", gli acidi biliari permettono l'assorbimento dei lipidi e delle vitamine liposolubili, inglobandoli nella zona apolare, a loro affine.

A)

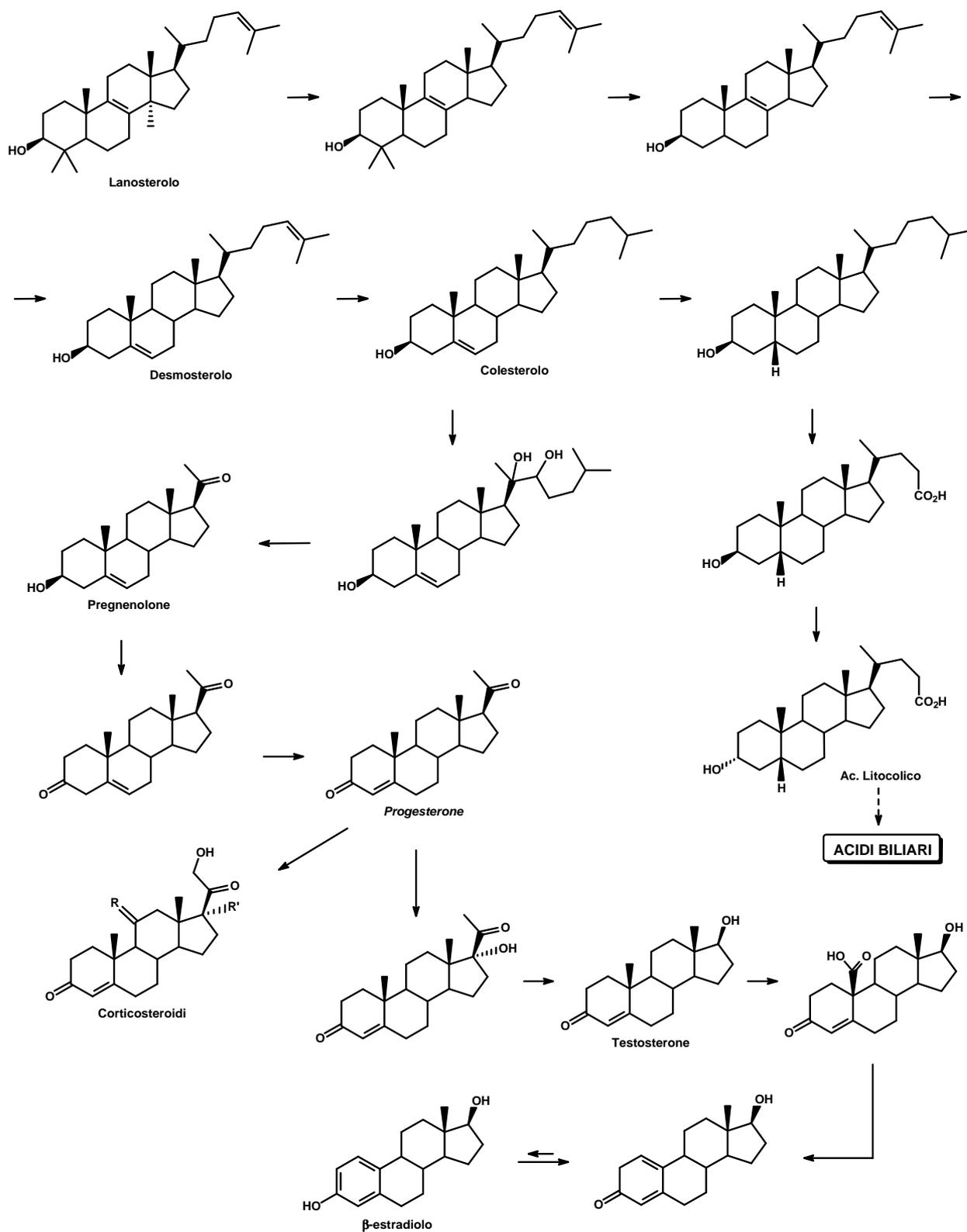


B)



**Figura 8.1.** Rappresentazione tridimensionale del colesterolo e dell'acido colico.

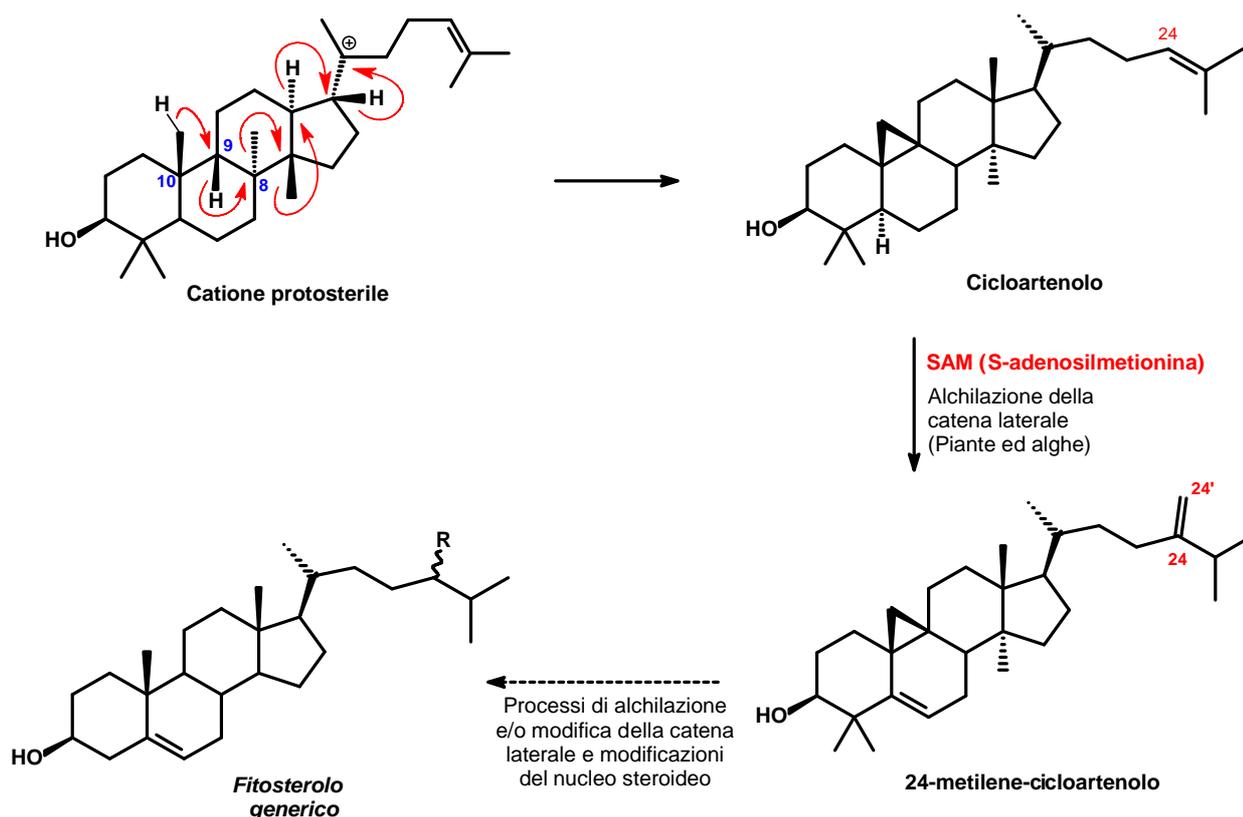
Al fine di avere una panoramica generale delle possibili trasformazioni biosintetiche di alcuni triterpeni tetraciclici importanti, viene riportato uno schema riassuntivo a partire dal lanosterolo (schema 8.10).



**Schema 8.10.** Trasformazioni biosintetiche del lanosterolo.

## Fitosteroli

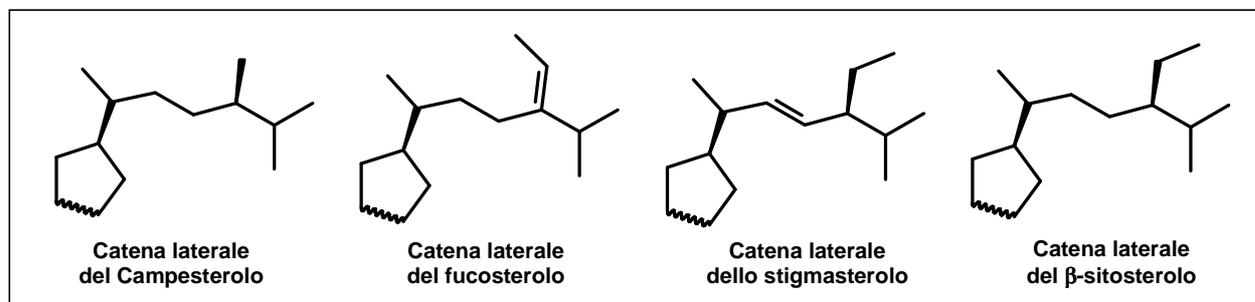
I fitosteroli sono composti caratterizzati dalla presenza di un numero di carboni superiore a 27. In genere questi atomi di carbonio aggiuntivi si trovano sulla catena laterale e non hanno origine isoprenica, ma derivano dalla S-adenosilmetionina (SAM). Dal punto di vista biosintetico i fitosteroli di piante ed alghe derivano dal **cicloartenolo**, mentre quelli dei funghi provengono dal **lanosterolo**. Da notare che il **cicloartenolo** si forma con un meccanismo simile a quello della formazione del lanosterolo (vedi shema 8.3) a partire dal **catione protosterile**, con la differenza che l'idrogeno legato al C-9, anziché venire perso come protone ( $H^+$ ) per dare il doppio legame  $\Delta^{8-9}$  (tipico del lanosterolo), traspare sul C-8 (Schema 8.11). Questo porta alla formazione di un potenziale carbocatione in C-9 che innesca la formazione di nuovo legame C-C con il metile in C-10, il quale perde un  $H^+$ , formando così l'anello ciclopropanico tipico del cicloartenolo.



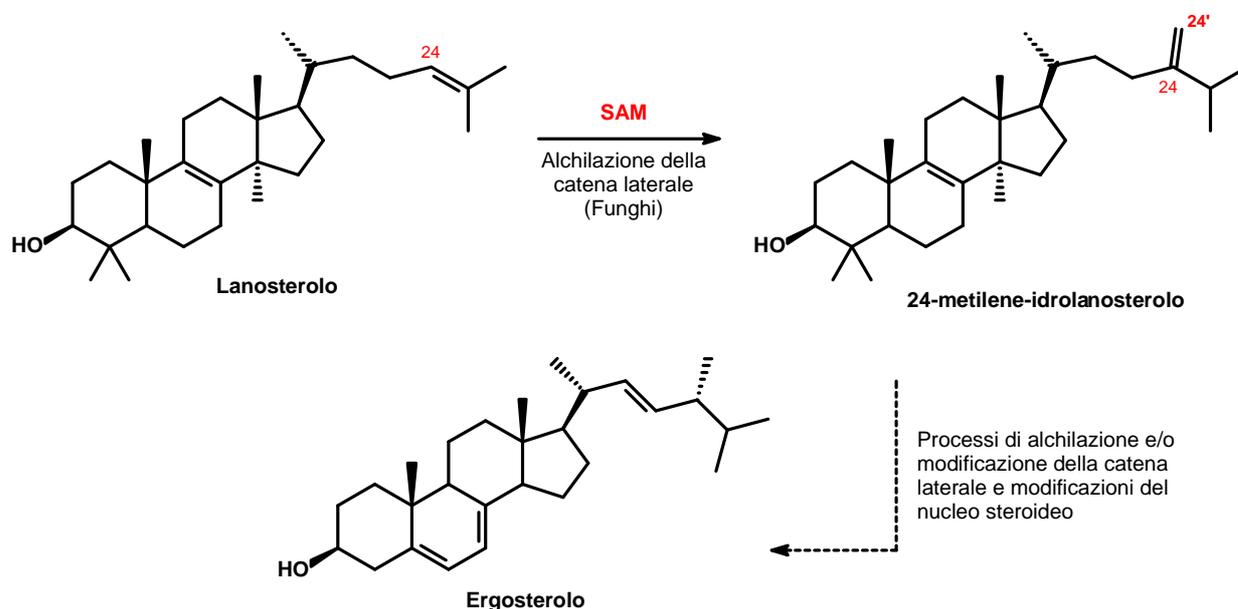
Schema 8.11.

Il cicloartenolo subisce inizialmente la metilazione della catena laterale (formazione del **24-metilene-cicloartenolo**), ad opera della SAM, per poi andare incontro alle trasformazioni (tra cui

quelle già viste per la trasformazione del lanosterolo in colesterolo) che condurranno a tutti i fitosteroli che derivano da piante ed alghe. Di seguito vengono raffigurate le catene laterali di alcuni fitosteroli importanti.



La maggior parte dei fitosteroli ritrovati nei funghi derivano invece dal lanosterolo, il quale subisce inizialmente una metilazione da parte della SAM, a **24-metilene-idrolanosterolo**, per poi proseguire con gli stessi processi di modifica che subiscono anche gli altri fitosteroli, portando, ad esempio, all'**ergosterolo** (Schema 8.12), (la varietà di fitosteroli che derivano dai funghi è molto più limitata).



**Schema 8.12.**

La presenza di una insaturazione nella catena laterale (ad es.  $\Delta^{22}$ ) è una caratteristica tipica di molti

steroli ricavati dalle piante (ad es. lo **stigmasterolo**), ma non di quelli ritrovati nei mammiferi.

Per quanto riguarda la distribuzione dei fitosteroli si potrebbe semplificare come segue:

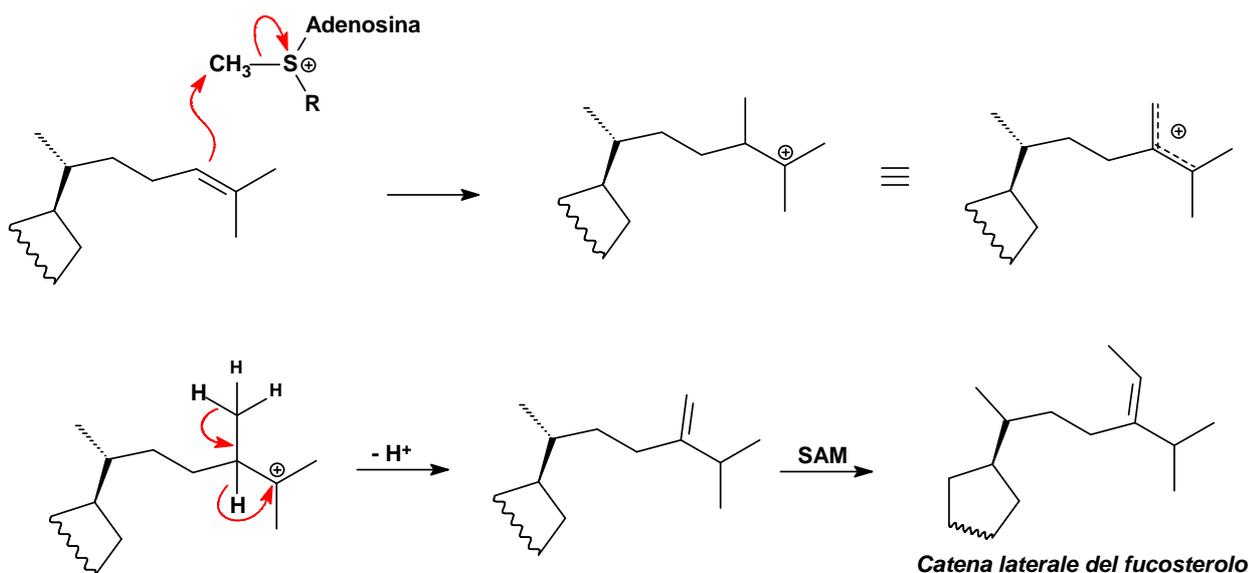
**PIANTE steroli 24 $\alpha$ -metilici e 24 $\alpha$ -etilici** (es.: *campesterolo*, *sitosterolo*)

**ALGHE steroli 24 $\beta$ -etilici** (es.: *fucosterolo*)

**FUNGHI steroli 24 $\beta$ -metilici** (es.: *ergosterolo*)

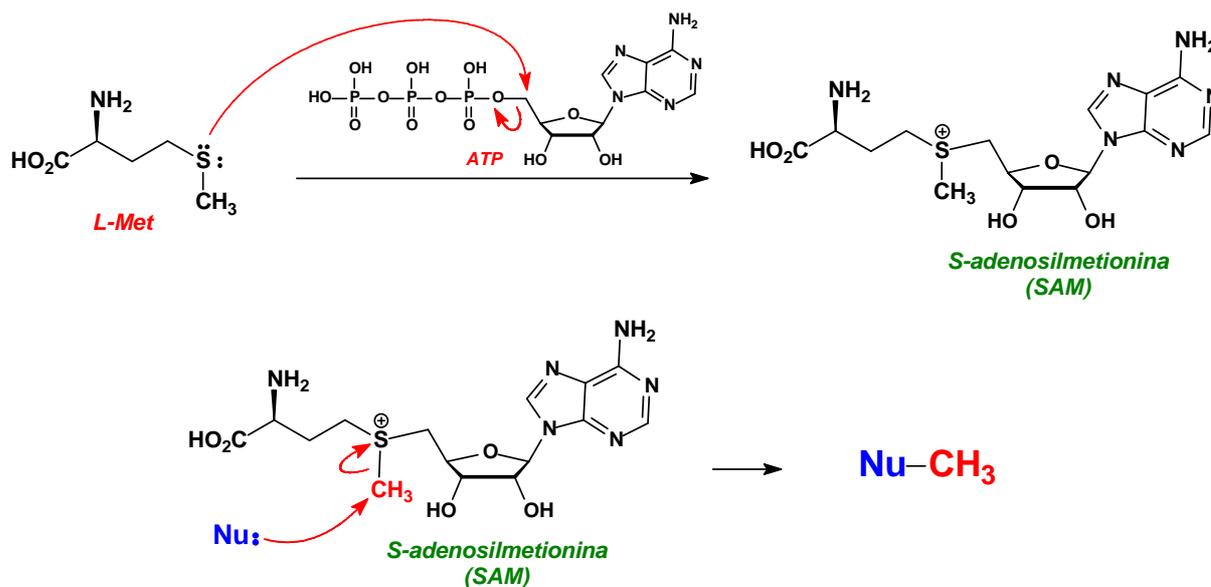
*N.B.:* Da notare che in questi casi il termine  $\alpha$  e  $\beta$  non è riferibile al discorso dell'identificazione di un gruppo come sopra o sotto il piano della molecola, ma deriva da considerazioni relative alle proiezioni di Fisher della catena laterale (i sostituenti che si trovano a sinistra vengono definiti  $\alpha$ , mentre quelli a destra  $\beta$ ).

Come anticipato, l'introduzione di gruppi metilici (o etilici) nella catena laterale viene ottenuta tramite alchilazione da parte della **S-adenosilmetionina** come singole unità di carbonio. A tale proposito è fondamentale, nella fase iniziale, la presenza del doppio legame  $\Delta^{24}$  (Schema 8.13).



**Schema 8.13.** Meccanismo di metilazione della S-adenosilmetionina (SAM) nella biosintesi dei fitosteroli.

La **S-adenosilmetionina** (SAM) è un cofattore enzimatico che si forma per interazione dell'aminoacido **metionina** con una molecola di ATP. Il gruppo trifosfato funge da gruppo uscente in modo tale che il residuo dell'adenosina si leghi allo zolfo della metionina (nucleofilo), che diventa così positivo. La carica positiva sullo zolfo induce un forte effetto elettronattrattore conferendo caratteristiche di elettrofilicità al metile ad esso legato, rendendolo maggiormente suscettibile all'attacco di un nucleofilo. Nello schema 8.14 è riportato il meccanismo di formazione della SAM e la sua reazione con un generico nucleofilo.



Schema 8.14. Nu è un generico nucleofilo.

La reazione di metilazione non è altro che una reazione di sostituzione nucleofila in cui il residuo di metionina legato all'adenosina funge da gruppo uscente. Questo cofattore è in grado di metilare una vasta serie di substrati contenenti porzioni nucleofile, come ad esempio il doppietto elettronico di un legame  $\pi$  (biosintesi dei fitosteroli), gruppi alcolici e fenolici (formazione di gruppi metossili) e gruppi aminici (N-metil derivati di alcaloidi etc.).

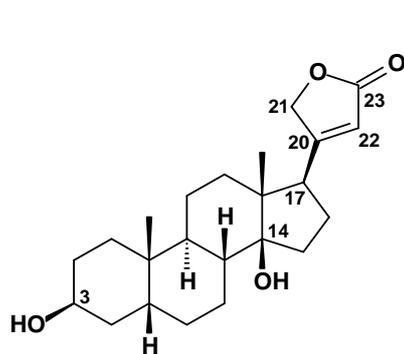
## Glicosidi cardioattivi

Molte delle piante utilizzate per lungo tempo come veleni ad azione rapida (come ad esempio *Strophanthus*) oppure come farmaci cardiaci (come ad esempio *Digitalis*) hanno mostrato contenere glicosidi cardiotonici o cardiaci. Questi glicosidi hanno la capacità di normalizzare la funzionalità di un cuore indebolito, aumentandone l'efficienza. Bisogna però tenere conto che il loro dosaggio deve essere adeguatamente controllato, visto che la dose terapeutica è molto vicina alla dose tossica.

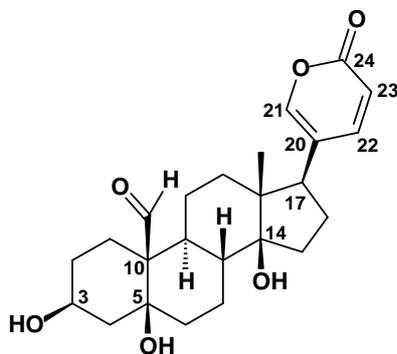
Gli effetti cardioattivi di *Digitalis* furono scoperti studiando i risultati di una sua applicazione nel trattamento dell'idropisia, un accumulo d'acqua eccessivo nei tessuti umani. *Digitalis* allevia i disturbi dell'idropisia indirettamente attraverso un'azione sul cuore, infatti aumentando il flusso sanguigno compensa la deficienza renale e quindi consente l'eliminazione dei fluidi in eccesso.

L'azione terapeutica dei glicosidi cardioattivi dipende dalla struttura dell'aglicone e dal tipo e dal numero delle unità zuccherine legate. Gli **agliconi** si possono ricondurre a due tipi di strutture:

- **CARDENOLIDI**: composti a 23 atomi di carbonio, es. **digitossigenina** (*Digitalis purpurea*).
- **BUFADIENOLIDI**: composti a 24 atomi di carbonio, es. **ellebrigenina** (*Helleborus niger*).



**CARDENOLIDE (digitossigenina)**



**BUFADIENOLIDE (ellebrigenina)**

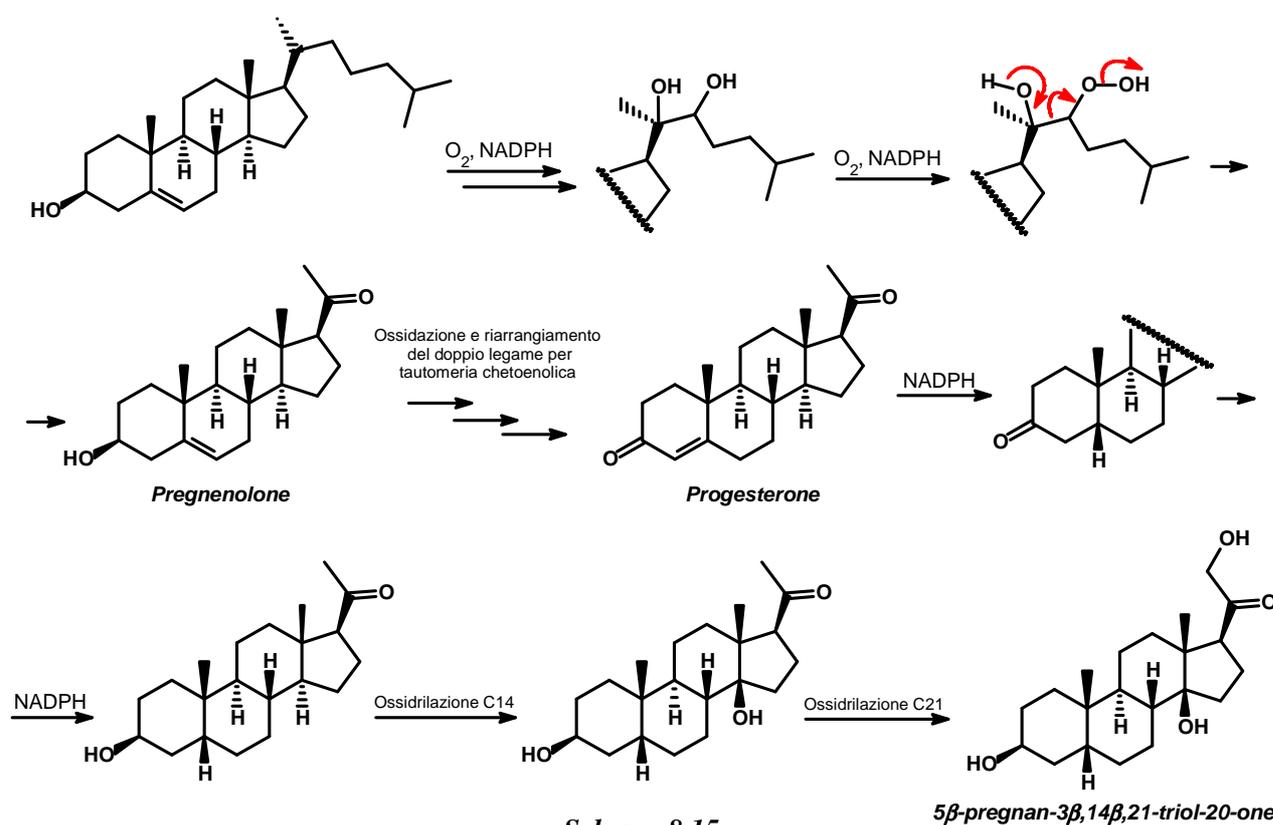
**Ai fini dell'attività è molto importante la stereochimica di questi composti:**

- giunzione *cis* sia fra gli anelli A/B che fra gli anelli C/D,
- orientamento  $\beta$  degli ossidrili in posizione C-3 e C-14,
- funzione lattonica  $\alpha,\beta$ -insatura localizzata in posizione C-17( $\beta$ ) (nei cardenolidi è presente un anello lattonico a cinque termini, mentre nei bufadienolidi tale funzione è a sei termini).
- in posizione 3 deve essere legato un gruppo glicosidico, la cui funzione è quella di aumentare la solubilità di questi composti in acqua e quindi la capacità di legarsi al muscolo cardiaco.

Per quanto riguarda la parte zuccherina, possono essere presenti fino a 4 unità di monosaccaride,

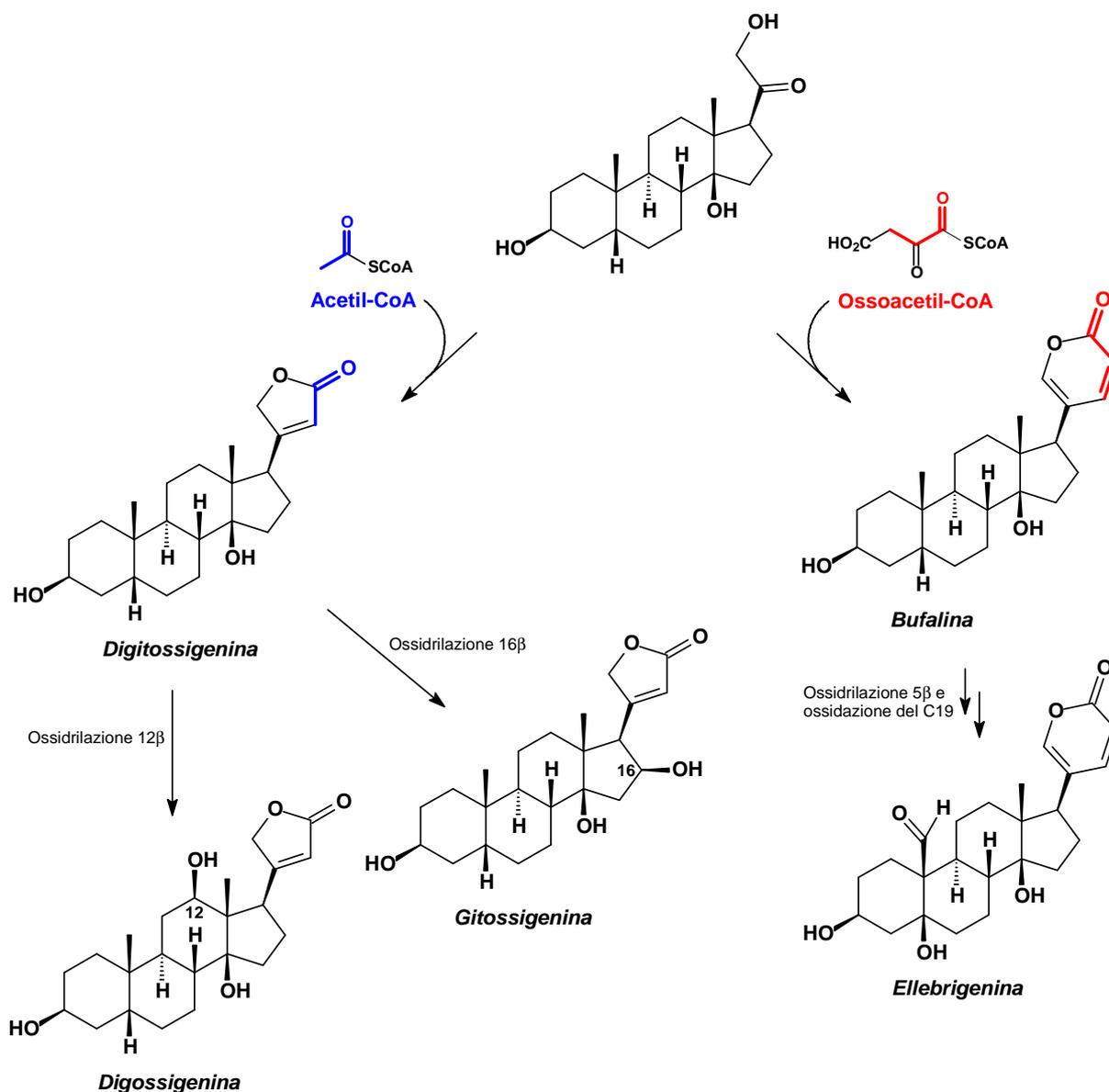
che spesso sono tipici di questa classe di composti, come ad es. il D-digitossosio e il D-digitalosio. Sono stati caratterizzati circa venti zuccheri differenti che, a parte il D-glucosio, sono costituiti da 6-desossi-esosi e 2,6-didesossi-esosi.

La struttura tetraciclica dell'aglicone deriva biosinteticamente dal metabolismo del colesterolo, la cui catena laterale viene degradata a gruppo acetilico, in seguito ad una ossidrilazione a stadi a carico dei carboni C-22 e C-20 e successiva rottura del legame C-22-C-20. Dopo una serie di ossidazione/riduzione, dell'anello A, che porta ad una giunzione *cis* fra gli anelli A/B, si ha una  $\beta$ -ossidrilazione in C-14 con inversione di configurazione dello stesso centro (Schema 8.15). A questo punto una ossidrilazione sul C-21 della catena laterale porta ad un intermedio comune (*5 $\beta$ -pregnan-3 $\beta$ ,14 $\beta$ ,21-triol-20-one*) da cui derivano i cardenolidi ed i bufadienolidi.



La formazione del sistema  $\gamma$ -lattonico tipico dei cardenolidi, prevede l'aggiunta di una unità di acetil-CoA, mentre il sistema  $\delta$ -lattonico tipico dei bufadienolidi richiede una unità di ossoacetil-CoA; in entrambi i casi tali addizioni avvengono molto probabilmente con un meccanismo di tipo addizione aldolica (Schema 8.16). Da notare che nella biosintesi dei bufadienolidi dei 4 atomi di carbonio dell'ossoacetil-CoA solo 3 vengono incorporati nel sistema  $\delta$ -lattonico, mentre il quarto

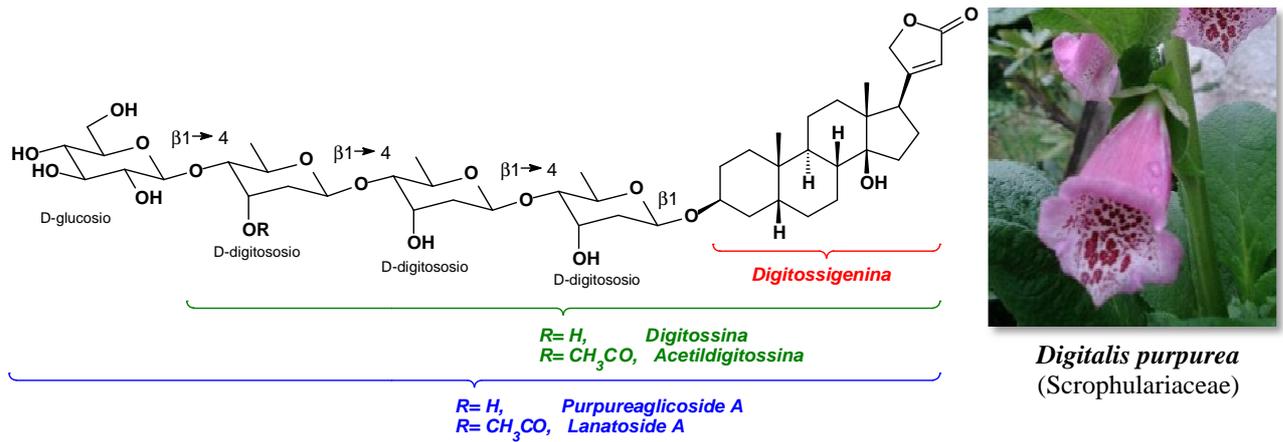
viene perso per decarbossilazione.



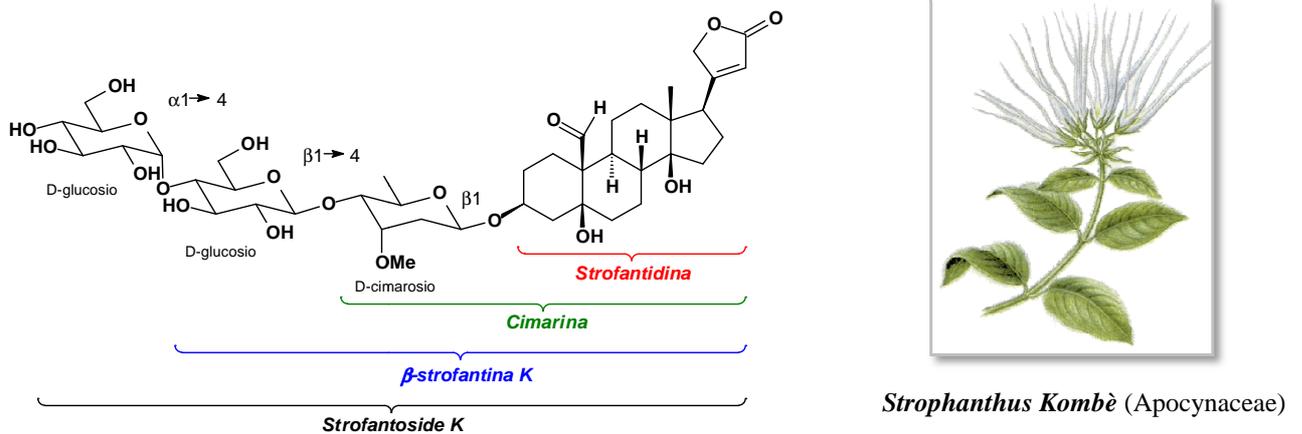
Schema 8.16.

I glicosidi cardioattivi più diffusi sono i cardenolidi, e le piante delle famiglie Apocynaceae (*Strophantus*), Liliaceae (*Convallaria*), Scrophulariaceae (*Digitalis*) sono una fonte di diversi prodotti medicinali. I bufadienolidi sono più rari e sono stati ritrovati in alcune specie della famiglia delle Liliaceae (*Urginea*) e delle Rannunculaceae (*Helleborus*), nonché sulla pelle del rospo del genere *Bufo* (da cui questa classe di composti è stata isolata per la prima volta, e da cui, in seguito ha mutuato il nome generale).

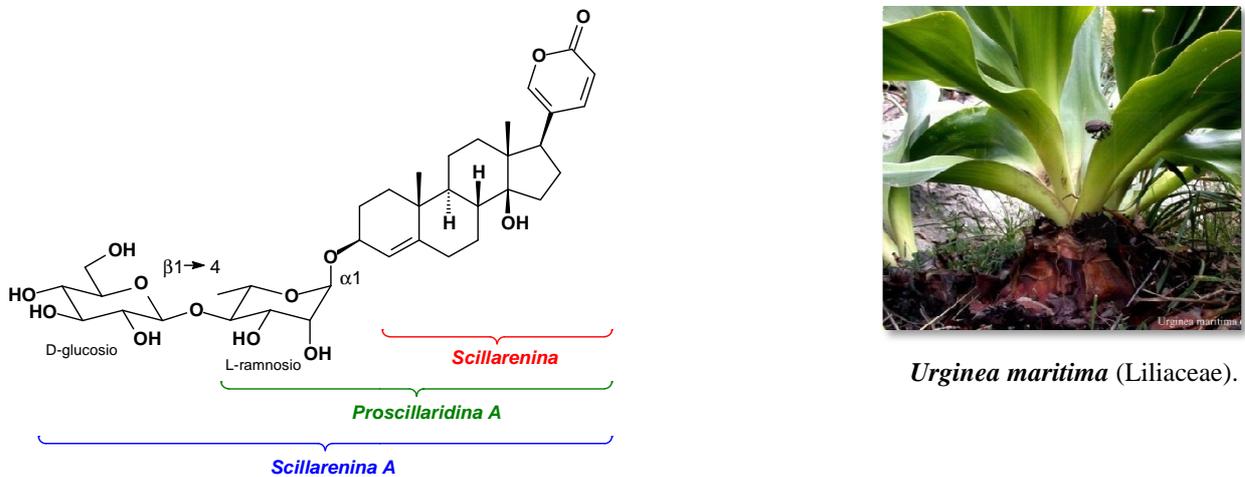
Di seguito vengono riportati alcuni dei glicosidi più importanti.



**Figura 8.2.** La *D. purpurea* è una pianta biennale comune in Europa e nel Nord America. Per la produzione farmacologica vengono raccolte le foglie del primo anno che vengono prontamente e rapidamente essiccate a temperature non superiori ai 60°C (per evitare disidratazione degli agliconi con formazione di  $\Delta^{14}$ -deidro-derivati che sono inattivi). Con questo trattamento si cerca di disattivare il più possibile i processi di idrolisi enzimatica a carico dei glicosidi cardioattivi. Il contenuto di glicosidi cardioattivi nelle foglie di *D. purpurea* va dallo 0.15 allo 0.4% ed è costituito da una miscela di circa 30 strutture diverse, i cui componenti principali fanno riferimento ad agliconi quali la digitossigenina, gitossigenina e gitalossigenina (gitossigenina con OH in C-16 esterificato con ac. formico). Ai fini produttivi e di isolamento dei singoli glicosidi cardioattivi (principalmente digossina e lanatoside C), la *D. lanata* è più largamente usata anche in virtù del suo maggiore contenuto in principi attivi (>1%). Inoltre, la presenza di esteri acetilici sulla terza unità zuccherina comporta una maggiore facilità di isolamento e purificazione dei glicosidi cardioattivi.

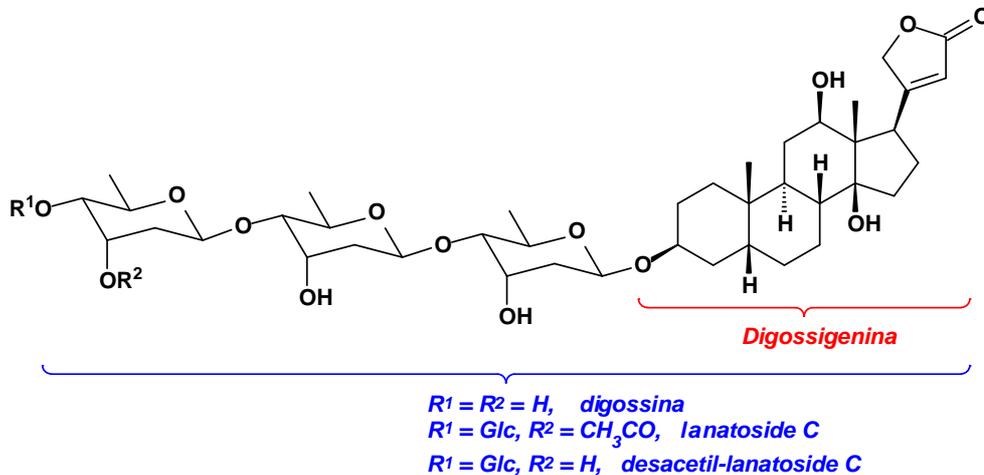


**Figura 8.3.** I semi contengono il 5-10% di cardenolidi, una miscela conosciuta come strofantina K.



**Figura 8.4.** *U. maritima* cresce sulle spiagge del mediterraneo; contiene diversi bufadienolidi (contenuto > del 4%).

I **glicosidi cardioattivi** che vengono principalmente usati nella pratica terapeutica sono la **digitossina** e la **digossina**, e vengono impiegati nell'insufficienza cardiaca congestizia e nel trattamento delle aritmie cardiache, in particolare nelle fibrillazioni atriali.

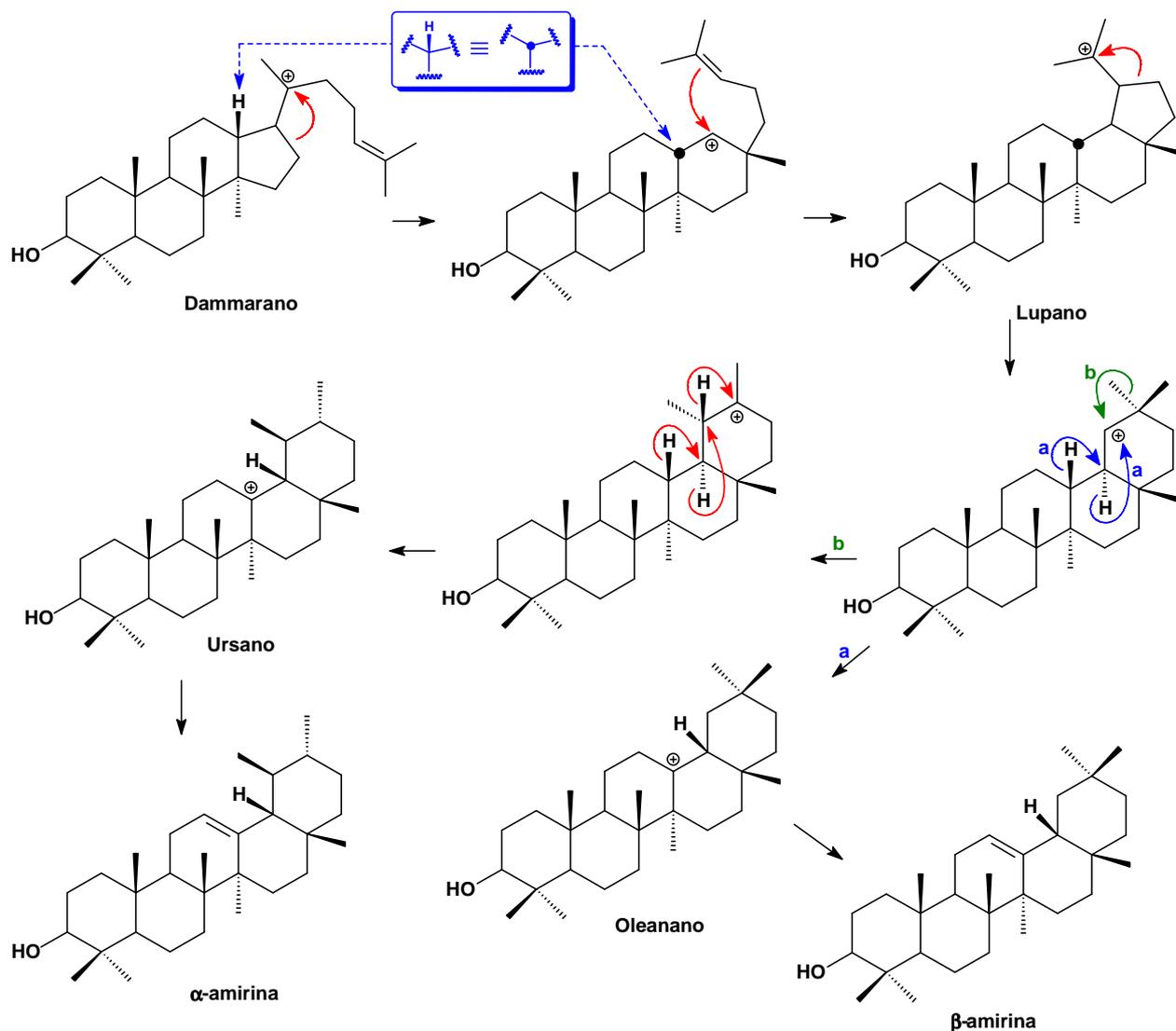


In modo particolare, la **digossina** ha una rapida azione ed è più velocemente eliminata della digitossina, pertanto è il glicoside cardioattivo più ampiamente usato. La digossina è più idrofila della digitossina, legata meno fortemente alle proteine plasmatiche e viene eliminata principalmente dai reni, mentre la digitossina è metabolizzata dal fegato più lentamente. Il **lanatoside C** ed il **desacetil-lanatoside C**, sebbene vengano usati meno ampiamente degli altri, trovano impiego nel trattamento delle emergenze cardiache in quanto possiedono un'azione molto rapida.

I glicosidi cardioattivi aumentano la forza di contrazione del cuore, sia aumentando la gittata cardiaca sia aumentando i tempi di pausa tra le contrazioni. L'effetto primario sul cuore consiste nell'inibizione della pompa di membrana cellulare di  $Na^+/K^+$  ATPasi-dipendente che produce un aumento della concentrazione del  $Ca^{2+}$  intracellulare ed un incremento della contrazione. Il miglioramento della circolazione sanguigna tende anche a migliorare la funzionalità renale, producendo un aumento della diuresi ed una conseguente riduzione dell'edema, spesso associato all'insufficienza cardiaca.

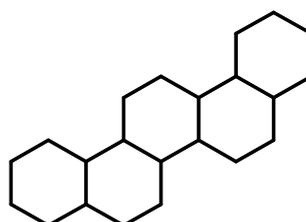
## Triterpeni pentaciclici

La biogenesi dei triterpeni pentaciclici (Schema 8.17) prevede una serie di riarrangiamenti di Wagner-Meerwein che si verificano a partire dal **dammarano** e conducono a scheletri importanti come quelli del **Lupano**, dell'**Oleanano** e dell'**Ursano** ed infine alla  $\alpha$ -**amirina** e  $\beta$ -**amirina**, che sono gli scheletri maggiormente rappresentati nelle saponine triterpenoidiche.



Schema 8.17.

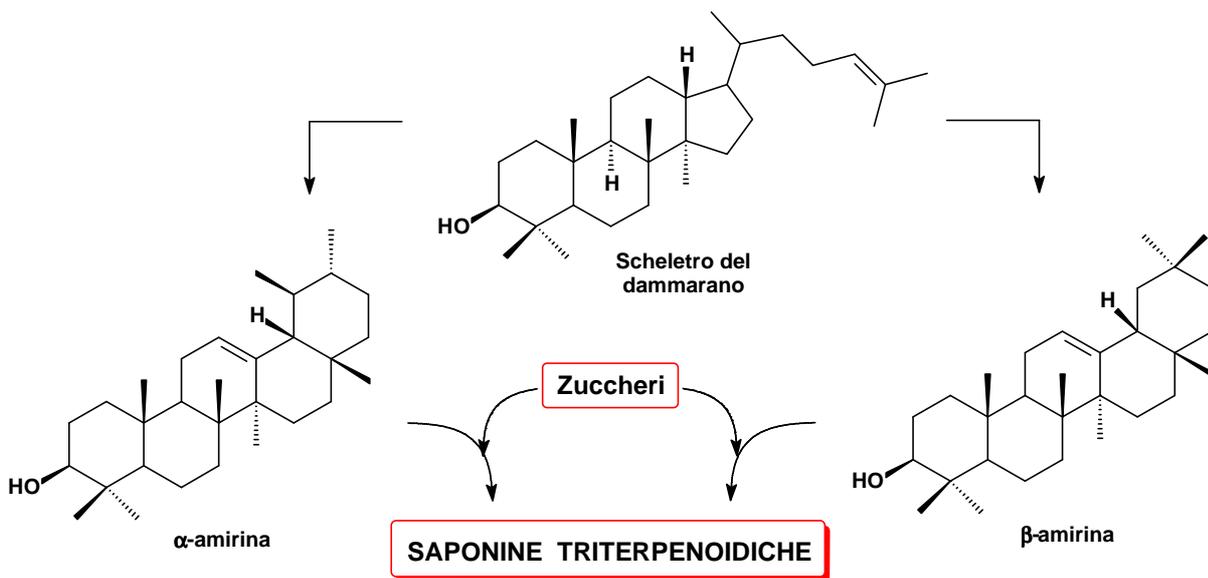
I triterpeni pentaciclici fanno riferimento ad uno scheletro di base riferibile al **docosaidropicene**.



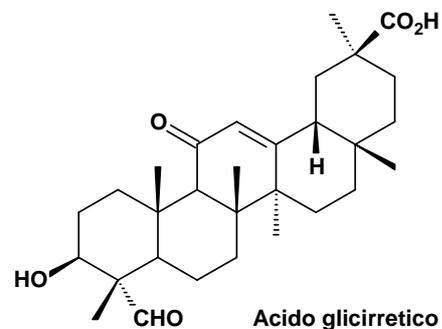
DOCOSAIDROPICENE

## Saponine triterpenoidiche

Le saponine triterpenoidiche sono **glicosidi** caratterizzati generalmente dalla presenza di triterpeni pentaciclici come l' **$\alpha$ -amirina** e la  **$\beta$ -amirina**, che inducono la formazione di schiuma in acqua anche in concentrazioni molto basse. Poiché hanno proprietà tensioattive, simili a quelle dei saponi, tali molecole devono avere caratteristiche anfipatiche. Tali caratteristiche sono dovute alla presenza di unità zuccherine, che rappresentano la porzione idrofila, mentre la restante porzione triterpenica (l'aglicone) rappresenta la parte lipofila.



Le saponine sono i principali costituenti di piante farmacologicamente importanti quali, ad esempio, la *Glycyrriza glabra* (Figura 8.2), la *Quillaja saponaria* (Figura 8.3) e il *Panax ginseng*.



**Figura 8.2.** *Glycyrriza glabra* ed aglicone presente nelle relative saponine.

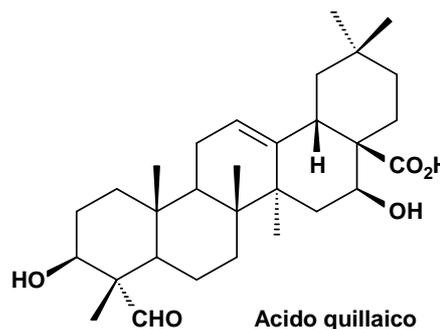
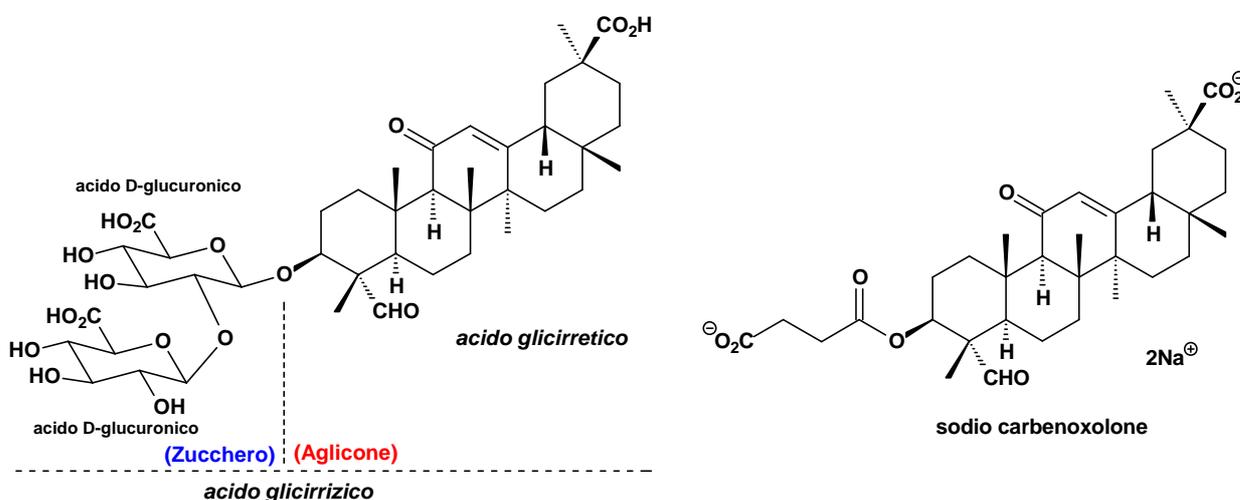


Figura 8.3. *Quillaja saponaria* ed aglicone presente nelle relative saponine.

Nel caso della liquirizia (*Glycyrriza glabra*) il componente principale è l'**acido glicirrizico** (o glicirrizinico) che è un glicoside (diglucuronide) in cui le due molecole di acido glucuronico sono legate fra loro con un legame  $\beta$ -1,2-glicosidico. L'aglicone è costituito dal triterpene acido glicirretico, derivante dalla  $\beta$ -amirina.

L'**acido glicirrizico** come miscela di sali di  $K^+$  e di  $Ca^{++}$  (glicirrizina) è da 50 a 150 volte più dolce del saccarosio ed è a volte usato come dolcificante nelle preparazioni farmaceutiche. Ultimamente si è visto che questo composto ha anche importanti proprietà farmacologiche in quanto inibisce la degradazione delle prostaglandine e dei glucocorticoidi avendo così un'azione antiinfiammatoria. Inoltre, proprio per l'azione sul metabolismo delle prostaglandine, ha attività gastroprotettive. Bisogna sempre però tener presente la ritenzione idrica associata all'uso di acido glicirrizico che induce un aumento pressorio. Da notare che l'assorbimento del glicoside come tale è piuttosto difficile, per cui è stato preparato un derivato semisintetico, il **carbenoxolone** (acido glicirretico esterificato con una molecola di acido succinico), che viene normalmente usato come gastroprotettivo nelle ulcere peptiche.



## I glicosidi

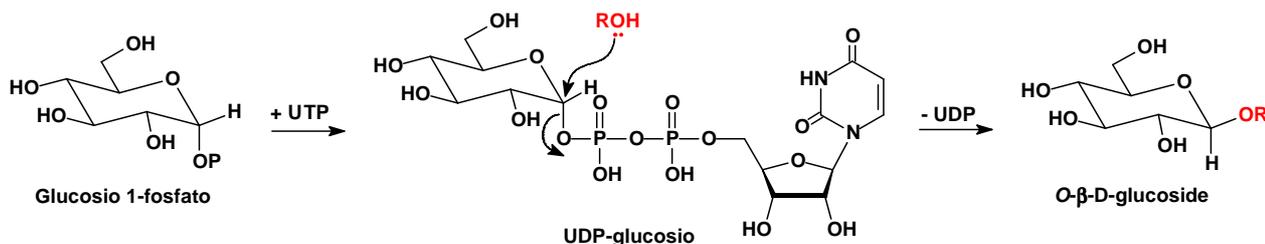
Con il termine “**glicosidi**” si vogliono indicare tutti quei composti che sono caratterizzati dalla presenza di un aglicone (che può essere di diversa natura: terpene, flavonoide, antrachinone etc.) e di una o più unità zuccherine.



La formazione di un glicoside richiede processi che permettono il legame delle unità zuccherine (porzione glicidica) con un opportuno atomo dell'aglicone (che deve avere requisiti di nucleofilicità). Questi processi biosintetici sono gli stessi che normalmente portano alla formazione dei polisaccaridi. Il **legame glicosidico** più comune si ottiene con l'atomo di ossigeno, anche se altri eteroatomi sono spesso presenti in determinati glicosidi, sono infatti ben noti S-, N- e C-glicosidi.

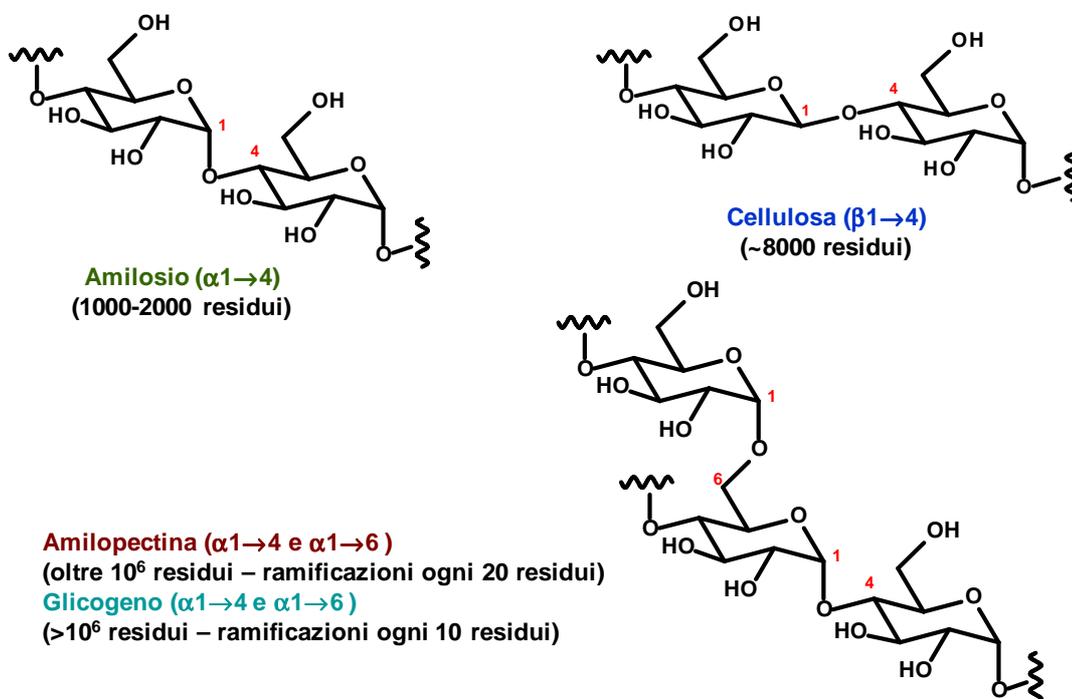
Le unità zuccherine che devono essere legate ad un aglicone (o ad uno zucchero) devono essere inizialmente “attivate” come *uridina-difosfozuccheri*. In questa forma gli zuccheri risultano essere gli effettivi agenti della glicosilazione. L'*UDP-glucosio* è l'esempio più comune di questo tipo di derivati, ed è sintetizzato a partire dal **glucosio 1-fosfato** ed **uridina trifosfato** (UTP). Il processo di glicosilazione può essere visto come una reazione di sostituzione nucleofila  $S_N2$  di un generico nucleofilo (ad es.: ROH) sull'UDP-zucchero (Schema 8.18).

Poiché l'UDP-glucosio ha il gruppo uscente in configurazione  $\alpha$ , il prodotto finale avrà una configurazione  $\beta$ , che è quella più spesso ritrovata nei glicosidi naturali. Si noti tuttavia che molti importanti carboidrati, come il saccarosio e l'amido, possiedono legami  $\alpha$  e, se questo esclude un meccanismo  $S_N2$ , possono essere proposti processi alternativi del tipo  $S_N1$  o doppia  $S_N2$ .



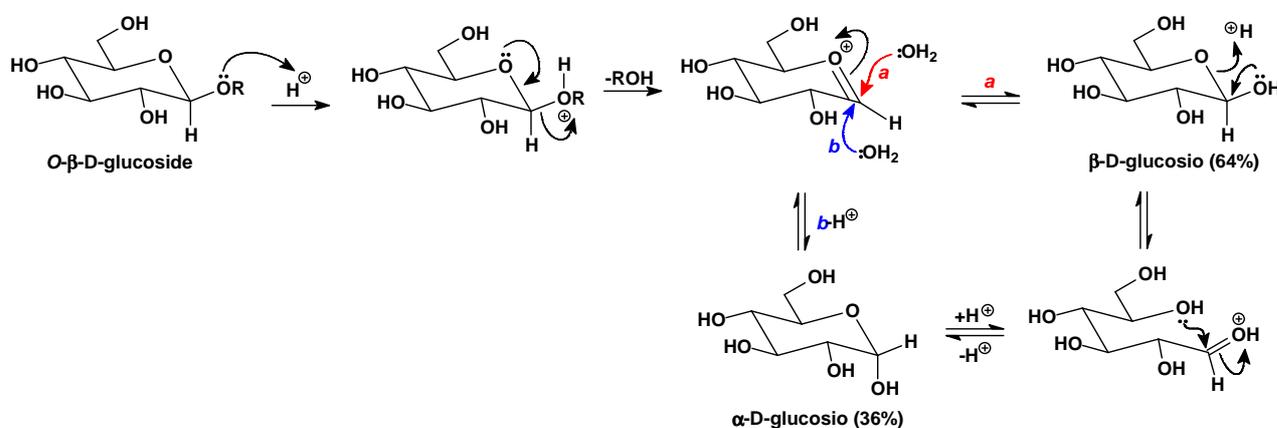
Schema 8.18. **ROH** rappresenta un generico aglicone o carboidrato.

Nella sintesi di glicosidi contenenti zuccheri differenti sono utilizzati altri UDP-zuccheri, come ad esempio l'UDP-galattosio. Nello schema 8.19 vengono riportati alcuni polisaccaridi importanti.



*Schema 8.19. Alcuni tipi di polisaccaridi.*

I glicosidi possono essere idrolizzati da specifici enzimi idrolitici, come ad esempio la  $\beta$ -glucosidasi per i  $\beta$ -glucosidi e la  $\beta$ -galattosidasi per i  $\beta$ -galattosidi. Questi enzimi imitano la facile idrolisi catalizzata da acidi (Schema 8.20).

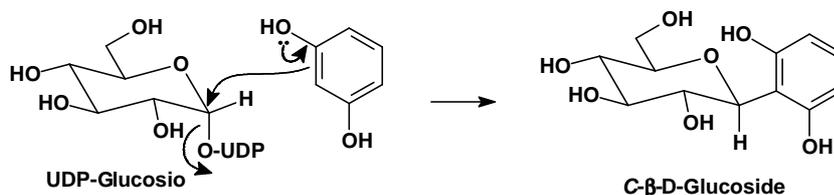


*Schema 8.20. Meccanismo di idrolisi di un glucoside e fenomeno della mutarotazione.*

In condizioni acide si osserva anche l'equilibrio tra le forme anomeriche  $\alpha$  e  $\beta$  degli emiacetali attraverso lo zucchero a catena aperta.

E' particolarmente importante notare che sebbene gli O-, S- e N-glicosidi possano essere idrolizzati dagli acidi, i C-glicosidi sono stabili a tali condizioni.

I C-glicosidi sono prodotti in maniera simile ad i processi di C-alkilazione qualora sia disponibile un opportuno carbonio nucleofilo (ad esempio sistemi aromatici attivati da gruppi fenolici), come riportato nello schema 8.21.



*Schema 8.21.*

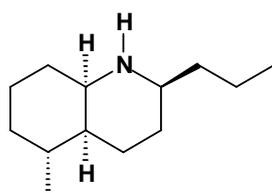
Il risultante C-glicoside contiene ora un nuovo legame carbonio-carbonio la cui rottura avviene solamente in condizioni ossidative.



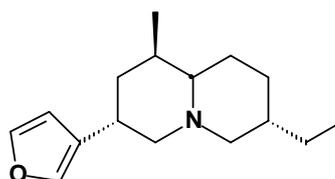
vegetale; recentemente però sono stati ritrovati composti con caratteristiche alcaloidiche anche nei microorganismi e negli animali. Un esempio è dato dalla batracotossina (2) e dalla pumiliossina C (3), isolate entrambe da rane, oppure la castoramina (4) isolata dal castoro canadese.



Circa 500 alcaloidi sono stati ritrovati nella pelle delle rane della famiglia Dendrobatidae. Sembra che siano immagazzinati, senza rimaneggiamenti, nelle ghiandole epidermiche delle rane a partire da alcaloidi contenuti in alcuni artropodi. Formiche, coleotteri e millepiedi sembrano essere l'origine delle decaidroquinoline, di alcune izidine, coccinelline e spiroirrolizidin-ossime. Tuttavia l'origine alimentare del principale gruppo di questi alcaloidi cutanei (pumiliossine, allopumiliossine e homopumiliossine), sembra essere un mistero. Cercando di rivelare negli artropodi l'origine delle pumiliossine, numerosi e piccoli artropodi sono stati catturati in diversi siti di Panama, dove si sapeva che le Dendrobates avevano livelli di pumiliossine molto alti. Gli artropodi catturati (più di 20 taxa) contenevano PTX (pumiliossina). Oltre a ciò contenevano derivati indolizidinici 5,8-disostituiti, che rappresentano un'altra classe di alcaloidi precedentemente sconosciuta negli artropodi.



3 (Pumiliossina C)



4 (Castoramina)

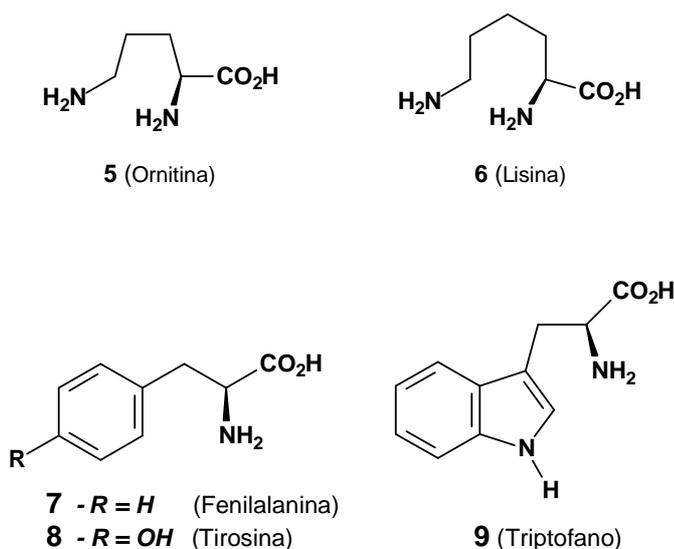
Alcuni alcaloidi sono stati isolati da funghi. Un esempio classico è dato dagli alcaloidi dell'Ergot, isolati dal fungo *Claviceps purpurea*. Le piante superiori rimangono, comunque, la principale fonte di alcaloidi, anche se la distribuzione fra le varie specie non è omogenea. Si è visto per esempio che gli alcaloidi sono maggiormente presenti nelle famiglie delle Leguminose e delle Solanacee, mentre sono praticamente assenti nelle Gimnosperme e nelle Criptogame. Si è notato inoltre che piante correlate presentano alcaloidi strutturalmente simili.

## Biosintesi

Da un punto di vista biosintetico gli alcaloidi derivano dagli amminoacidi da cui acquisiscono la porzione azotata, sebbene solo gli alcaloidi più semplici hanno una derivazione unica. Nella maggior parte dei casi, come vedremo, un determinato amminoacido o un suo metabolita, subisce

l'intervento di altre vie biosintetiche, legando così porzioni scheletriche che derivano ad esempio da unità acetato, unità isopreniche, ecc.

Una classificazione degli alcaloidi può essere fatta in base agli amminoacidi da cui provengono. Così possiamo classificarli come alcaloidi che derivano dal metabolismo degli amminoacidi alifatici, **ornitina (5)** e **lisina (6)**, e dal metabolismo degli amminoacidi aromatici, **fenilalanina (7)**, **tirosina (8)** e **triptofano (9)**.



Da notare che l'ornitina è un amminoacido non proteico che negli animali entra a far parte del ciclo dell'urea, dove è prodotto a partire dall'arginina in seguito alla perdita di una molecola di urea catalizzata dall'enzima arginasi. Nelle piante invece l'ornitina è formata prevalentemente dalla glutammina.

### ***La basicità degli alcaloidi***

Gli alcaloidi sono delle basi organiche azotate contenenti uno o più atomi di azoto di tipo aminico. In virtù di tale presenza generalmente queste sostanze hanno la caratteristica di possedere una certa basicità. Questa proprietà viene spesso sfruttata per l'isolamento e la purificazione degli alcaloidi, poiché consente di formare sali idrosolubili in presenza di acidi minerali.

Infatti dopo un'adeguata acidificazione degli estratti vegetali, è possibile separare una fase acquosa contenente il sale dell'alcaloide (o degli alcaloidi). Per riottenere l'alcaloide come base libera è

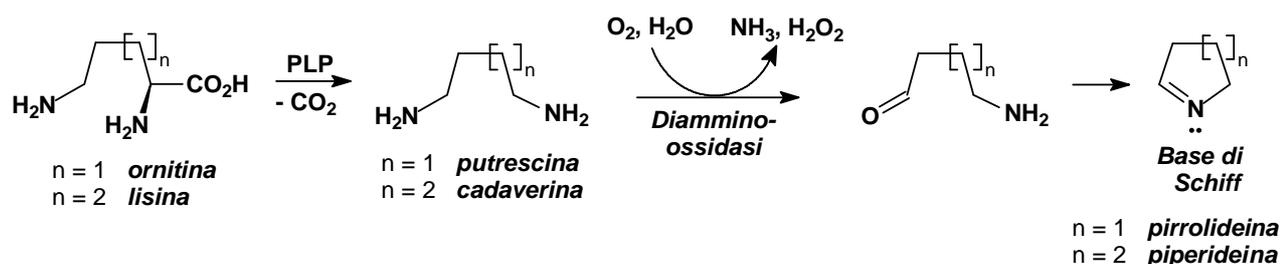
sufficiente effettuare un trattamento con una base come la soda; come base libera, l'alcaloide potrà essere recuperato per filtrazione (qualora precipiti dalla fase acquosa), oppure per estrazione con un solvente organico non miscibile con l'acqua.

Tuttavia, il grado di basicità è variabile e dipende dalla struttura dello specifico alcaloide ed in particolare dalla presenza e dalla localizzazione di altri gruppi funzionali. Sono stati infatti ritrovati in natura alcaloidi essenzialmente neutri ed altri contenenti sali di ammonio quaternari.

L'attività biologica di molti alcaloidi ha spesso una netta correlazione proprio con la trasformazione della funzione amminica in un sale di ammonio per protonazione a pH fisiologico.

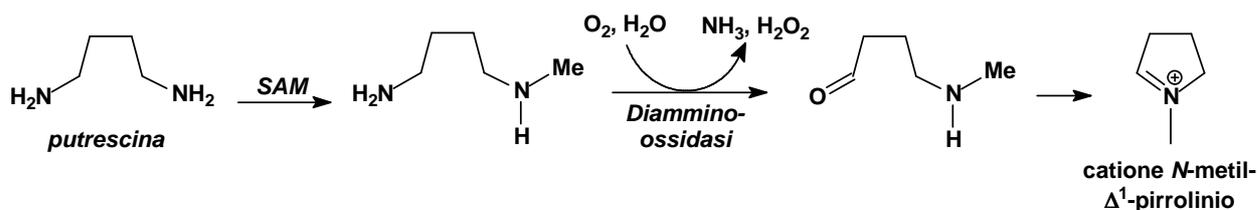
### *Alcaloidi derivanti da ornitina e lisina*

Gli alcaloidi che incorporano anelli **pirrolidinici** e **piperidinici** provengono rispettivamente dal metabolismo dell'**ornitina** (5) e della **lisina** (6). Questi amminoacidi possono subire una decarbossilazione ad opera del piridossalfosfato (PLP), con formazione di una diammina (rispettivamente putrescina e cadaverina); in seguito, l'intervento di una diammino-ossidasi comporta la perdita di un gruppo amminico con formazione di una  $\gamma$ - o di una  $\delta$ -amminoaldeide. Queste aminoaldeidi vengono convertite nelle corrispondenti basi di Schiff, ovvero **pirrolideina** e **piperideina** (Schema 9.1).



*Schema 9.1. Biosintesi dei nuclei pirrolideinico e piperideinico come basi di Schiff.*

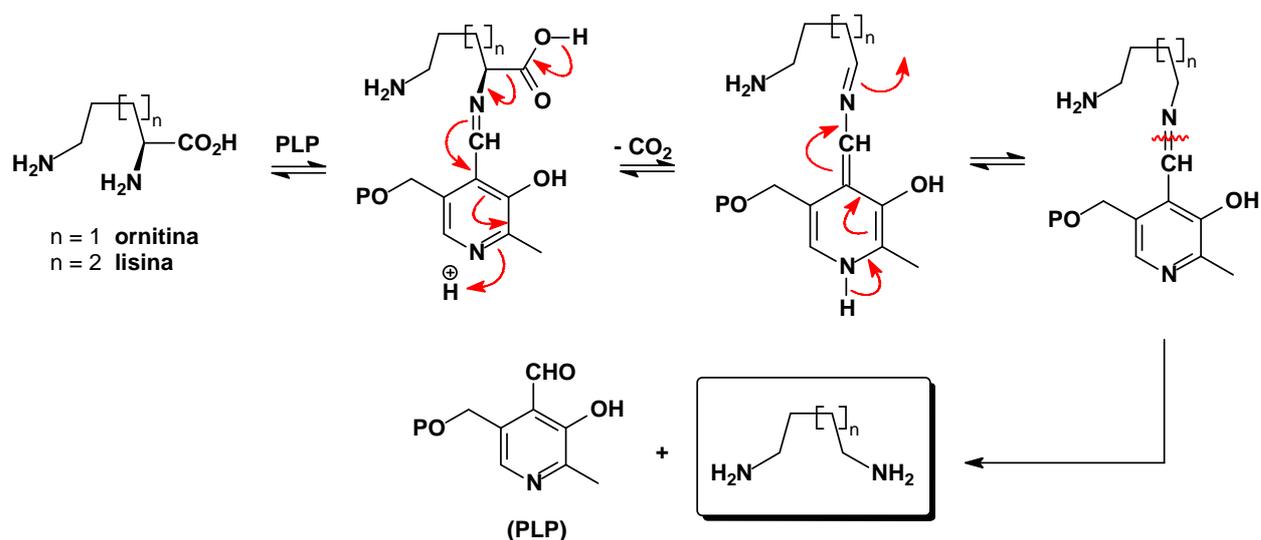
Spesso l'azoto di questi sistemi eterociclici presenta un gruppo metilico, il quale viene inserito tramite la SAM (S-adenosil metionina). Nei sistemi pirrolidinici il metile viene inserito a livello della putrescina, che di conseguenza porta alla formazione della base di Schiff come “**catione N-metil- $\Delta^1$ -pirrolinio**” (Schema 9.2).



*Schema 9.2. Formazione del catione N-metil- $\Delta^1$ -pirrolinio.*

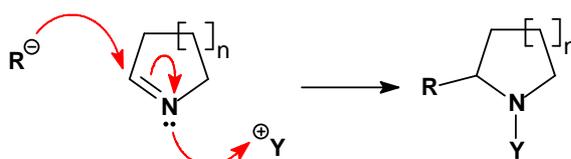
Nei sistemi piperidinici in genere tale metilazione, sempre ad opera della SAM, si verifica dopo che il sistema eterociclico è stato incorporato nello scheletro dell'alcaloide.

Di seguito viene riportato il meccanismo della decarbossilazione dell'ornitina (o della lisina) catalizzata dal piridossal fosfato (Schema 9.3).



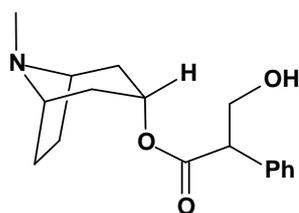
*Schema 9.3. Meccanismo di decarbossilazione dell'ornitina e della lisina e formazione delle diamine.*

Le basi di Schiff così ottenute possono dare reazioni tipo **Mannich** (Schema 9.4) reagendo con opportuni nucleofili, dando composti molto vari:

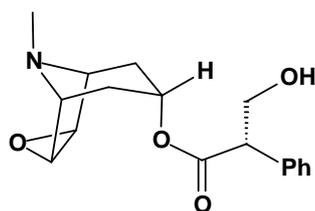


*Schema 9.4*

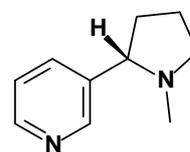
Fra gli alcaloidi che provengono da questo schema biosintetico ci sono la **iosciamina (10)** e la **scopolamina (11)** (genericamente note come **tropine**), la **coniina (1)** e la **nicotina (12)**.



10 (Iosciamina)



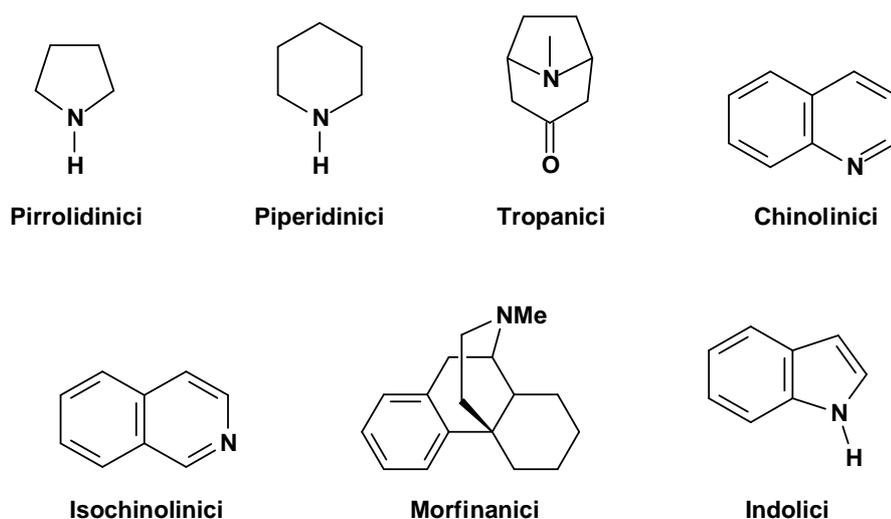
11 (Scopolamina)



12 (Nicotina)

Come già detto la biosintesi degli alcaloidi è estremamente complessa e per ogni composto esiste una via biosintetica a sé. E' impossibile, quindi, tracciare delle vie biosintetiche comuni come già fatto per altri metaboliti secondari. D'altro canto è impossibile semplicemente elencare tutti i diversi alcaloidi, ed anche volendo limitare l'elenco a quelli dotati di attività farmacologica o per tipo di attività farmacologica, questo sarebbe comunque lungo e problematico.

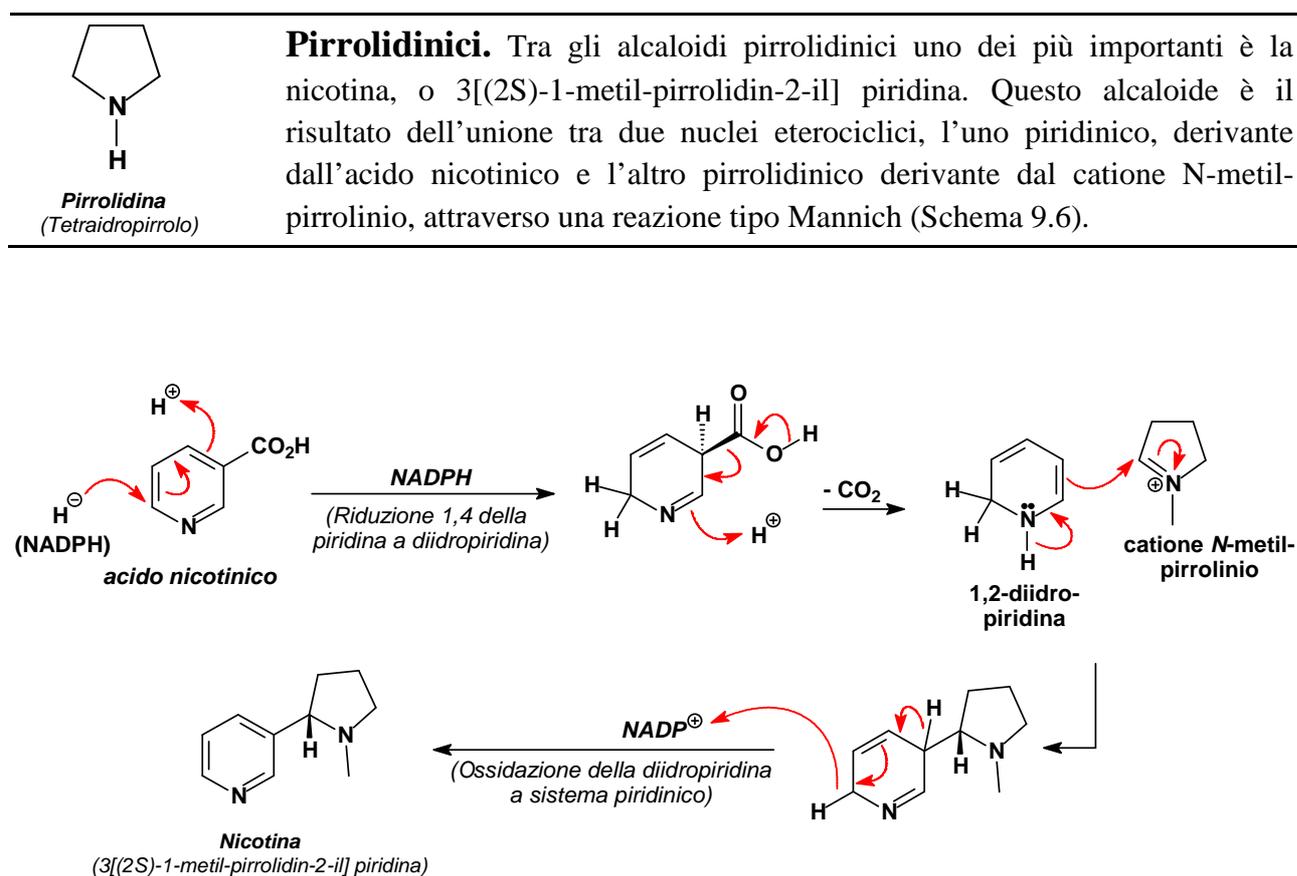
Per questo motivo generalmente vengono classificati in base alla natura della substruttura che contiene l'azoto, identificando quindi dei sistemi eterociclici di base piuttosto semplici, come ad esempio quelli pirrolidinici, piperidinici, chinolinici, isochinolinici, indolici etc. (Schema 9.5). Anche questo metodo di classificazione può presentare complicazioni dovute al possibile aumento della complessità strutturale di alcuni alcaloidi, che inevitabilmente comporta anche un incremento del numero delle possibili suddivisioni.



*Schema 9.5. Sistemi eterociclici di base di alcuni alcaloidi.*

## Tipi di alcaloidi

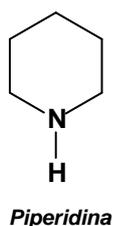
Data la notevole variabilità e numero degli scheletri presenti negli alcaloidi, è difficile fare una panoramica generale, per cui vengono riportati solamente alcuni dei più rappresentativi.



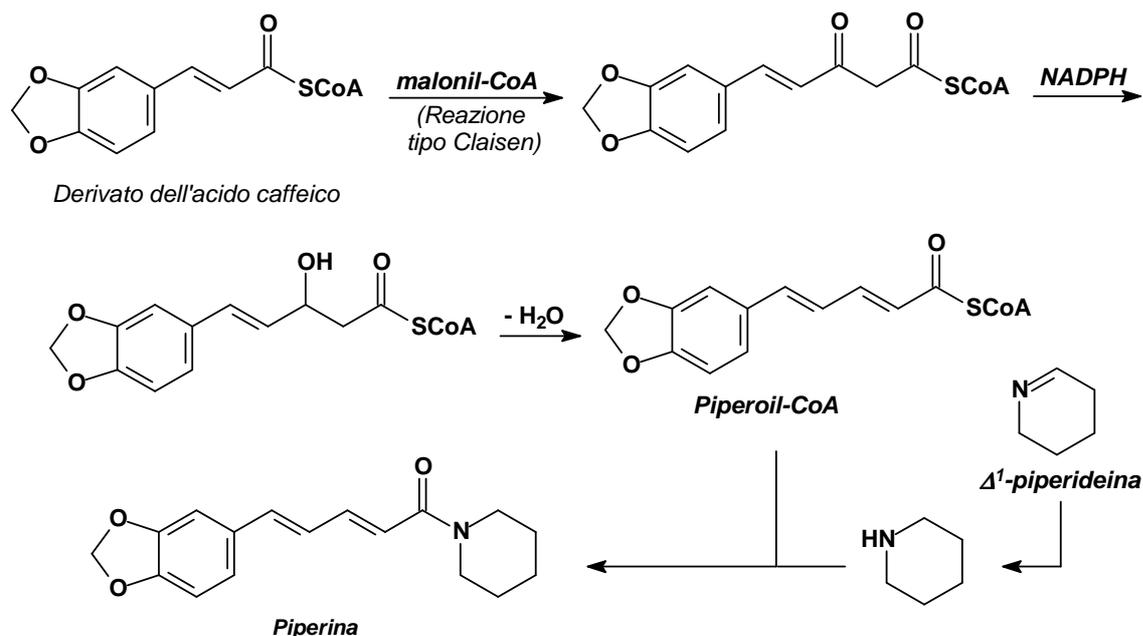
**Schema 9.6.** Biosintesi della nicotina.

La **nicotina**, un alcaloide presente nella pianta del tabacco, si trova in tutte le parti della pianta, ma è particolarmente concentrato nelle foglie, in cui costituisce circa il 0.3 - 5% del peso secco. La biosintesi della nicotina avviene nelle radici, venendo poi accumulata nelle foglie. La nicotina pura è un liquido incolore, che all'aria imbrunisce, acquisendo l'odore del tabacco. È un potente veleno neurale ed era incluso nella formulazione di vari insetticidi.

A basse concentrazioni è una sostanza stimolante ed è uno dei principali fattori legati al piacere ed all'abitudine del fumo del tabacco (nel senso che crea dipendenza). Oltre alla pianta del tabacco, la **nicotina** è inoltre presente in quantità minori in altri membri della famiglia delle solanacee, come ad esempio il pomodoro, la patata, la melanzana ed il peperone.

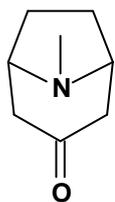


**Piperidinici.** Un rappresentante interessante per questa classe di alcaloidi è la piperina, a cui si deve il sapore piccante dei frutti del pepe nero (*Piper nigrum*; Piperaceae). Il nucleo piperidinico presente nella piperina viene introdotto attraverso una reazione di amidazione tra il piperoil-CoA e la piperidina, proveniente dalla riduzione della  $\Delta^1$ -piperideina (Schema 9.7). Come risultato si ha la perdita della basicità dell'alcaloide, in quanto presenta le caratteristiche chimiche tipiche delle amidi.



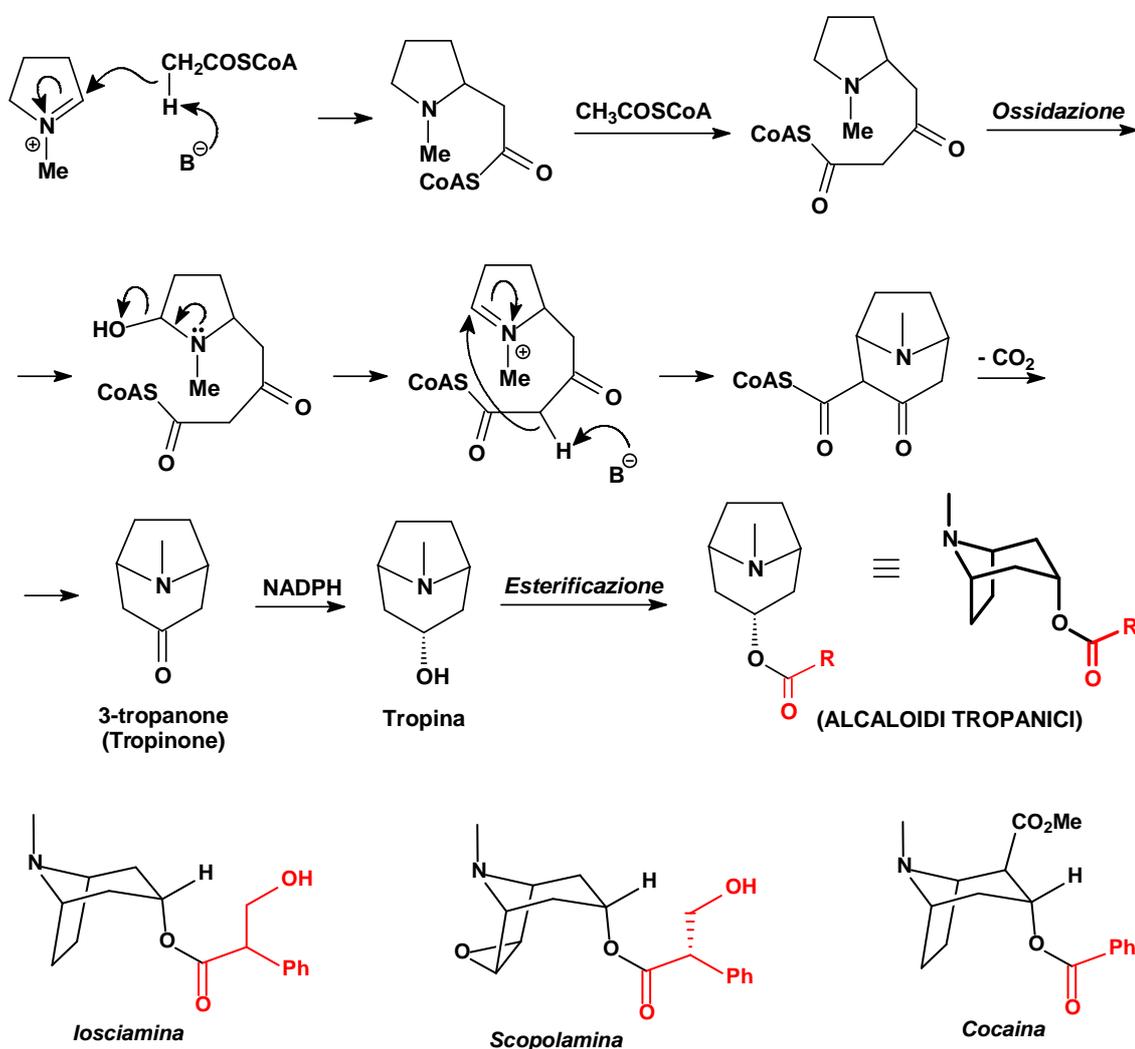
Schema 9.7. Biosintesi della piperina.

**Storia:** re delle spezie, il pepe è sempre presente sulle nostre mense, accanto al sale e all'olio: è divenuto una spezia così diffusa da farci quasi dimenticare la sua origine orientale e il suo altissimo valore economico nel mondo antico. Sebbene conosciuto in Asia Occidentale fin da tempi antichissimi (in sanscrito il suo nome era "pippali"), in Europa giunse solo nel IV° secolo a. C. con Alessandro Magno. Era già apprezzato nella Roma antica tanto che il tesoro pubblico dell'Impero era calcolato in sacchi di pepe. Era utilizzato nelle ricette più varie, soprattutto in combinazione con miele, noci e latte. Prezioso quanto l'oro, il pepe fu il principale responsabile della grande spinta ai commerci con l'estremo Oriente. Dopo la caduta dell'Impero bizantino, fu Venezia l'unico agente per la distribuzione del pepe e delle altre spezie in Europa e punto di raccolta dell'oro che veniva mandato in Oriente come pagamento. Quando finalmente, grazie alle scoperte dei grandi navigatori del XV° secolo, venne circumnavigata l'Africa, il monopolio delle spezie lo acquisì Lisbona e soprattutto Anversa, dove si accumulavano il rame e l'argento delle miniere tedesche con cui veniva pagato il pepe. Vasco de Gama nel 1504 portò in Europa 5.000 tonnellate di pepe e 35.000 quintali di altre spezie. Il commercio del pepe fu legato indissolubilmente allo sviluppo capitalistico dell'economia mondiale fino a quando altri beni di consumo non presero il sopravvento. Il Brasile e il Madagascar oggi sono tra i maggiori produttori di pepe nel mondo, mentre l'America è il principale paese importatore. **Proprietà terapeutiche:** in dosi limitate è un buon digestivo perché migliora la digestione dei carboidrati e dei grassi. Si consiglia sempre un uso moderato del pepe dal momento che, se consumato spesso e in notevole quantità, può provocare piccoli sanguinamenti della mucosa gastrica, con aumento dell'acidità, riduzione del potassio ed ipertensione arteriosa.



**Tropanone**  
(8-metil-8-aza-biciclo  
[3.2.1] ottano)

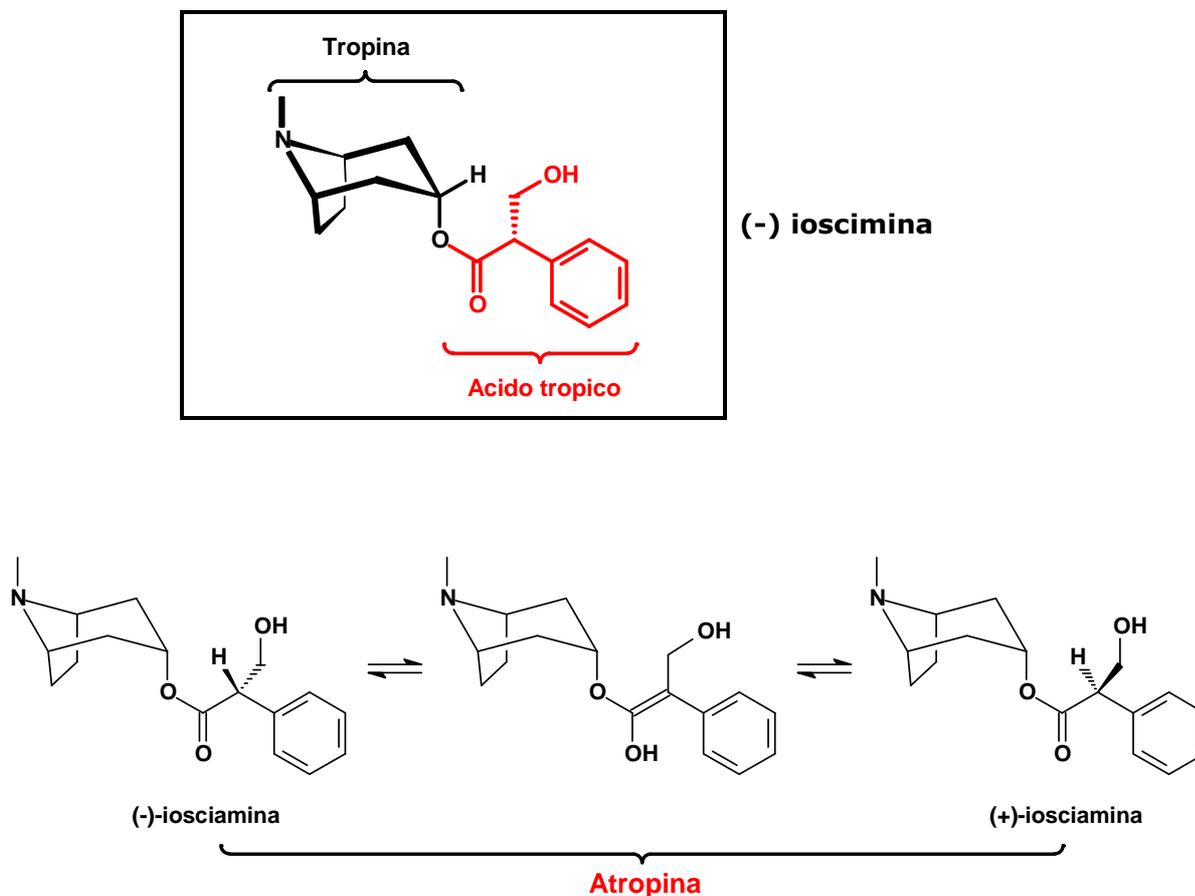
**Tropanici.** Il tropano (8-metil-8-aza-biciclo[3.2.1]ottano) è il nucleo presente negli alcaloidi appartenenti alla famiglia delle tropine, come la (S)-iosciamina, la scopolamina e la cocaina. Il precursore per la biosintesi del nucleo tropanico è il catione N-metil-pirrolinio che reagisce con una unità di AcetilCoA tramite reazione di Mannich. Successivamente si addiziona una seconda unità di AcetilCoA con il solito meccanismo di condensazione di Claisen. Il ripristino della base di Schiff sull'anello pirrolidinico consente la ciclizzazione finale della catena laterale attraverso una seconda reazione di Mannich (Schema 9.8). La riduzione del tropanone a tropina viene poi seguita da una reazione di esterificazione con determinati acidi, ottenendo così i vari alcaloidi.



*Schema 9.8. Biosintesi e strutture di alcuni alcaloidi tropanici.*

L'**atropina** è la **forma racemica della iosciamina**; questo processo di racemizzazione è un fenomeno spontaneo (dovuto ad un meccanismo di tautomeria chetoenolica), che si può verificare

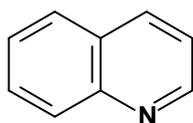
in seguito al processo di estrazione o all'invecchiamento della droga (Schema 9.9).



**Schema 9.9.** Fenomeno della tautomeria chetoenolica nella racemizzazione della (-) iosciamina ad atropina.

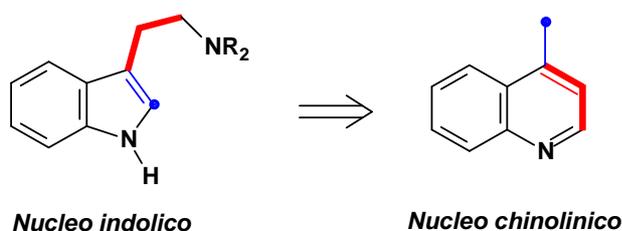
L'**atropina** è un alcaloide presente in diverse piante della famiglia delle solanacee come ad esempio l'*Atropa belladonna*, il *Datura stramonium* e lo *Hyoscyamus niger*.

**Effetti dell'atropina sull'organismo umano.** Si lega ai recettori dell'acetilcolina muscarinici, provocando effetti parasimpaticolitici senza proprie attività intrinseche: spasmolisi di muscolatura liscia, midriasi e paralisi dell'accomodazione visiva, diminuzione dell'escrezione di ghiandole esocrine, tachicardia, soppressione di nausea e vomito; in dosi alte (> 3 mg) comincia la stimolazione nervosa centrale che aumentando, conduce a paralisi letale del sistema nervoso centrale. Viene utilizzata come spasmolitico in diverse patologie del tratto gastrointestinale, nell'asma, in certe forme costipative, nella tosse canina, negli spasmi vasali, nelle coliche, nell'epilessia, per la corea Huntington, spasmolitico preventivo in interventi chirurgici, midriatico in oftalmologia. Viene inoltre utilizzata come antidoto per vari avvelenamenti come ad esempio da: digitalis (glicosidi cardioattivi), sostanze belliche chimiche con effetti parasimpaticomimetici (gas nervivi), veleni organo-fosforici, muscarina, pilocarpina, fisostigmina.

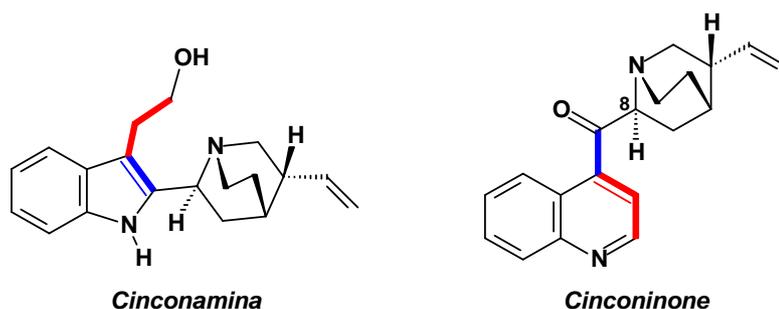


Chinolina

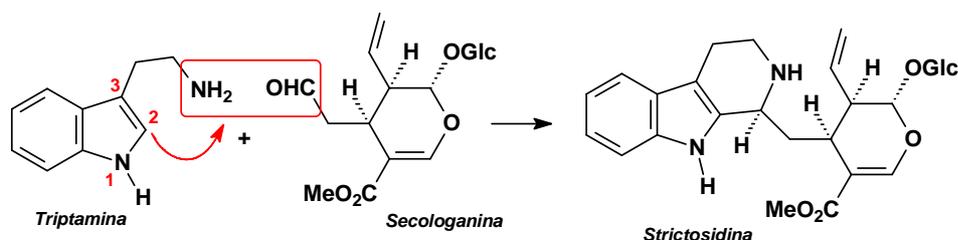
**Chinolinici.** Fra questi alcaloidi particolarmente rappresentativi sono gli estratti della China (*Cinchona*). Dal punto di vista chimico gli alcaloidi chinolinici si ottengono per riarrangiamento di un nucleo indolico a nucleo chinolinico. Questa correlazione biogenetica era stata ipotizzata da lungo tempo, poiché la **cinconamina**, (derivato a struttura indolica) è sempre contenuto nella pianta insieme agli alcaloidi chinolinici.



Analogie strutturali tra la **cinconamina** (nucleo indolico) ed il **cinconinone** (nucleo chinolinico):

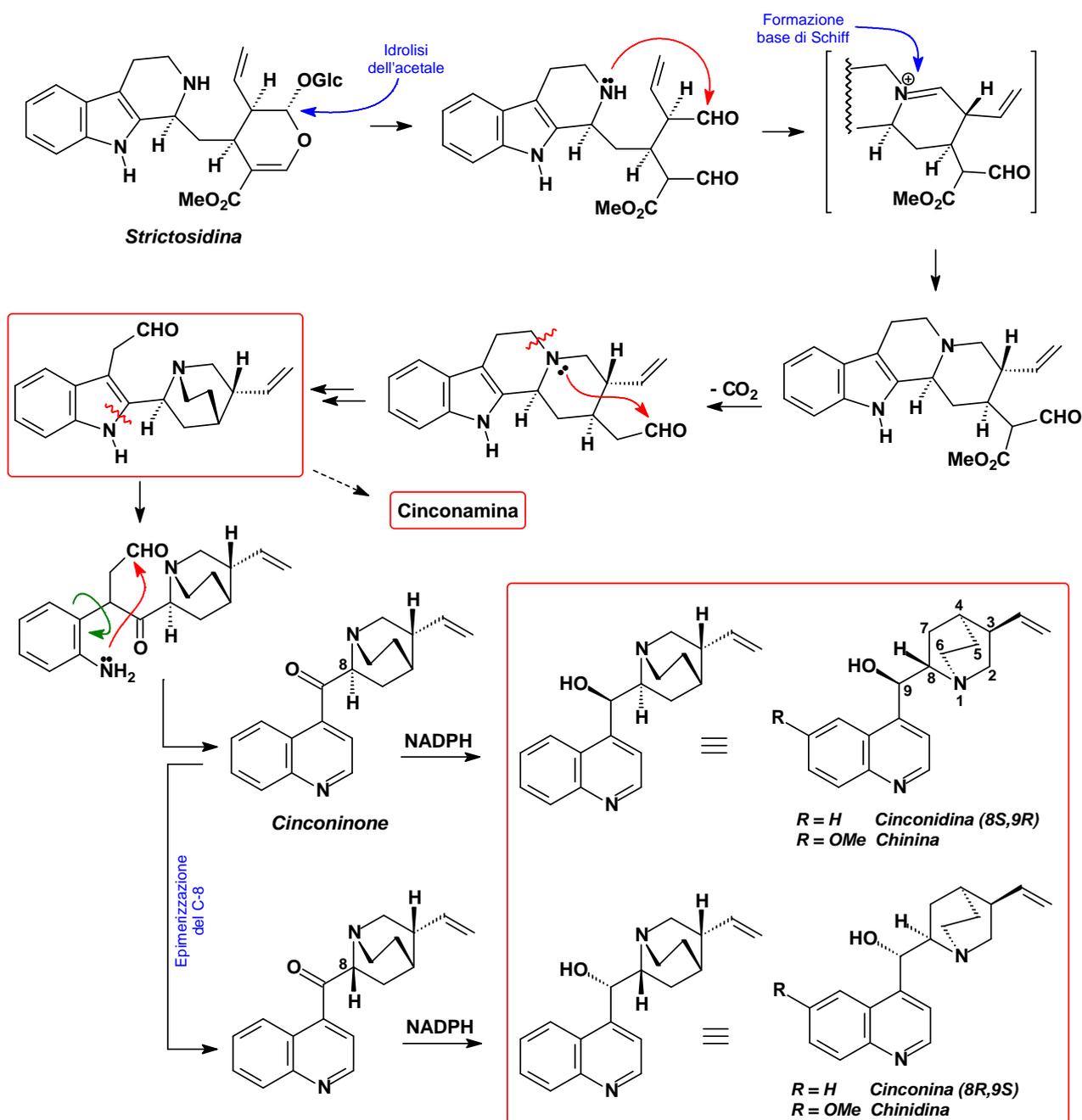


La biosintesi degli alcaloidi chinolinici comincia con la condensazione della triptamina, prodotto dalla decarbossilazione del triptofano, con la secologanina, un monoterpene appartenente ai secoiridoidi (pag. 33). Da questa reazione si forma il caratteristico sistema tricyclico della **strictosidina** (Schema 9.10), attraverso un meccanismo che coinvolge la formazione di una base di Schiff e successivo attacco su questa del carbonio 2 del nucleo indolico.



*Schema 9.10. Biosintesi della strictosidina.*

La strictosidina è un alcaloide comune a diverse vie biosintetiche (ajmalicina, yoimbina etc.), caratterizzato ancora dalla presenza del nucleo indolico. In seguito si verificano diverse trasformazioni, tra cui il riarrangiamento del nucleo indolico a nucleo chinolinico, che avviene a carico di un intermedio aldeidico da cui deriva anche la cinconamina (evidenziato in rosso). Questo riarrangiamento porta alla formazione del **cinconinone**, un intermedio con nucleo chinolinico, da cui si originano alcuni degli alcaloidi più importanti di questa classe: **cinconina**, **cinconidina**, **chinina** e **chinidina** (Schema 9.11).



Schema 9.11. Biosintesi degli alcaloidi chinolinici.

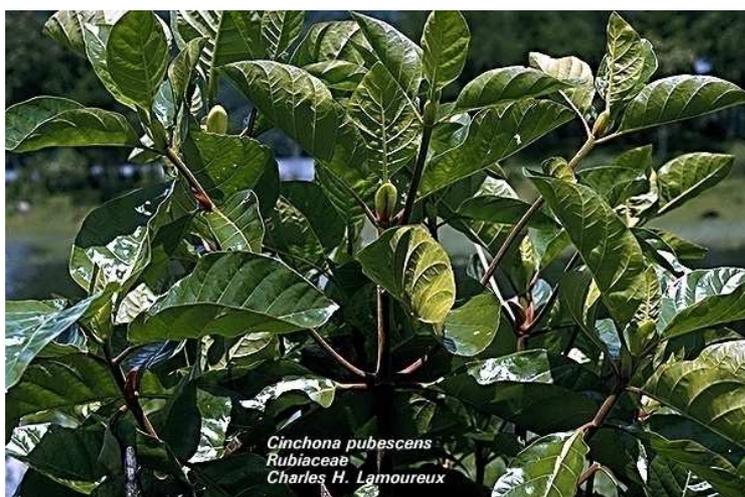
Il "**chinino**" (o chinina) è il principale alcaloide della Cinchona (droga costituita dalla corteccia dell'albero della Cinchona, originario di alcune regioni del Sud America). In realtà dalla Cinchona si possono estrarre circa una ventina di alcaloidi, tra cui i più importanti sono le due coppie di isomeri ottici *chinina-chinidina* e *cinconidina-cinconina*.

La prima testimonianza scritta sull'uso della Cinchona si trova in un libro di argomento religioso scritto nel 1633 e pubblicato in Spagna nel 1639. L'autore, un monaco agostiniano di nome Calancha, che viveva a Lima (Perù), scrive:

*"nella contrada di Loxa cresce un albero, che essi chiamano l'albero della febbre la cui corteccia, del colore della cannella, ridotta in polvere e data in una quantità pari al peso di due piccole monete di argento, sotto forma di bevanda, è capace di guarire le febbri e la terzana; a Lima essa ha dato risultati miracolosi".*

Il chinino influenza una così larga varietà di sistemi biologici da meritarsi la definizione di "veleno protoplasmatico generale" con qualche riserva questa definizione probabilmente è corretta, in quanto esso si dimostra tossico per molti batteri ed altri organismi unicellulari, quali tripanosomi, infusori, funghi, plasmodi e spermatozoi. Malgrado questo largo spettro di attività, il chinino è, nella sua azione, notevolmente specifico.

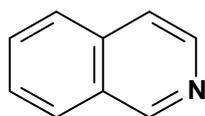
Fino alla terza decade di questo secolo, gli alcaloidi della Cinchona rappresentarono l'unica sostanza chemioterapia ad azione specifica contro la malaria. Sebbene oggi esistano farmaci antimalarici sintetici, il fenomeno dell'insorgenza di ceppi resistenti di plasmodi rende necessaria la reperibilità e quindi la disponibilità di tali antimalarici. La sua azione principale è quella schizonticida, e sugli sporozoitici o sulle forme preeritocitarie tissutali non esercita effetti letali.



*Cinchona pubescens*



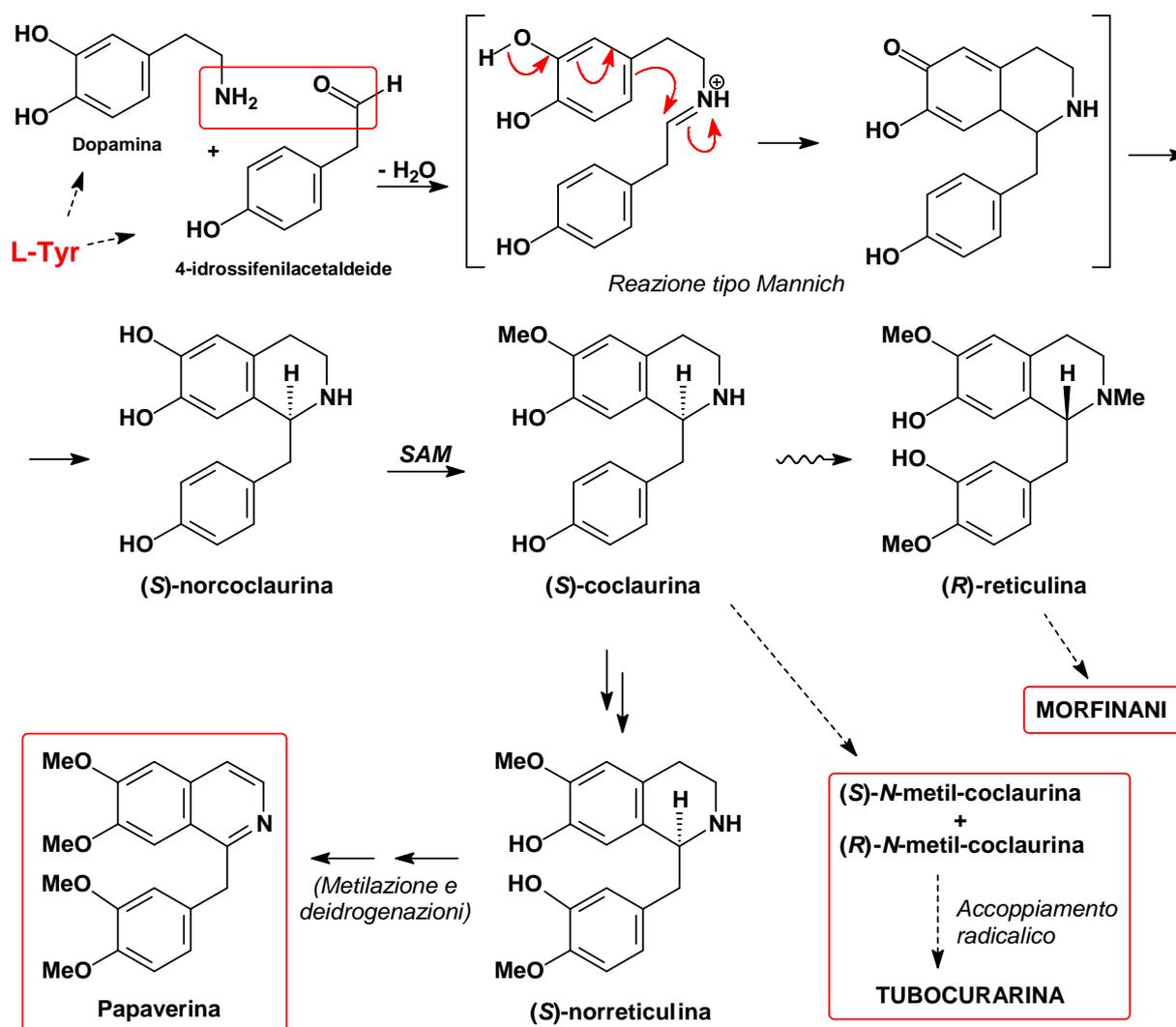
*Corteccia di Cinchona*



Isochinolina

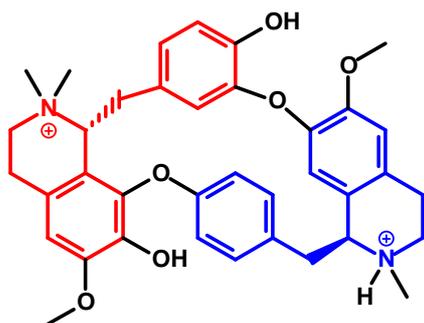
**Isochinolinici.** A questa classe di alcaloidi fa parte la papaverina, che più esattamente è un derivato 1-benzil-isochinolinico. E' uno dei pochi esempi di alcaloidi che derivano esclusivamente da aminoacidi. Dalla tirosina, infatti, si ottengono i due intermedi che per condensazione forniscono la base di Schiff necessaria alla formazione del sistema tetraidroisochinolinico (come ad es. la *(S)*-norcoclaurina).

Da notare che la *(S)*-coclaurina è anche un intermedio nella biosintesi della *(R)*-reticulina (precursore dei morfina) e della *(S)*-*N*-metil-coclaurina (precursore della tubocurarina).



Schema 9.12. Biosintesi della papaverina.

La **papaverina** è un alcaloide contenuto nell'oppio. Stimola la respirazione ed esercita una modesta attività analgesica e anestetica locale. Possiede un potente effetto antispastico, per l'azione decontratturante esercitata sulle fibre muscolari lisce. In terapia viene somministrata per bocca o per via parenterale nelle coliche biliari e renali, negli spasmi dell'intestino, e inoltre come vasodilatatore e antianginoso.



(+)-Tubocurarina

Rosso = residuo di (*R*)-*N*-metil-coclaurina

Blu = residuo di (*S*)-*N*-metil-coclaurina

La **tubocurarina** è il principale alcaloide del curaro, che è un estratto vegetale preparato a partire da varie piante della foresta amazzonica, che può contenere fino a 30 sostanze differenti con una composizione estremamente eterogenea.

Nel XVI secolo gli esploratori occidentali osservarono gli indigeni delle zone del Perù, Brasile, Ecuador e Colombia usare un veleno da freccia chiamato *Curari* o *Woorali*, in grado di uccidere animali e uomini in pochi minuti, anche solo dopo una ferita superficiale. Sebbene il veleno sia mortale quando penetra direttamente nel torrente ematico, può essere usato per la caccia perché viene degradato facilmente dai succhi gastrici. È solo nel XIX secolo che la preparazione del curaro fu descritta in maniera dettagliata ed esatta, da parte di grandi esploratori come von Humboldt e Bonpland.

Il curaro viene preparato a partire da *chondrodendron tomentosum*, *abuta* e *curarea* (tutte liane), mescolate a volte con *strychnos*. Le cortecce vengono grattate e poste in una foglia messa a guisa di imbuto. Viene versata dell'acqua fredda nell'imbuto e fatta percolare. Il liquido scuro così ottenuto viene fatto evaporare tramite ebollizione su fuoco fino a farlo addensare. Il prodotto finale è di colore marrone scuro o nero e dalla consistenza catramosa.

*Gli indigeni parlavano di "curaro un albero" e "curaro tre alberi" per distinguere il curaro potente (una scimmia avvelenata può solo compiere un balzo da un albero ed un altro) e quello meno potente (la scimmia può saltare fino a tre alberi), che non necessariamente porta alla morte.*

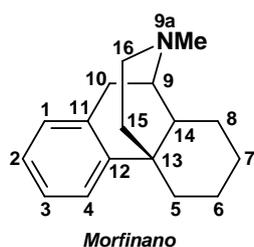
Da notare che intorno al 1880 è stato scoperto che il contenitore tradizionale usato per contenere il curaro era abbastanza indicativo dei principali ingredienti che costituivano quella specifica preparazione. Fondamentalmente ne furono riconosciuti tre tipi:

- **tubo curaro**, contenuto in canne di bambù, che deriva principalmente dalla pianta rampicante *chondrodendron tomentosum* (Menispermaceae);
- **calabasso curaro**, contenuto in zucche vuote, che deriva principalmente dalla *Strychnos toxifera* (Loganiaceae);
- **vaso curaro**, conservato in piccoli vasi di terracotta, che deriva quasi sempre da una miscela di piante delle Loganiaceae e delle Menispermaceae.

Le fonti attuali di curaro sono soprattutto Menispermaceae (ad es. *chondrodendron*).

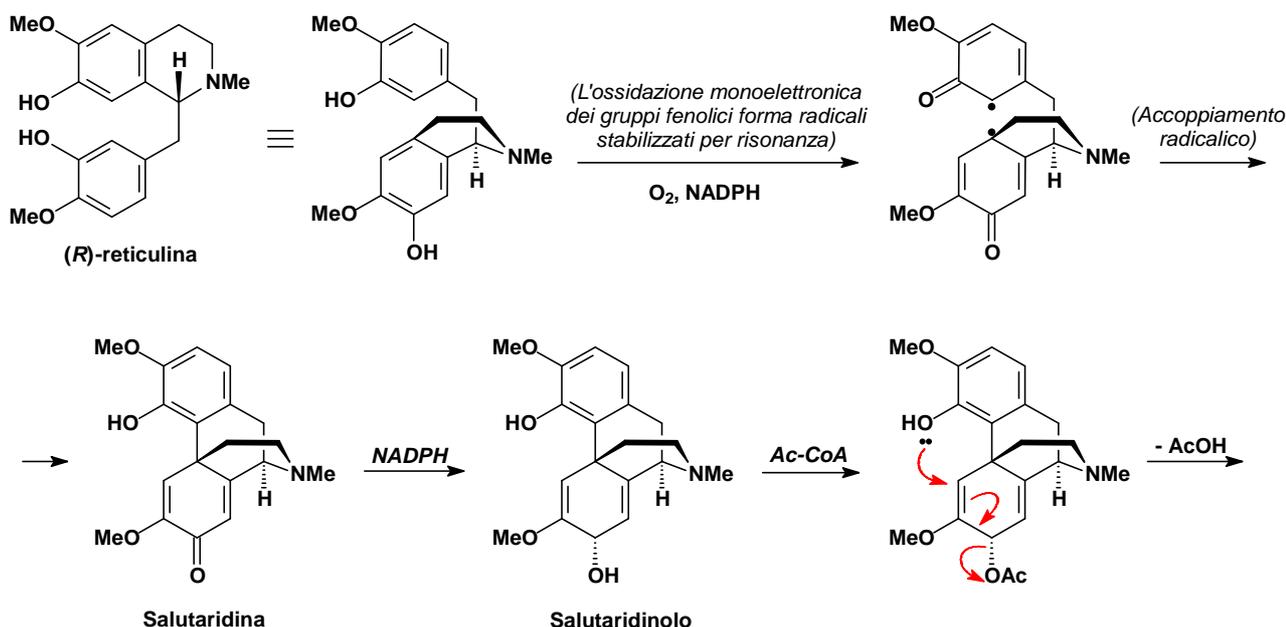
Nel 1820 Charles Waterton comprese il meccanismo d'azione del curaro: sperimentò infatti il veleno su una mula che finì in morte apparente per poi venire rianimata grazie alla ventilazione forzata. La pianta agisce quindi sulla respirazione, bloccandola e provocando la morte per asfissia. Nel 1844 il grande fisiologo francese Claude Bernard conferma che il curaro agisce bloccando la trasmissione nervosa alla muscolatura.

Il curaro, infatti, blocca i recettori nicotinici muscolari dell'acetilcolina, bloccando così la trasmissione dell'impulso nervoso dal nervo al muscolo, che quindi resta paralizzato (rilassamento flaccido dei muscoli volontari). La morte sopravviene perché i muscoli respiratori smettono di funzionare.



**Morfinanici.** I più importanti alcaloidi che incorporano questo scheletro sono gli alcaloidi dell'oppio come la morfina, la codeina e la tebaina. Da notare che l'acetilazione della morfina porta all'eroina (un pericoloso stupefacente semisintetico). Dal punto di vista biosintetico gli alcaloidi morfinanici derivano dalla **(R)-reticulina**, che si origina dalla **(S)-coclaurina**, un intermedio comune con la biosintesi degli alcaloidi isochinolinici. Di conseguenza anche in questo caso l'aminoacido necessario alla biosintesi di questi alcaloidi è la tirosina.

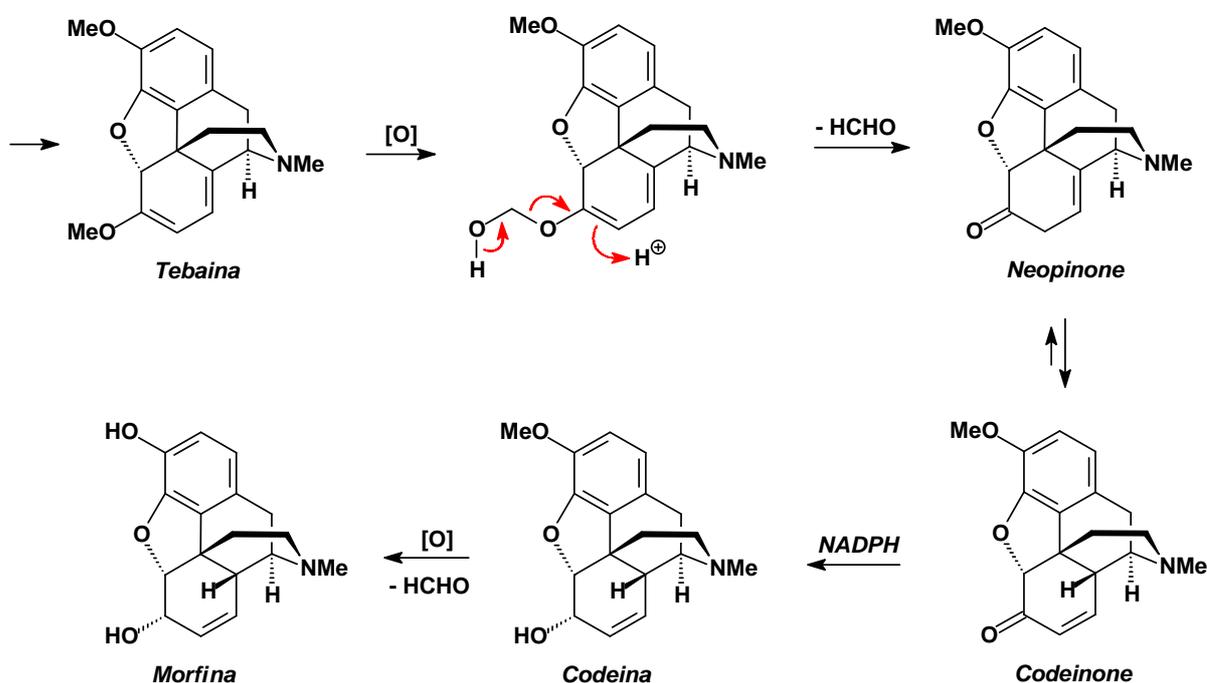
Dalla **(R)-reticulina**, con un meccanismo di accoppiamento radicalico, si ottiene il sistema tetraciclico del nucleo morfinanico, sui cui avvengono diverse trasformazioni, tra cui la formazione del ponte etereo (Schema 9.13). Questa trasformazione è facilitata dalla conversione della funzione alcolica del **salutaridinolo** nel corrispondente acetato, un gruppo uscente migliore. Da notare che questa ciclizzazione avviene spontaneamente (senza l'intervento enzimatico); infatti la fuoriuscita dell'acetato comporta lo spostamento del doppio legame enolico, consentendo l'attacco nucleofilo da parte della funzione fenolica.



*Schema 9.13. Biosintesi e struttura di alcuni alcaloidi morfinanici.*

Da questa ciclizzazione si ottiene la **tebaina** che, dopo una reazione di demetilazione, porta al **neopinone** (Schema 9.14), il quale viene trasformato in **codeinone** attraverso una isomerizzazione del doppio legame (per tautomeria cheto-enolica) che conduce ad un sistema coniugato termodinamicamente più stabile (chetone  $\alpha,\beta$ -insaturo). La riduzione del codeinone con NADPH conduce alla **codeina** che, per demetilazione, porta infine alla **morfina**. Da notare che le reazioni di

demetilazione avvengono probabilmente attraverso una iniziale ossidazione del metile (ossidrilazione), che viene poi perso come formaldeide.



Schema 9.14. Biosintesi e struttura di alcuni alcaloidi morfinaici.

La **morfina** è un alcaloide che si trova maggiormente nei pericarpi immaturi di *Papaver somniferum* (fig. 1), che viene isolata dall'oppio (il succo gommoso uscente dal pericarpo immaturo dopo un'incisione, fig. 2) ed è un potente analgesico-narcotico, in grado di alleviare il dolore forte. Per le sue proprietà narcotiche e perché provoca grave dipendenza è sottoposta alle leggi sugli stupefacenti. Negli anni 60 è stato dimostrato che l'azione della morfina, e degli oppiacei in generale, è dovuta alla loro capacità di superare la barriera ematoencefalica e legarsi ai **recettori oppioidi** delle cellule cerebrali, specialmente nel talamo e nel sistema limbico, inibendo la trasmissione nocicettiva periferica al sistema nervoso centrale e influenzando l'emotività ed il comportamento. In assenza di morfina tali recettori sono bersaglio naturale delle endorfine e delle encefaline, due classi di sostanze sintetizzate dall'organismo per attenuare il dolore.



Fig. 1. *Papaver somniferum*

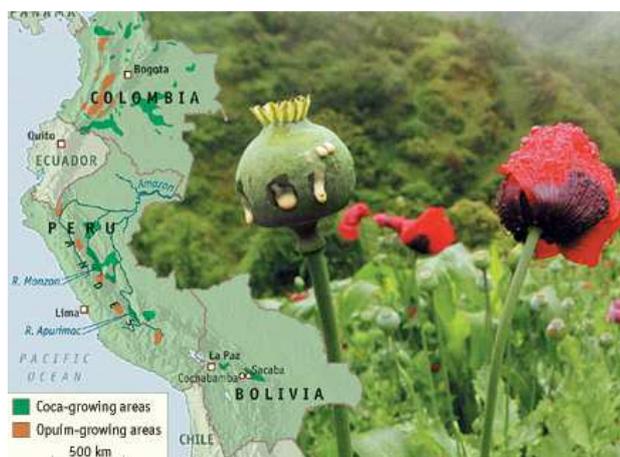


Fig. 2. Particolare della capsula del papavero da oppio e zone di coltivazione nell'America meridionale

**Notizie storiche sull'oppio.** Sono state ritrovate capsule di *Papaver somniferum* addirittura negli scavi di palafitte dell'uomo di Cro-Magnon datate fra i 20.000 e i 30.000 anni fa, anche se non è possibile stabilire se gli abitanti del sito conoscessero le proprietà di tali piante. Sappiamo per certo invece che i Sumeri di 5.000 anni fa le conoscevano bene, e tramandarono l'uso del papavero da oppio alle successive civiltà caldea e assiro-babilonese: questi ne introdussero l'uso in Egitto verso il 1500 a.C. Il Libro ermetico dei medicinali, un antico papiro egiziano, raccomanda l'uso del papavero da oppio come sedativo. Ippocrate, nel IV secolo a.C., consigliava l'oppio come rimedio per numerosi mali, ma già un secolo dopo Erasistrato metteva in guardia i suoi allievi e i colleghi medici contro l'uso frequente di questo medicinale, che poteva rivelarsi gravemente dannoso.

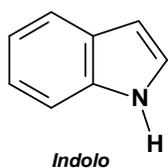
L'oppio fece il suo ingresso nella civiltà romana quando questa conquistò la Grecia; Dioscoride, nel I secolo d.C., descrive accuratamente la pianta del papavero da oppio e le proprietà della sua linfa, elencando anche una serie di possibili usi. Si deve però a Galeno la diffusione fra i medici di Roma della teriaca, inventata da Andromaco, medico personale di Nerone: un farmaco che conteneva, fra l'altro, una discreta quantità di oppio. Dopo la caduta dell'impero romano non vi sono quasi più notizie sul consumo di oppio in Europa, mentre nella farmacologia araba venne introdotto da Avicenna verso l'anno Mille: secondo il suo discepolo e biografo Abu Al Guzani fu proprio questa sostanza la causa della morte del maestro. Ma già nella seconda metà del Medioevo in Europa il consumo di oppio era andato aumentando, tanto da suscitare reazioni ufficiali nella classe medica: la Santa Inquisizione giunse al punto di vietarne l'uso anche come medicinale. Nel XVI secolo in Turchia e in Egitto l'uso di oppio era estremamente diffuso a livello popolare.

In Cina l'introduzione dell'oppio avvenne presumibilmente verso il 2800 a.C., ma l'uso popolare iniziò solo molto più tardi, verso il 1100 a.C., quando iniziò a diffondersi l'usanza di preparare per alcune festività un dolce a base di oppio. Verso il XVII secolo in Cina l'uso di oppio esplose quando l'imperatore vietò l'uso del tabacco da fumo, che i cinesi usavano mescolare all'oppio, e si iniziò perciò a fumare oppio puro. Il consumo di oppio aumentò tanto che all'inizio dell'800 i fumatori di oppio in Cina erano circa 10 milioni, e l'oppio veniva importato dall'India tramite la potentissima Compagnia delle Indie inglese, che ne monopolizzava il commercio. Visto questo stato di cose l'imperatore decise di ridurre le importazioni di oppio inglese, e poiché le sue disposizioni rimanevano lettera morta, ordinò nel 1839 di distruggere 20.000 casse d'oppio scaricate dalle navi inglesi a Canton, fatto che scatenò la prima guerra dell'oppio fra Cina e Inghilterra (in seguito alla quale Hong Kong rimase all'Inghilterra), che fu seguita da un'altra nel 1856.

Nel XIX secolo l'oppio conosce in Europa il suo periodo di massima diffusione: molti poeti e scrittori ne facevano uso, fra cui Coleridge, Baudelaire, De Quincey (autore de *Le confessioni di un mangiatore d'oppio*) e altri. Tuttavia il suo uso rimase perlopiù circoscritto agli ambienti letterari e non si diffuse mai veramente, per la concorrenza sul piano dell'uso "ricreativo" del suo principio attivo, la morfina, isolata nei primi anni del secolo da Armand Séquin che la chiamò così in onore di Morfeo, il dio del sonno e dei sogni mentre un anno più tardi, Friedrich Sertürner, mise a punto un metodo economico per isolare e produrre la morfina dall'oppio.

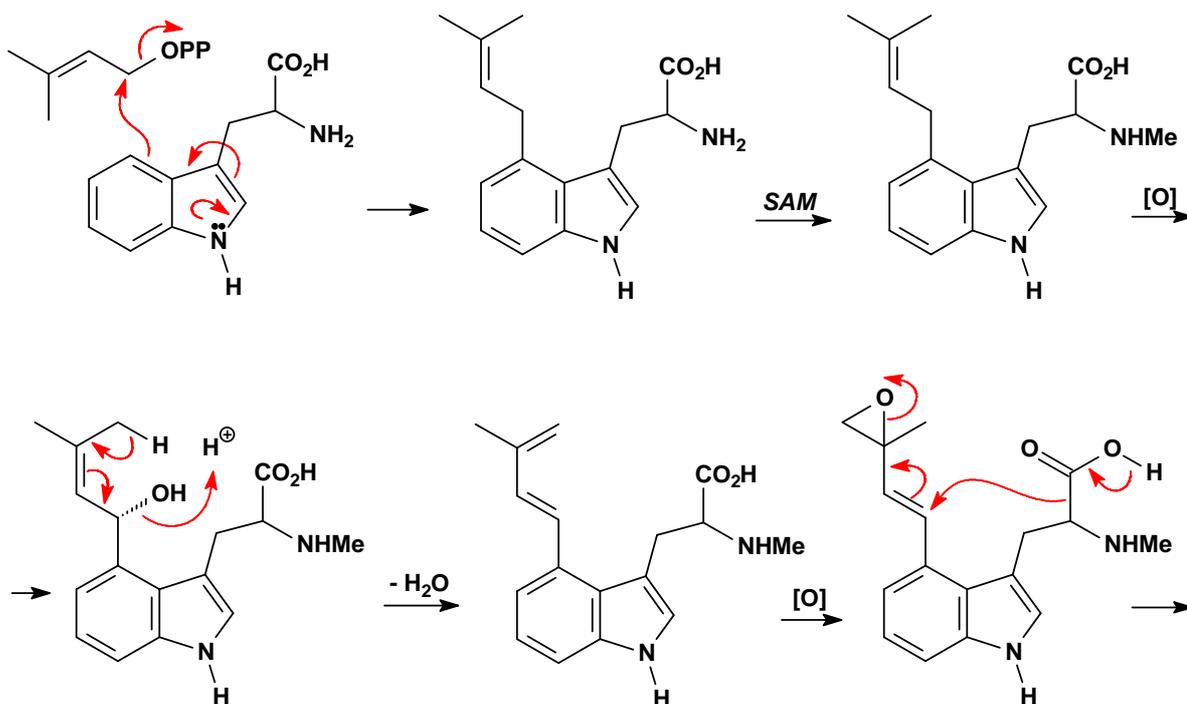
In Cina nel 1906 venne proibito l'uso dell'oppio e nel 1941 il generale Chiang Kai Shek ordinava la distruzione di tutte le coltivazioni, ma nel 1946 i fumatori di oppio in Cina erano ancora 40 milioni. La rivoluzione di Mao Zedong sembra aver sradicato con successo quest'abitudine.

In Iran coltivazione e uso di oppio vennero proibiti nel 1955, ma la legge fu abrogata 14 anni dopo. La rivoluzione Khomeinista nel 1979 proibì l'oppio e tutte le altre droghe, sotto pene severissime, mentre in Turchia il divieto di coltivazione è stato emanato soltanto nel 1971.



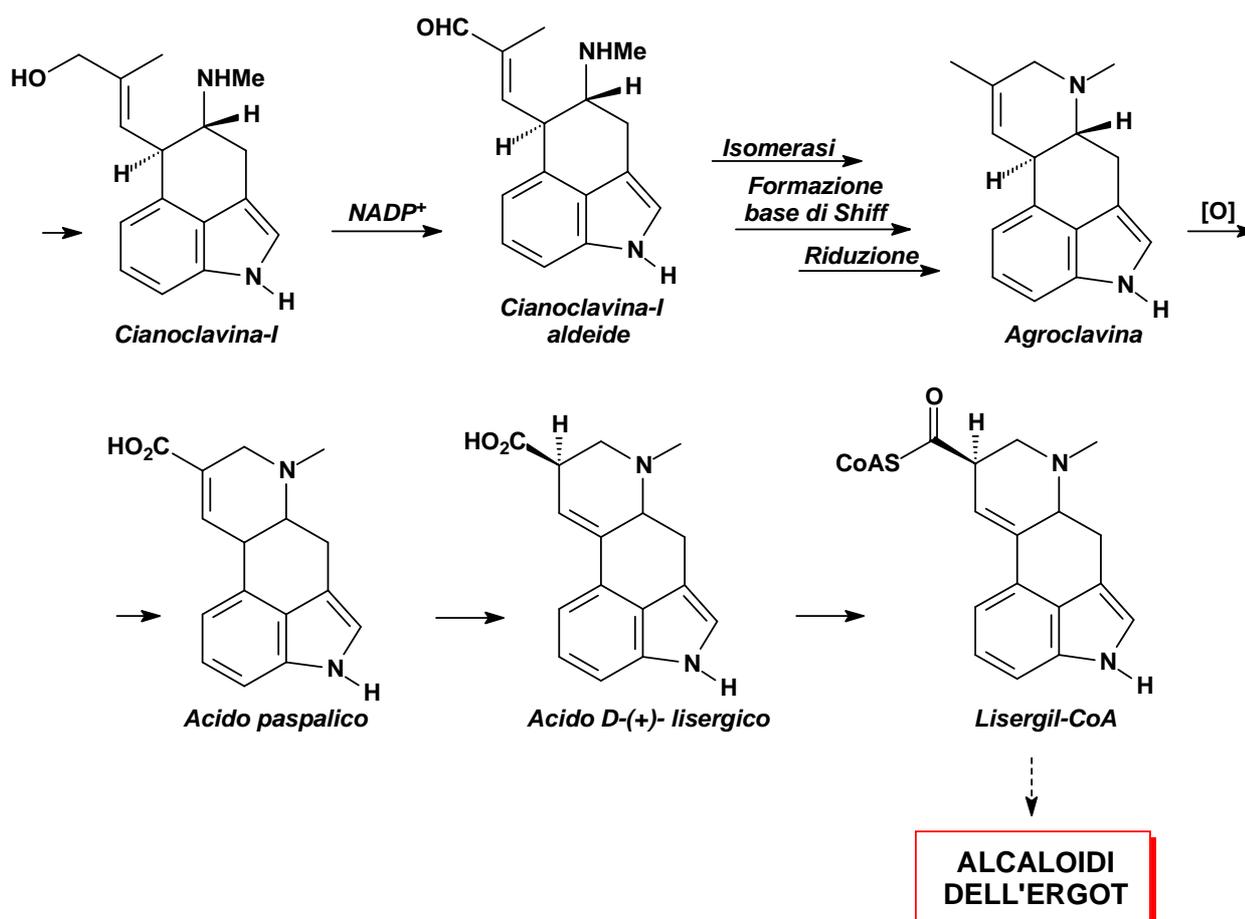
**Indolici.** Fra gli alcaloidi indolici particolarmente importante è l'acido lisergico. Il nucleo dell'acido lisergico è a sua volta presente negli alcaloidi della *Claviceps purpurea* (alcaloidi dell'ergot), quali ad esempio l'ergotamina e l'ergometrina. Il nucleo dell'acido lisergico è presente anche in un famoso derivato semisintetico, l'LSD (Diethylamide dell'acido lisergico), che presenta caratteristiche di potente allucinogeno.

La biosintesi dell'acido lisergico comincia dal triptofano che subisce un alchilazione da parte del dimetilallil-OPP (DMAPP) sul C-4 dell'anello indolico (Schema 9.15). Seguono alcuni passaggi ossidativi che portano all'intermedio epossidico  $\alpha,\beta$ -insaturo, il quale, tramite un processo di ciclizzazione, porta alla **cianoclavina-1**. È interessante osservare come quest'ultimo passaggio coinvolga l'apertura dell'eossido a cui segue lo spostamento del doppio legame e quindi la formazione di nuovo legame carbonio-carbonio tramite un meccanismo di decarbossilazione.



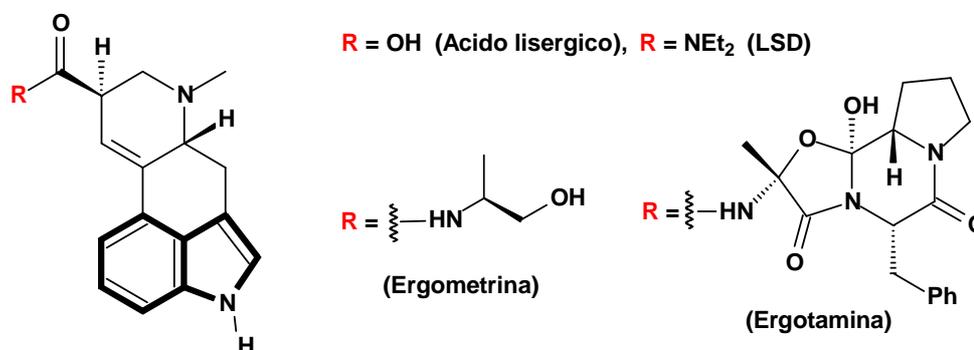
Schema 9.15. Biosintesi dell'acido lisergico.

In seguito, la **cianoclavina-1 aldeide** subisce una isomerizzazione enzimatica del doppio legame da *E* a *Z*, permettendo così la chiusura dell'ultimo anello attraverso la formazione della base di Schiff tra il gruppo aldeidico ed il gruppo aminico metilato, e la cui riduzione porta infine al sistema tetraciclico dell'**agroclavina** (Schema 9.16). I passaggi successivi prevedono una ossidazione ad **acido paspalico** e quindi, dopo isomerizzazione del doppio legame, all'**acido lisergico**.

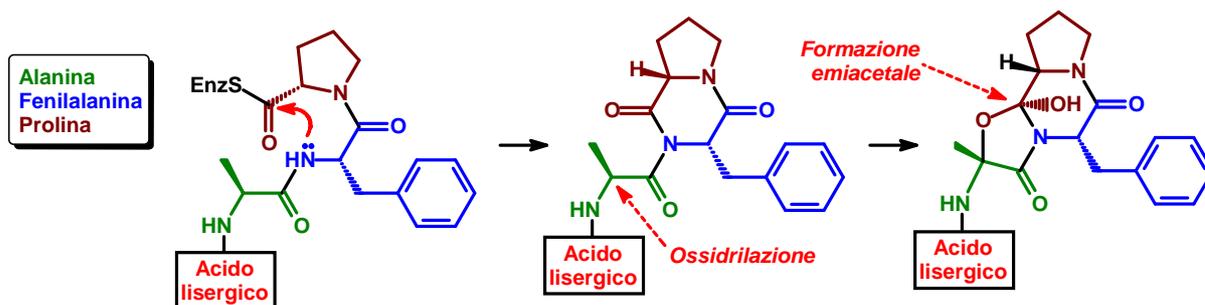


Schema 9.16.

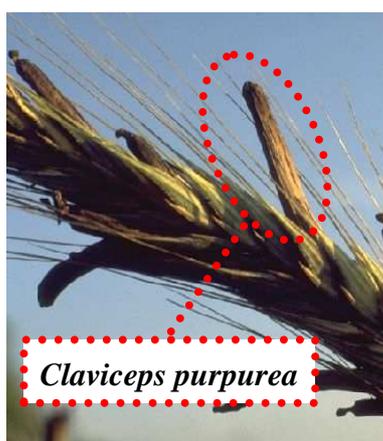
L'acido lisergico, attivato come **lisergil-CoA**, può legare diversi residui tramite un legame di tipo amidico, come riportato negli esempi sottostanti. Da notare che il gruppo **R** dell'ergotamina è un tripeptide che viene ottenuto per addizione sequenziale di L-Ala, L-Phe e L-Pro al **lisergil-CoA** dopo essere stati attivati con **AMP**.



Dopodiché la catena tripeptidica subisce varie trasformazioni che prevedono anche due ciclizzazioni, come riportato nello schema 9.17.



Schema 9.17. Ciclizzazione della catena tripeptidica dell'ergotamina.



*Claviceps purpurea*

L'ergot della segale, traduzione del francese ergot de seigle (nome scientifico: *Secale cornutum*), è conosciuta anche come 'segale cornuta', 'segale puntuta', 'segale speronata', ma l'etimologia della parola francese ergot è incerta. In tedesco pare esistano maggiori varianti che in altre lingue: Mutterkorn, Rockenmutter, Afterkorn, Todtenkorn, Tollkorn ed altre ancora. Tra tutti questi nomi, due, seigle ivre (segale ebba) e Tollkorn (grano pazzo), indicano una certa conoscenza degli effetti psicotropi dell'ergot.

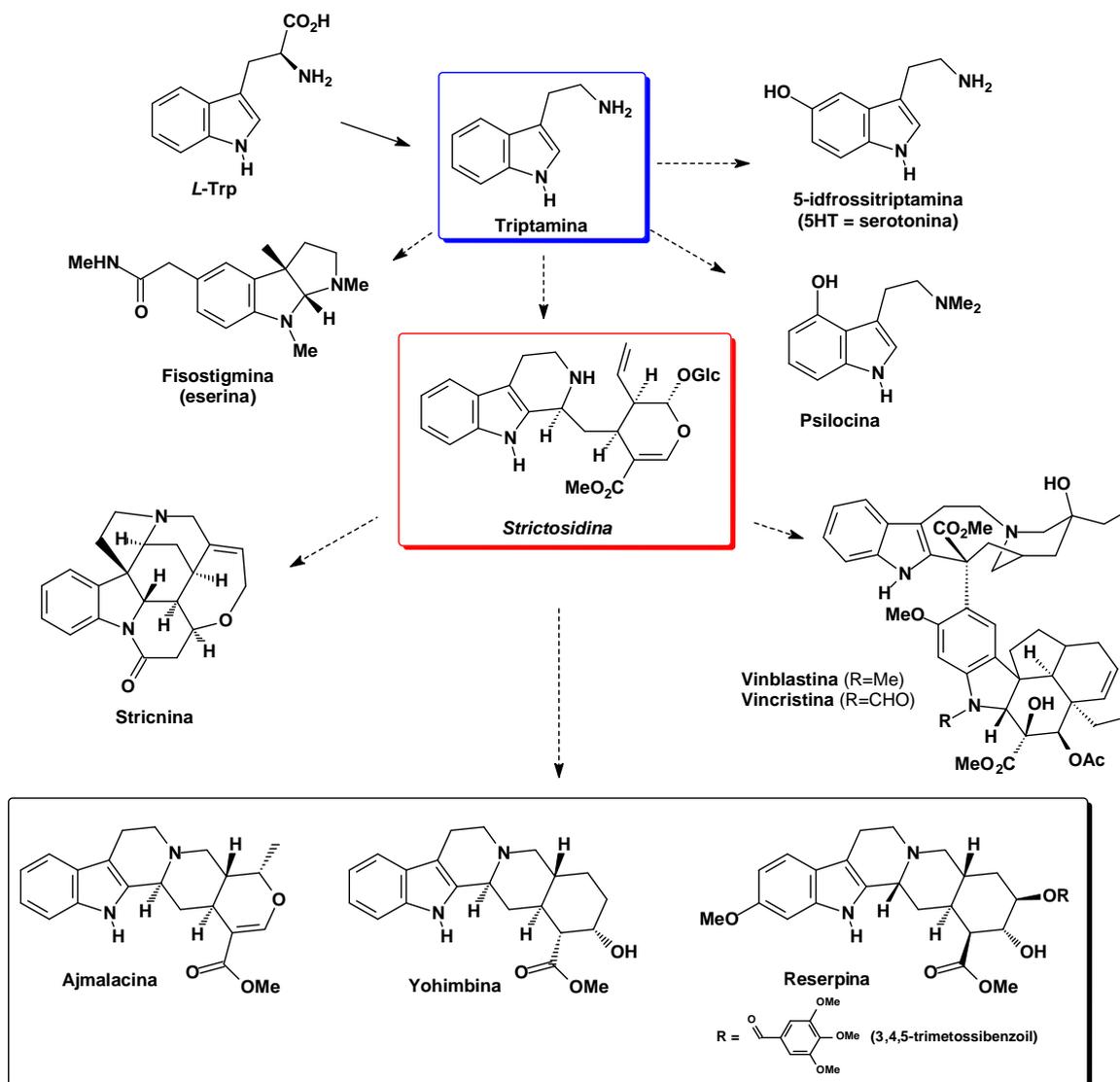
Nell'Europa medievale il pane fatto di segale contaminata con l'ergot provocava insolite epidemie, con conseguenze mortali per migliaia di persone. Questi morbi si presentavano in due forme, Ergotismus convulsivus, caratterizzato da sintomi neuroconvulsivi di natura epilettica, e Ergotismus gangraenosus, come cancrena che colpiva le estremità fino alla loro mummificazione.

Il termine "ergot" si riferisce alle strutture fungine delle specie *Claviceps* che sostituiscono i semi sulle spighe di grano o sugli steli d'erba e che sono visibili come grossi sclerozi. Tali sclerozi contengono classi diverse di alcaloidi, le principali delle quali sono ergometrina, ergotamina, ergosina, ergocristina, ergocriptina ed ergocornina nonché le "-inine" a queste associate. La quantità e il tipo di alcaloidi variano da ceppo a ceppo, a seconda della pianta e della regione geografica. Gli alcaloidi dell'ergot (ergolinici) producono effetti tossici in tutte le specie animali; gli effetti tossici prevalenti possono essere ricondotti all'interazione di questi alcaloidi con i recettori adrenergici, serotoninergici e dopaminergici. Il tipico sintomo clinico è la vasocostrizione, che può progredire in occlusione vascolare e gangrena, oltre che essere causa di aborti. Tra i segni neurotossici si annoverano anoressia e vertigini, ma anche convulsioni.

Un tipico effetto dopaminergico è l'agalattia con insufficiente allattamento dei cuccioli lattanti come suinetti e puledri. Dai dati disponibili si evince che effetti avversi possono essere osservati negli animali ad uso agricolo, soprattutto nei suini che consumano mangimi contaminati con ergot in concentrazioni vicine al limite attualmente in vigore nell'UE. Al momento, il tasso di contaminazione dei mangimi è espresso come percentuale di sclerozi presenti nelle materie prime usate nella fabbricazione del mangime. La determinazione fisica del tasso di contaminazione è spesso poco accurata, dal momento che dimensioni, peso e composizione degli sclerozi possono variare notevolmente. Inoltre, nelle materie prime per mangimi la cernita è impossibile. È stato pertanto suggerito di sostituire i metodi fisici con un'analisi chimica. Attualmente, i dati sulle proprietà tossicologiche dei singoli alcaloidi dell'ergot sono troppo limitati per consentire l'individuazione delle singole tossine marker e quindi monitorare l'entità della contaminazione.

Dal punto di vista terapeutico i singoli alcaloidi vengono utilizzati in alcune terapie come tali o come derivati semisintetici, spesso in associazione con altri farmaci, per migliorarne le attività farmacologiche. Ad esempio l'ergotamina viene utilizzata in preparati contro l'emicrania, mentre l'ergometrina rientra nel gruppo terapeutico dei **ginecologici uterotonici ed emostatici uterini**.

Da notare che esistono molti alcaloidi che includono un sistema eterociclico di tipo indolico (Schema 9.18); quelli più semplici presentano solo un nucleo indolico sostituito (serotonina, psilocina), mentre quelli più complessi, sono costituiti da sistemi policiclici variamente funzionalizzati. Da notare che molti di questi derivano, come già accennato, da un intermedio comune: la **strictosidina** (pag. 97).



| Alcaloide                | Origine  | Caratteristiche   |
|--------------------------|--|---|
| Psilocina                | Psilocibe. (Genere di un gruppo di piccoli funghi ampiamente distribuiti in tutto il mondo). | Allucinogeno  |
| Ajmalicina               | Pausinystalia johimbe (Rubiaceae)  | Antiipertensivo   |
| Yohimbina                | Pausinystalia yohimbe (Rubiaceae)  | Nella medicina tradizionale: afrodisiaco. (presenta attività vasodilatatoria)               |
| Reserpina                | Rauwolfia serpentina (Apocynaceae)   | Antiipertensivo, tranquillante minore.  |
| Vinblastina, vincristina | Catharanthus roseus (Apocynaceae)  | Antitumorale  |
| Stricnina                | Strichnos nux-vomica (Loganiaceae)   | Molto tossica. Agisce sul SNC provocando convulsioni (dose letale per un adulto: 50-100 mg) |

Schema 9.18. Alcaloidi contenenti il nucleo indolico.

## 10. LIPIDI



I lipidi rappresentano una classe molto eterogenea di composti caratterizzati tutti da due fattori:

- *Sono composti insolubili in acqua e solubili in solventi organici non polari.*
- *Derivano tutti dall'AcCoA, anche se attraverso vie biosintetiche molto diverse.*

In genere essi vengono inizialmente classificati in due grandi classi:

1. *Lipidi saponificabili.*
2. *Lipidi non saponificabili.*

Nella prima classe rientrano tutti quei composti che per idrolisi basica vengono scissi in più componenti; in questa classe rientrano gli acidi grassi, i triacilgliceroli, le cere etc.

Nella seconda classe rientrano invece sostanze che non devono avere necessariamente una correlazione strutturale tra di loro, ma che spesso presentano un importante ruolo biologico; fra queste sostanze abbiamo gli steroidi, le vitamine, le prostaglandine.

### *Acidi grassi*

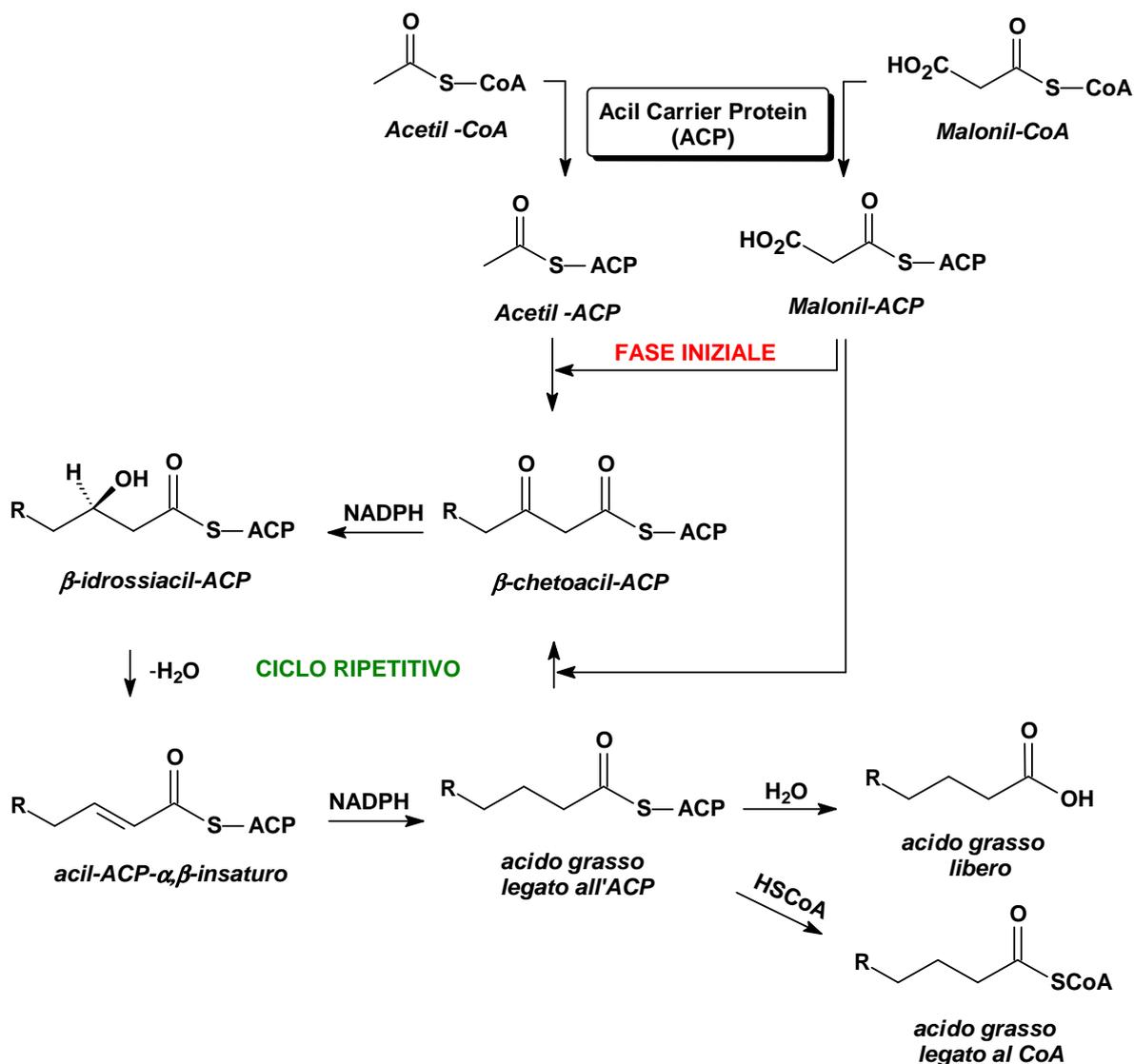
I lipidi saponificabili più semplici sono gli acidi grassi. Questi composti non sono altro che acidi carbossilici a lunga catena carboniosa (più di 12 atomi di carbonio). La catena carboniosa può essere completamente satura, e allora si parla di **acidi grassi saturi**, o presentare doppi legami, e allora si parla di **acidi grassi insaturi**. Gli acidi grassi insaturi possono a loro volta essere distinti in *monoinsaturi*, se è presente un solo doppio legame, e *poliinsaturi* se esistono più doppi legami. Una caratteristica importante degli acidi grassi insaturi è che i doppi legami presenti hanno tutti geometria *cis* e in genere il primo doppio legame è sul C-9. Per convenzione gli acidi grassi vengono individuati da due numeri separati da due punti: **n:n**.

Il primo numero sta ad indicare il numero degli atomi di carbonio che costituiscono l'acido grasso, il secondo il numero dei doppi legami presenti. Così per esempio l'acido laurico è un 12:0, l'acido oleico, che un acido monoinsaturo, è un 18:1.

## Biosintesi degli acidi grassi

La biosintesi degli acidi grassi avviene a partire dall'acetil-CoA con un meccanismo simile a quello della formazione dei polichetidi, dove si è visto che l'allungamento della catena carboniosa viene ottenuta per addizioni successive di malonil-CoA piuttosto che acetil-CoA. Il risultato finale è comunque quello di avere, per ogni ciclo, sempre l'addizione di due unità carboniose, e questo è il motivo per cui gli acidi grassi sono generalmente costituiti da un numero pari di carboni.

Da notare che gli acidi grassi non vengono ottenuti per riduzione di una catena polichetidica preformata, ma attraverso meccanismo ciclico in cui all'addizione di malonil-CoA, che porta alla formazione di  $\beta$ -chetotioesteri, seguono processi riduttivi e di eliminazione, come riportato nello schema 10.1.



Schema 10.1. Ciclo biosintetico di un acido grasso

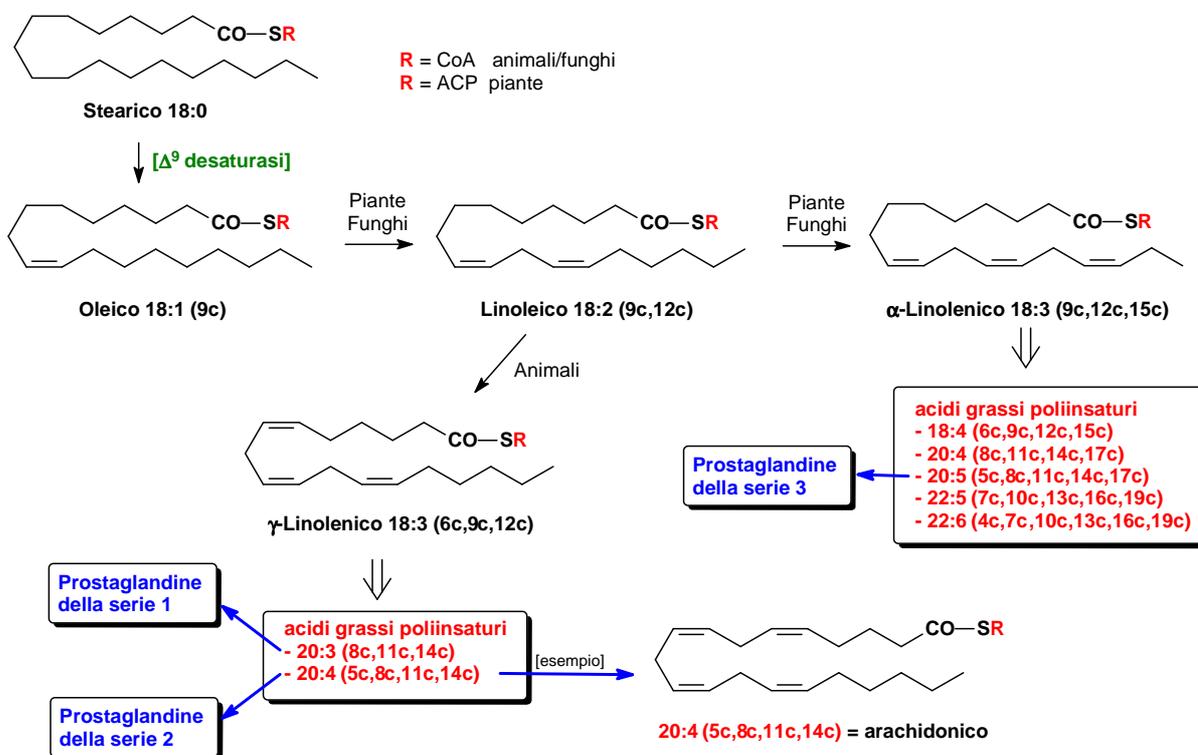
Da notare che nella biosintesi degli acidi grassi il gruppo Coenzima A (CoA) viene sostituito con una proteina trasportatrice specifica chiamata **ACP** (*Acil Carrier Protein*).

Nella fase iniziale si ha sempre la reazione tra **Acetil-ACP** e **malonil-ACP**, che porta alla formazione della prima unità  $\beta$ -chetoacil-ACP, la quale subisce una reazione di riduzione a carico del chetone ad opera del NAPH. Da questa reazione si forma il relativo  **$\beta$ -idrossiacil-ACP** (notare la stereospecificità del processo riduttivo) che in seguito all'eliminazione di una molecola d'acqua, porta alla formazione dell'**acil-ACP- $\alpha,\beta$ -insaturo** con geometria *trans*, il quale viene ridotto dal NADPH ad acido grasso legato all'ACP. Questo può subire un nuovo ciclo di allungamento fino al raggiungimento di una lunghezza stabilita (ad esempio fino ad acido stearico, 18:0).

Una volta raggiunta la lunghezza stabilita l'acido grasso viene liberato dall'ACP oppure convertito nel relativo CoA. L'acido grasso legato al CoA può essere convertito nel corrispondente acido grasso insaturo oppure andare incontro ad una reazione di esterificazione con un alcol a lunga catena (cere) o un polialcol come la glicerina (formazione dei gliceridi: mono-, di- e tri-).

La formazione di un acido grasso insaturo avviene a carico del corrispondente acido grasso saturo ad opera di un enzima desaturasi, come ad esempio la  $\Delta^9$ -desaturasi riportata nello schema 10.2.

I doppi legami presenti negli acidi grassi insaturi sono sempre a geometria *cis*, e nel caso degli acidi grassi poliinsaturi non sono mai di tipo coniugato.

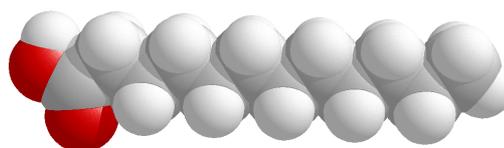
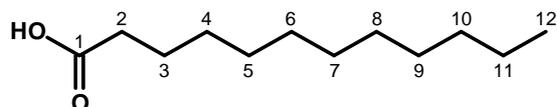


Schema 10.2. Biosintesi degli acidi grassi insaturi.

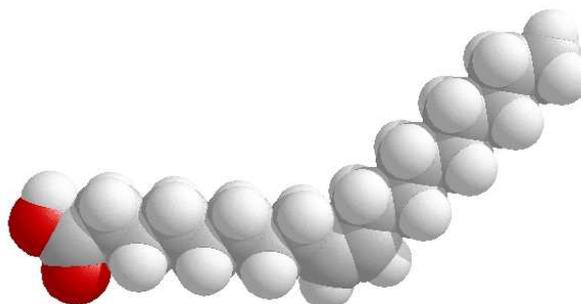
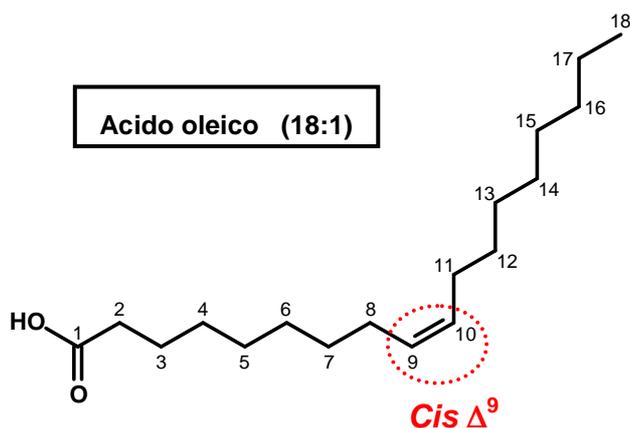
Da notare che alcuni acidi grassi poliinsaturi hanno una grandissima importanza, in quanto sono precursori di molecole importanti fisiologicamente come le prostaglandine (ormoni regolatori).

### Strutture di alcuni acidi grassi

**Acido laurico (12:0)**



**Acido oleico (18:1)**

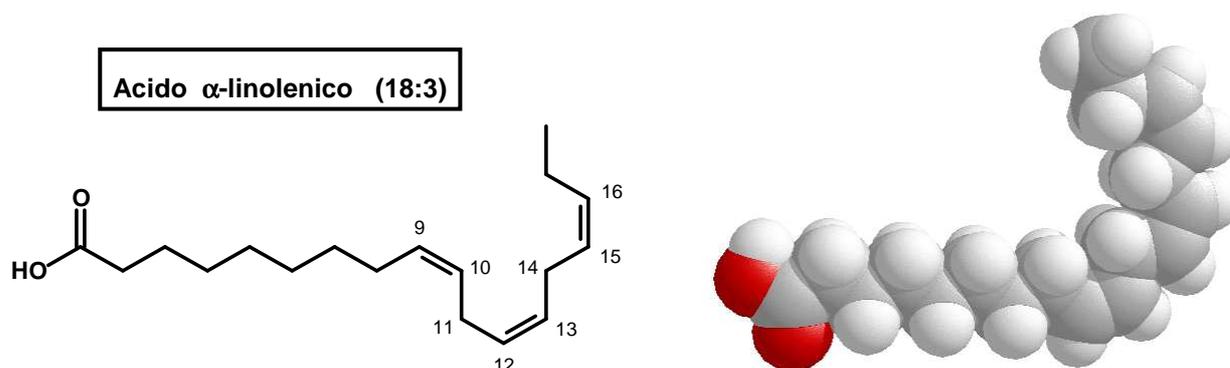


#### ACIDI GRASSI ABBONDANTI IN NATURA

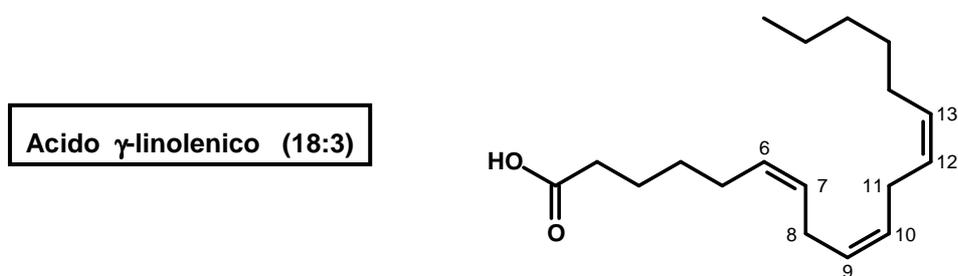
| ACIDI GRASSI SATURI              | ACIDI GRASSI INSATURI              |
|----------------------------------|------------------------------------|
| • <i>Acido laurico</i> (12:0)    | • <i>Acido palmitoleico</i> (16:1) |
| • <i>Acido miristico</i> (14:0)  | • <i>Acido oleico</i> (18:1)       |
| • <i>Acido palmitico</i> (16:0)  | • <i>Acido linoleico</i> (18:2)    |
| • <i>Acido stearico</i> (18:0)   | • <i>Acido linolenico</i> (18:3)   |
| • <i>Acido arachidico</i> (20:0) | • <i>Acido arachidonico</i> (20:4) |

In natura non tutti gli acidi grassi sono ugualmente rappresentati. In genere gli acidi grassi saturi più comuni sono lo stearico (18:0), il palmitico (16:0), mentre tra gli acidi insaturi sicuramente il

più rappresentato è l'acido oleico (18:1). Alcuni acidi grassi sono essenziali per l'organismo umano, ma non sono biosintetizzati dall'uomo che li deve necessariamente introdurre con la dieta. Questi acidi sono gli acidi linoleico e  $\alpha$ -linolenico (appartenente alla classe dei cosiddetti omega 3).



Da notare che esiste anche l'acido  $\gamma$ -linolenico (appartenente alla classe degli omega 6), il quale corrisponde ancora ad un 18:3.



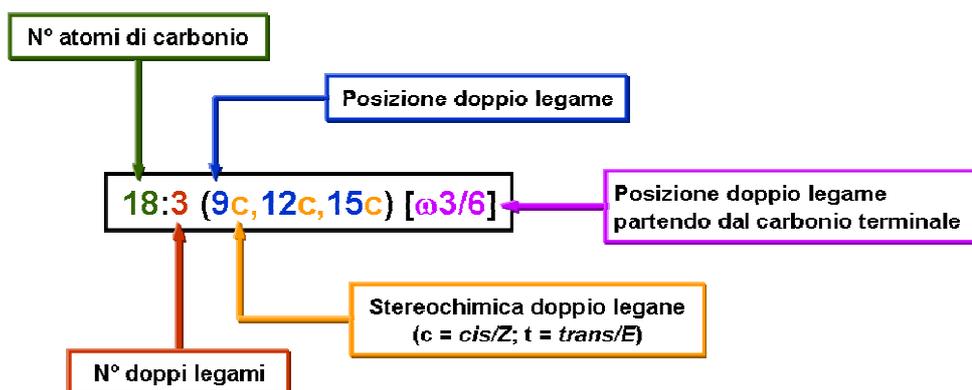
Il fatto che la classificazione “**18:3**” possa essere attribuita a due acidi grassi poliinsaturi diversi, potrebbe generare confusione. Per questo motivo è bene completare tale dicitura con l'identificazione della posizione dei doppi legami, che di conseguenza risulterà:

**Acido  $\alpha$ -linolenico = 18:3 (9c,12c,15c)**

**Acido  $\gamma$ -linolenico = 18:3 (6c,9c,12c)**

Il termine omega-3 e omega-6 ( $\omega$ -3 e  $\omega$ -6) è un metodo alternativo per classificare acidi grassi poliinsaturi, il cui significato risiede nel fatto che si procede all'identificazione della posizione dei doppi legami a partire dal metile terminale e non dal gruppo carbossilico. In questo senso quindi negli  $\omega$ -3 il primo doppio legame si incontra sul terzo carbonio a partire dal metile terminale.

In definitiva la nomenclatura di un acido grasso dovrebbe tenere conto di tutte le variabili come schematizzato nella figura sottostante.



### ***Proprietà fisiche degli acidi grassi***

A parità di atomi di carbonio, gli acidi grassi saturi normalmente hanno un punto di fusione superiore rispetto al punto di fusione degli acidi grassi insaturi, ma nelle analisi gascromatografiche sono più facilmente volatilizzabili e quindi hanno un tempo di ritenzione inferiore. La solidità degli acidi grassi saturi è dovuta al fatto che le molecole sono costituite da lunghe catene carboniose sature che possono facilmente impacchettarsi. Infatti, nonostante la presenza di soli legami  $\sigma$  che consentirebbero un alto grado rotazionale e quindi la possibilità per le catene carboniose di assumere numerose conformazioni, si è visto che tali catene in genere si dispongono in modo lineare, in modo da stabilire legami idrofobici molto intensi. La presenza di doppi legami *cis* negli acidi grassi insaturi, comporta invece la formazione di ripiegamenti ad ansa rigidi che fanno diminuire la capacità di impacchettamento degli acidi grassi stessi e quindi la loro coesione, implicando di conseguenza anche la diminuzione del punto di fusione.

### ***Proprietà chimiche degli acidi grassi***

**Acidità:** gli acidi grassi hanno un  $pK_a$  del tutto simile a quello dei comuni acidi carbossilici: intorno a 5. Questo fa sì che a pH fisiologico sono parzialmente ionizzati. Come già visto per gli amminoacidi il grado di dissociazione nei mezzi biologici può essere stabilito tramite l'equazione di Henderson-Hasselbach. A carico della funzione acida possono essere fatte tutte le reazioni caratteristiche del gruppo acido. Fra queste è importante ricordare le reazioni acido-base e le reazioni di esterificazione. Quest'ultime sono particolarmente importanti quando si devono analizzare miscele di acidi grassi. Infatti in generale si preferisce diminuire la polarità degli acidi grassi in modo che questi possano essere più facilmente separati. Uno dei metodi più comuni è la formazione di esteri metilici che può essere effettuata attraverso l'uso di diazometano oltre che con la comune esterificazione di Fischer con alcool metilico (quest'ultima è una reazione di equilibrio).

**Solubilità:** come abbiamo detto gli acidi grassi non sono solubili in acqua, ma sono solubili in solventi organici. Anche per gli acidi grassi a catena corta, in cui il gruppo carbossilico potrebbe giocare un ruolo importante per aumentare la polarità della molecola, la solubilità è nulla. Il motivo è dovuto alla impossibilità di solvatazione da parte dell'acqua dei gruppi COOH (testa polare), che interagiscono intermolecolarmente per dare degli aggregati bimolecolari, che impediscono la formazione di legami a H con l'acqua (Figura 10.1).

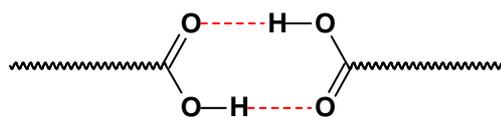


Figura 10.1.

Ben diversa è invece la solubilità dei sali alcalini degli acidi grassi. I sali di sodio e di potassio sono molto solubili in acqua. Questa solubilità non è dovuta però ad un'intima dispersione di molecole di acido grasso in acqua. Infatti, la presenza di catene carboniose molto lunghe (code idrofobe) impedisce la solubilizzazione vera e propria delle molecole. In realtà quando si mette in acqua il sale di un acido grasso si ha la formazione di particolari aggregati molecolari chiamate **micelle** (Figura 10.2). Le micelle sono aggregati sferici in cui diverse molecole di acidi grassi si associano in modo da portare le catene carboniose all'interno e di portare all'esterno i gruppi carbossilici ionizzati che possono formare uno strato di ioni negativi che possono interagire con l'acqua.

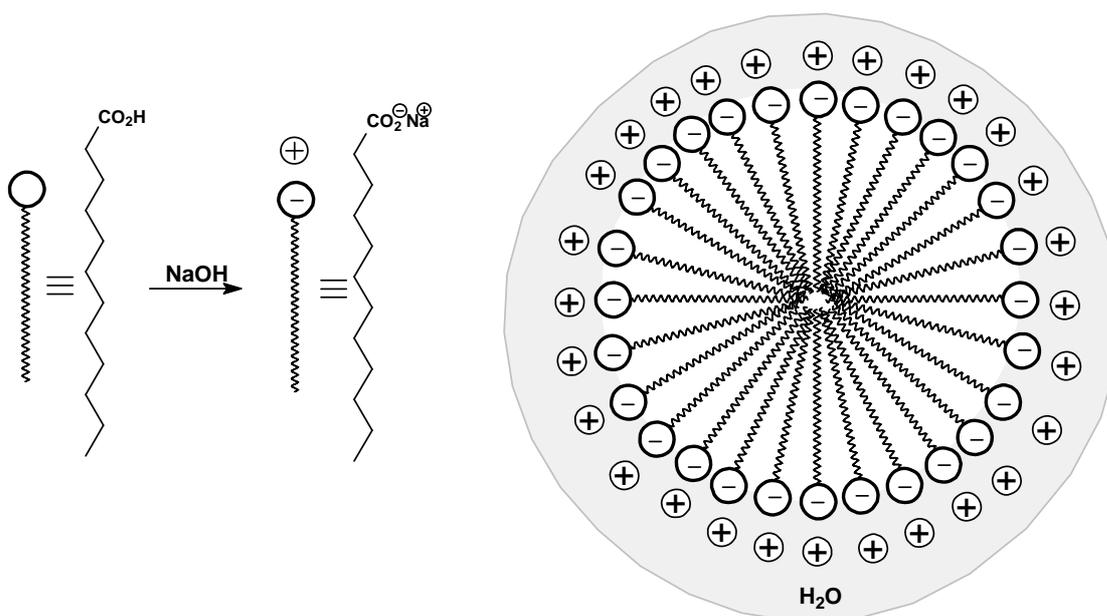
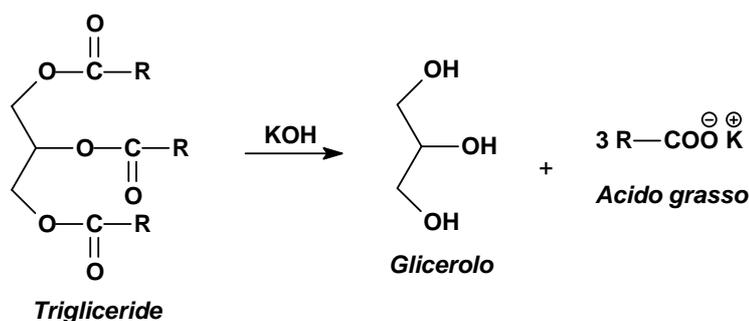


Figura 10.2. Schematizzazione di una micella costituita da sali di acidi grassi in acqua.

La forma sferica delle micelle è l'unica forma che permette il minor rapporto superficie-volume. E' in pratica l'unico modo per aggregare un maggior numero di molecole creando una superficie minima in modo che il sistema disperdente (acqua) non debba subire eccessive modificazioni nelle sue interazioni. Le proprietà **anfipatiche** dei sali degli acidi grassi con metalli alcalini e la capacità

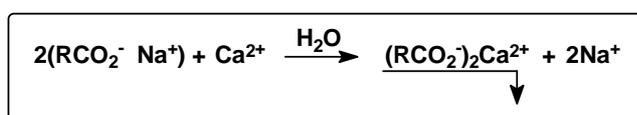
che hanno di formare micelle, sono alla base delle proprietà detergenti dei saponi.

**Saponi:** Cosa sono chimicamente i saponi? I saponi possono essere definiti come i sali con metalli alcalini di acidi carbossilici alifatici a lunga catena, come ad esempio gli acidi grassi. I primi saponi venivano preparati a partire dal grasso animale. Questo grasso è in genere costituito per lo più da triacilgliceroli (trigliceridi). Questi grassi venivano trattati in acqua con la cenere a caldo. La funzione della cenere era quella di una base forte (KOH = potassa). Il nome potassa proviene dall'inglese: pot (potassium) e ash (cenere). Infatti le ceneri sono ricche di idrossido di potassio. La potassa contenuta nella cenere in acqua a caldo determinava l'idrolisi dei triacilgliceroli (trigliceridi) con formazione di glicerolo e dei sali di potassio degli acidi grassi, un processo chiamato comunemente *saponificazione* (Schema 10.3).



*Schema 10.3. Saponificazione di un trigliceride.*

Contrariamente a quanto avviene per i sali degli acidi grassi con metalli alcalini (K<sup>+</sup> e Na<sup>+</sup>), i sali degli acidi grassi con metalli alcalino-terrosi (Mg<sup>2+</sup> e Ca<sup>2+</sup>) risultano poco solubili in acqua e precipitano. L'intorbidamento che si osserva quando vengono usati i saponi comuni con acque molto "dure" (ovvero ricche di bicarbonato di calcio e di magnesio: Ca(HCO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> e Mg(HCO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), è dovuto ad una reazione di scambio tra ioni Na<sup>+</sup> (o K<sup>+</sup>) con lo ione Ca<sup>2+</sup> (o Mg<sup>2+</sup>), che comporta la precipitazione del corrispondente sale degli acidi grassi:

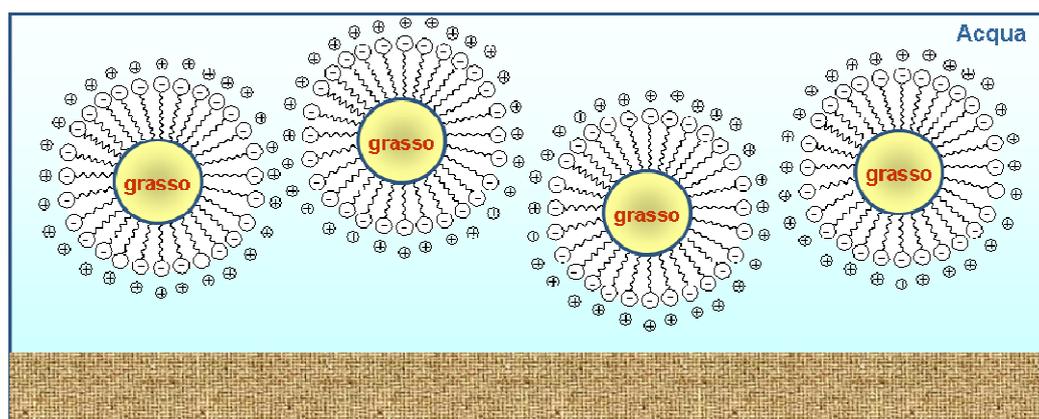


Una conseguenza della presenza dello ione  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$  nei saponi comuni è la forte alcalinità che questi generano dall'idrolisi in acqua, in quanto sono comunque dei sali costituiti da un acido debole e da una base forte.

Oggi, soprattutto per l'igiene personale, sono poco utilizzati a causa delle profonde modificazioni che determinano sul pH dell'epidermide. I saponi comuni, che vengono definiti naturali, sono stati perciò sostituiti dai **saponi sintetici** che presentano molto spesso un sale d'ammonio come controione (saponi a pH neutro). Inoltre, per ovviare alla precipitazione degli acidi grassi come sali di  $\text{Mg}^{2+}$  e di  $\text{Ca}^{2+}$  (cationi normalmente presenti nelle acque dure), sono stati preparati saponi che presentano come testa polare un gruppo solfonico ( $-\text{SO}_3\text{H}$  = acido forte) anziché un gruppo carbossilico. Gli acidi alchil-solfonici ( $\text{R-SO}_3\text{H}$ ) sono acidi forti e formano sali solubili con il  $\text{Mg}^{2+}$  ed il  $\text{Ca}^{2+}$ , risolvendo quindi il problema delle acque dure. Il sapone più famoso di questa classe è il sodio dodecil solfato ( $\text{SDS} = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_3\text{H}$ ).

### *A che cosa è dovuta l'azione detergente dei saponi?*

In genere lo sporco che difficilmente viene via con la sola acqua è costituito da molecole insolubili in essa. Le molecole del sapone, aggiunto alla dispersione in acqua di queste sostanze non idrosolubili, si organizzano in micelle che inglobano al loro interno le sostanze non idrosolubili, generando così una dispersione in acqua (Figura 10.3).



*Figura 10.3. Formazione di micelle che inglobano materiale grasso.*

## Acilgliceroli e fosfolipidi

In natura esistono pochi acidi grassi liberi, mentre nella maggior parte dei casi essi sono presenti sottoforma di esteri del **glicerolo** (1,2,3-propantriolo) e vengono denominati **acilgliceroli**.

Il glicerolo ha tre funzioni alcoliche e quindi può esterificare da uno a tre acidi grassi (Figura 10.4).

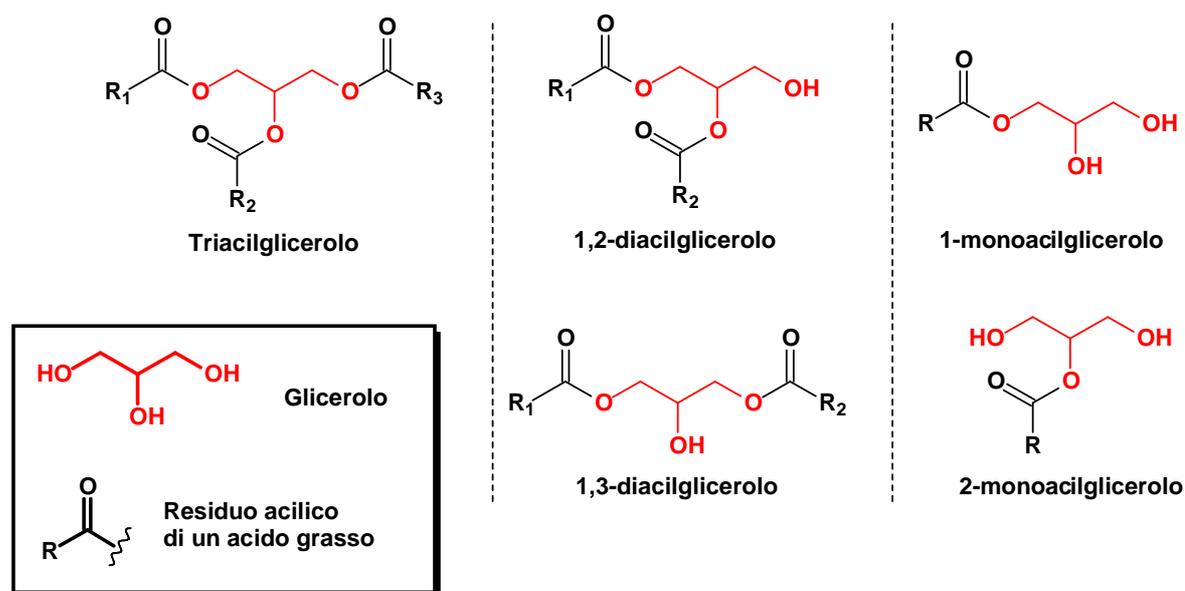


Figura 10.4. Acilgliceroli.

I **triacilgliceroli**, noti come trigliceridi, sono definiti **semplici**, quando tutti e tre i residui di acido grasso sono uguali ( $R_1=R_2=R_3$ ) e **complessi**, quando gli acidi grassi presenti sono tutti diversi tra di loro ( $R_1 \neq R_2 \neq R_3$ ). Tra i triacilgliceroli più comuni troviamo il tristearilglicerolo (tristearina) ed il trioleilglicerolo (trioleina).

Per quanto riguarda i **diacilgliceroli** ed in maggior modo i **monoacilgliceroli**, al di fuori del loro ruolo come intermedi biosintetici, la loro presenza in natura può essere sintomo di una certa degradazione dei grassi o degli oli che li contengono.

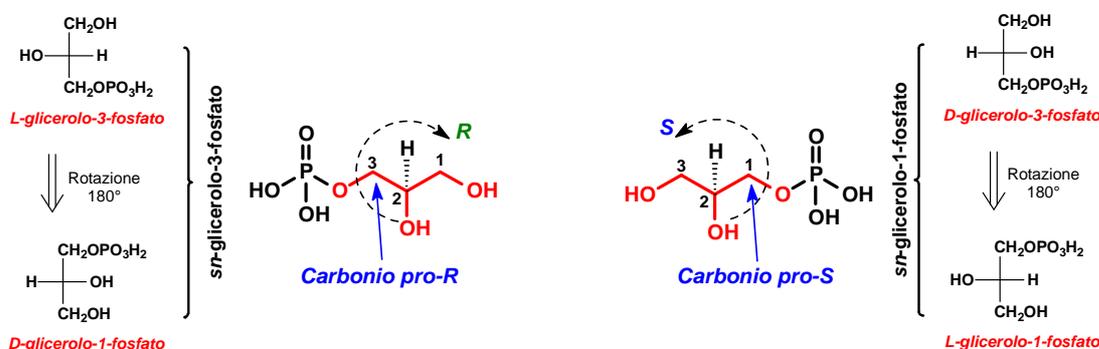
Particolarmente importante è invece la presenza del **residuo di diacilglicerolo**, come componente base, in molecole biologicamente molto importanti, ovvero i **glicerofosfolipidi**.

In queste molecole la funzione alcolica terminale del glicerolo è esterificata con una molecola di acido fosforico, mentre le altre due funzioni alcoliche sono esterificate con acidi grassi. Ne consegue che l'atomo di carbonio in posizione 2 del glicerolo diventa chirale e quindi può generare due forme enantiomere, **R** ed **S**.

Nella gliceraldeide (lo zucchero più semplice) la chiralità del C-2 viene indicata con **D** o **L** in base

all'orientamento che il corrispondente OH assume nelle proiezioni di Fisher (a destra **D**, a sinistra **L**). Benché il glicerolo sia un polialcool, in virtù delle analogie con la gliceraldeide, si potrebbe applicare la stessa convenzione applicata agli zuccheri. In realtà però, per il glicerolo fosfato non è possibile distinguere il C-1 come nella gliceraldeide, dove a tale posizione corrisponde il carbonio maggiormente ossidato (-CHO); ne consegue che il gruppo fosforico, trovandosi su uno dei due carboni **terminali** del glicerolo, potrebbe essere assegnato arbitrariamente sia alla posizione 1 che alla posizione 3. L'adozione, quindi, della terminologia D ed L per il glicerolo fosfato porterebbe all'esistenza di 4 possibili formule secondo le proiezioni di Fischer, ma che corrisponderebbero solo a due strutture reali (figura 10.5).

Per ovviare a questo problema i biochimici hanno adottato lo “*stereospecific numbering*” (*sn*) che si avvale del concetto di configurazione assoluta. Questa convenzione stabilisce che il C terminale che conferisce all'atomo C-2 del glicerolo la chiralità **S** (carbonio pro-S) è definito come il C-1, mentre il C terminale che conferisce all'atomo di C-2 del glicerolo la chiralità **R** (carbonio pro-R) è definito come il C-3. Secondo questa convenzione tutti i fosfogliceridi naturali fanno riferimento all'*sn*-glicerolo-3-fosfato.



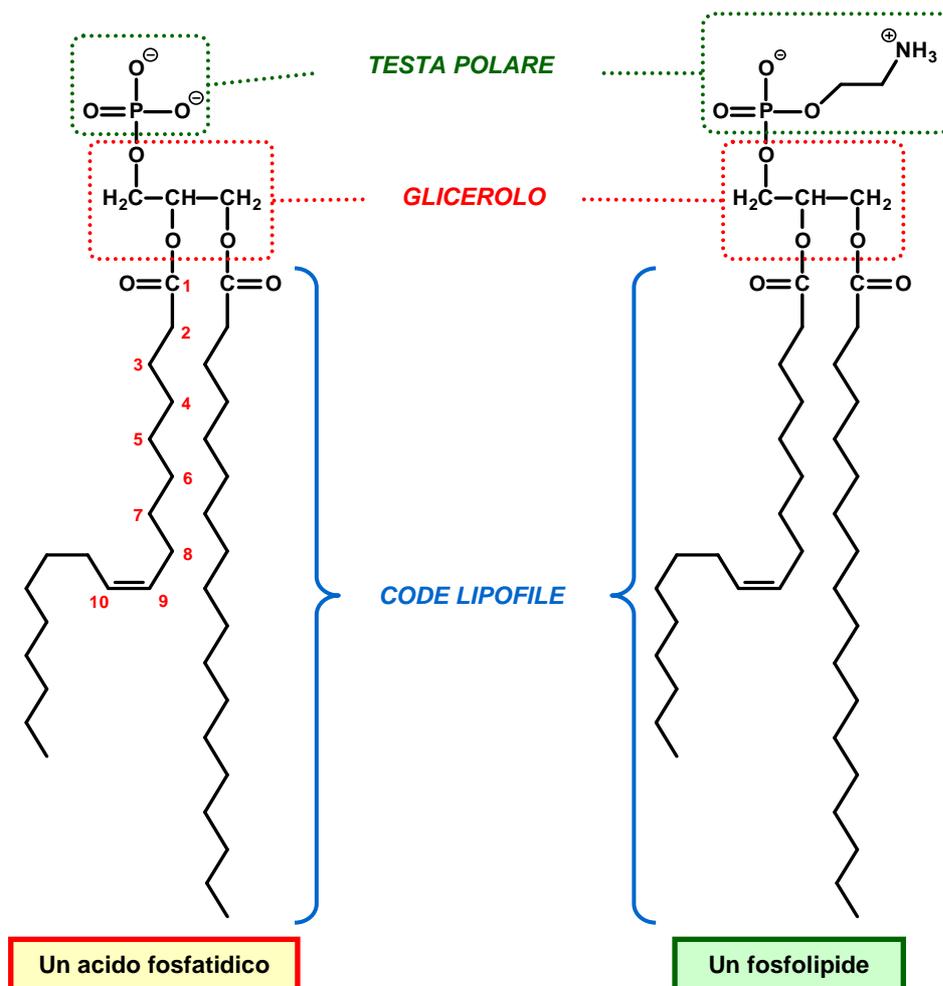
**Figura 10.5.** Glicerolo fosfato e “*stereospecific numbering*”. Notare come per ogni enantiometro potrebbero corrispondere 2 proiezioni di Fischer.

## Glicerofosfolipidi

Quando il glicerolo fosfato viene esterificato con due acidi grassi in C-1 e C-2, si ottiene l'**acido fosfatidico**, che è il precursore dei **glicerofosfolipidi** (fosfogliceridi o glicerofosfatidi) (Figura 10.6). I **glicerofosfolipidi**, insieme agli **sfingolipidi**, fanno parte di una ampia classe di lipidi conosciuta con la denominazione generica di **FOSFOLIPIDI**. Come vedremo più avanti gli

sfingolipidi si distinguono dai glicerofosfolipidi per la presenza di un alcool diverso dal glicerolo: la *sfingosina*.

I *glicerofosfolipidi* si ottengono attraverso la funzionalizzazione dei corrispondenti acidi fosfatidici, a cui vengono aggiunti dei residui polari a livello del gruppo fosforico attraverso un legame estere. In queste molecole il fosfato ed il residuo polare ad esso legato vanno a costituire la testa polare del glicerofosfolipide.



**Figura 10.6.** Esempio di un acido fosfatidico e del corrispondente glicerofosfolipide con l'etanolamina.

Nel gruppo di testa polare possiamo trovare residui di diversa natura (Figura 10.7), come ad esempio la *colina* (trimetiletanolammonio), presente nelle cosiddette *lecitine*, l'*etanolamina*, presente nelle *cefaline*, oppure l'amminoacido *serina*. Altri residui possono essere costituiti da unità aggiuntive di *glicerolo*, come nel *fosfatidil glicerolo*, di *inositolo* (un polialcool ciclico), come nel fosfatidil inositolo, oppure un intero residuo di *fosfatidilglicerolo*, come nella

*cardiolipina*. Nella figura 10.8 vengono riportati i vari tipi di glicerofosfolipidi.

Per quanto riguarda gli acidi grassi presenti nei fosfolipidi in genere si è visto che l'acido grasso presente in C-1 è saturo, mentre quello presente in C-2 è insaturo.



Figura 10.7. Residui polari presenti nei glicerofosfolipidi.

Un'altra classe di fosfolipidi sono i *glicerofosfolipidi eteri* (Figura 10.8) in cui uno degli acidi grassi (quello in C-1) è sostituito da un alcool a lunga catena carboniosa. In questo modo in C-1 anzichè esserci un legame estereo c'è un legame **etero**. In questa classe di sostanze rientrano molecole molto importanti quali ad esempio il *Platelet Activating Factor (PAF* = fattore di attivazione delle piastrine), un potente attivatore fosfolipidico e mediatore di molte funzioni dei leucociti che includono l'aggregazione delle piastrine, l'infiammazione e l'anafilassi. Nel PAF la testa polare è costituita da un fosfato esterificato con trimetiletanolammina, in C-2 c'è un acetato e in C-1 c'è un alcool a 16 atomi di carbonio. Nei *plasmogeni* l'acido che esterifica il C-2 è di nuovo un acido grasso.

| GLICEROFOSFOLIPIDI         |                            | GLICEROFOSFOLIPIDI ETEREI     |                   |                   |
|----------------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------|-------------------|
|                            |                            |                               |                   |                   |
| <b>R<sup>1</sup></b>       | <b>Nome</b>                | <b>Alcool</b>                 | <b>Ac. grasso</b> | <b>Nome</b>       |
| <b>ETANOLAMINA</b>         | <b>CEPALINE</b>            | <b>n = 15 (saturo)</b>        | <b>m = 0</b>      | <b>PAF</b>        |
| <b>COLINA</b>              | <b>LECITINE</b>            | <b>n = 15 (Δ<sup>1</sup>)</b> | <b>m &gt; 12</b>  | <b>PLASMOGENI</b> |
| <b>SERINA</b>              | <b>FOSFATIDILSERINA</b>    |                               |                   |                   |
| <b>GLICEROLO</b>           | <b>FOSFATIDILGLICEROLO</b> |                               |                   |                   |
| <b>INOSITOLO</b>           | <b>FOSFATIDILINOSITOLO</b> |                               |                   |                   |
| <b>FOSFATIDILGLICEROLO</b> | <b>CARDIOLIPINA</b>        |                               |                   |                   |

Figura 10.8. Tabella riassuntiva degli sfingolipidi.

## Sfingolipidi

Come già anticipato gli *sfingolipidi* sono una classe di lipidi che al posto del glicerolo incorporano un particolare amino alcool, la *sfingosina* (1,3-diidrossi-2-ammino-ottadec-4-ene, Figura 10.9), a cui si legano acidi grassi e vari residui polari (Figura 10.10).

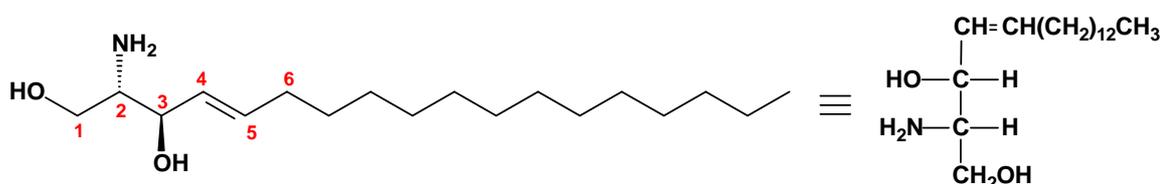


Figura 10.9. La sfingosina è un aminoalcool a lunga catena.

Da notare che negli sfingolipidi il residuo di acido grasso si lega sempre al gruppo aminico tramite legame amidico. Se alla sfingosina è legato solamente l'acido grasso si ottengono le **ceramidi**, mentre se il gruppo alcolico in C-1 lega un residuo fosfato funzionalizzato ad esempio con aminoalcool (o altre molecole) abbiamo le *sfingomieline*. Altri sfingolipidi legano invece dei residui zuccherini tramite legame glicosidico e sono i **cerebrosidi**, i **Sulfatidi** ed i **Gangliosidi** (Figura 10.10).

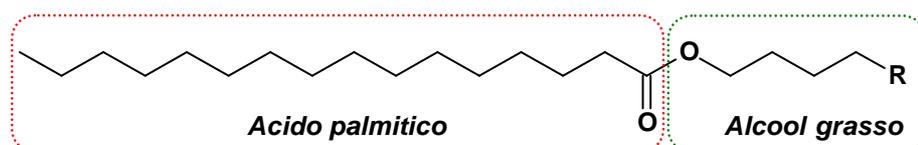
| R            | R <sup>1</sup>  | Nome          |
|--------------|---|---------------|
| ACIDO GRASSO | H   | Ceramide      |
| ACIDO GRASSO | PO <sub>3</sub> R <sup>2</sup><br>(R <sup>2</sup> equivale all'R <sup>1</sup> dei glicerofosfatidi) | Sfingomieline |
| ACIDO GRASSO | Zucchero<br>(tramite legame glicosidico, glucosio e galattosio)                                     | Cerebrosidi   |
| ACIDO GRASSO | Galattosio-3-solfato  | Sulfatidi     |
| ACIDO GRASSO | Residuo con 3 o più zuccheri<br>(uno dei quali è un acido sialico o un amminozucchero)              | Gangliosidi   |

Figura 10.10. Tabella riassuntiva degli sfingolipidi.

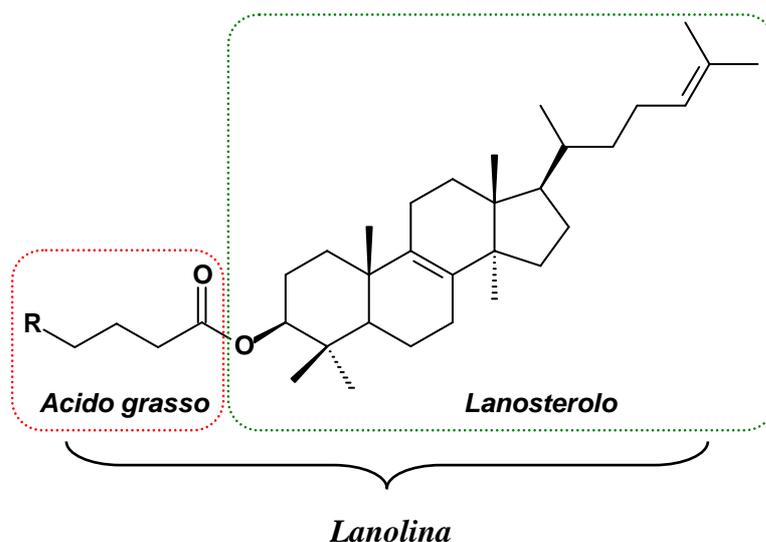
## Le cere

Un'ultima classe di lipidi saponificabili di consistenza solida sono le **cere**, esteri di acidi grassi con alcoli più o meno complessi, che possono essere un alcool a lunga catena carboniosa, oppure un alcool policiclico come il colesterolo.

Ad esempio i principali componenti della cera d'api sono esteri dell'acido palmitico con alcool grassi a lunga catena (variabile da 26 a 34 atomi di carbonio).



La lanolina, o grasso della lana, è una miscela di esteri di acidi grassi con gli steroli lanosterolo e agnosterolo.

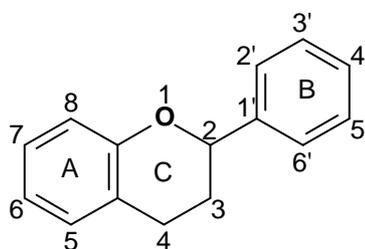


## 11. FLAVONOIDI



### *Definizione e classificazione*

I flavonoidi sono un gruppo di pigmenti contenuti nelle piante a cui la scienza ha riconosciuto un largo spettro di azioni biologiche. Si tratta di strutture di tipo fenolico spesso riconducibili ad uno stesso scheletro carbonioso. La struttura base è infatti costituita da un **nucleo flavanico** contenente 15 atomi di carbonio ( $C_6-C_3-C_6$ ) arrangiati in 3 anelli, indicati con le lettere A, B e C dove il ponte con 3 atomi di carbonio è comunemente ciclizzato con l'ossigeno (Fig. 11.1).



**Figura 11.1.** Nucleo flavanico

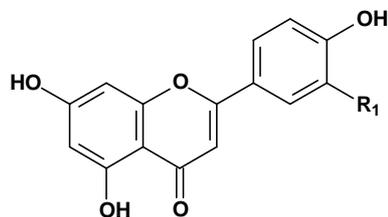
Le varie classi dei flavonoidi differiscono nei livelli di ossidazione e nel pattern di sostituzione dell'anello C, mentre in ogni classe i vari composti differiscono nel numero e nell'arrangiamento dei gruppi fenolici sugli anelli A e B, così come nella natura e nell'estensione della alchilazione e/o glicosidazione di tali gruppi.

Il glucosio è il residuo zuccherino più comune, ma è possibile trovare anche il galattosio, il ramnosio e lo xilosio. Tra le diverse classi di flavonoidi, quelle di maggior interesse sono i flavoni, i flavanoni, i flavonoli, i flavanonoli, i flavan-3-oli, le antocianidine e gli isoflavoni.

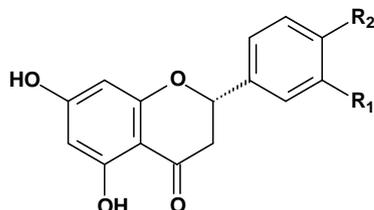
A questi composti si devono in gran parte i colori delle piante, dei fiori e dei frutti, in particolare le sfumature brillanti di blu, rosso scarlatto e arancione.

Oltre ai vari tipi di verdure e frutti (in particolare negli agrumi, nelle mele e nell'uva), i flavonoidi si trovano anche nei semi, nelle noci, nei cereali, nelle spezie, nelle erbe aromatiche (rosmarino, timo e prezzemolo), nei legumi, nelle cipolle ed in varie piante medicinali; inoltre diverse bevande come il **vino** (in particolare il **vino rosso**), il thè nero e verde, contengono quantità apprezzabili di flavonoidi (in minor quantità anche nella birra).

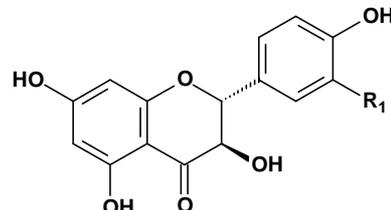
Come già anticipato, le strutture dei vari flavonoidi sono molto simili e riconducibili sempre al nucleo flavanico, come evidenziato nei seguenti schemi dove vengono suddivisi per sottoclassi.



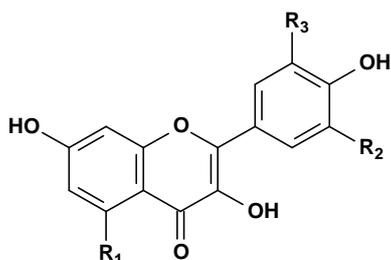
| FLAVONI   | R <sub>1</sub> |
|-----------|----------------|
| Luteina   | OH             |
| Apigenina | H              |



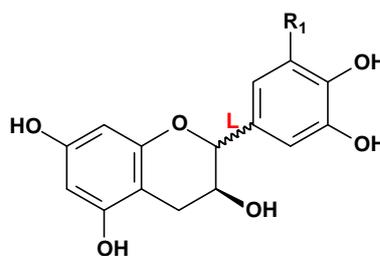
| FLAVANONI   | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub>   |
|-------------|----------------|------------------|
| Esperitina  | OH             | OCH <sub>3</sub> |
| Naringenina | H              | OH               |



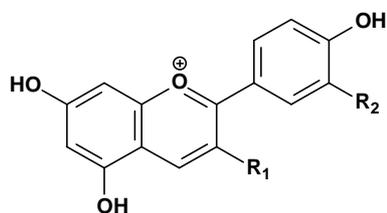
| DIIDROFLAVONOLI<br>(FLAVANONOLI) | R <sub>1</sub> |
|----------------------------------|----------------|
| Diidroquercetina                 | OH             |
| Diidrokaempferolo                | H              |



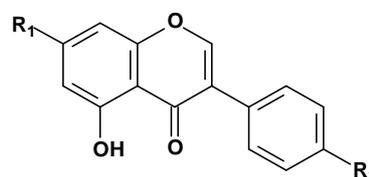
| FLAVONOLI   | R <sub>1</sub> (C5) | R <sub>2</sub> (C3') | R <sub>3</sub> (C5') |
|-------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| Quercetina  | OH                  | OH                   | H                    |
| Kaempferolo | OH                  | H                    | H                    |
| Fisetina    | H                   | OH                   | H                    |
| Miricetina  | OH                  | OH                   | OH                   |



| FLAVAN-3-OLI<br>(CATECHINE) | R <sub>1</sub> (C5') | L |
|-----------------------------|----------------------|---|
| (+)-catechina               | H                    |   |
| (-)-epicatechina            | H                    | ▲ |
| (-)-epigallocatechina       | OH                   | ▲ |



| ANTOCIANIDINE<br>(Sale Flavinio) | R <sub>1</sub> (C3) | R <sub>2</sub> (C3') |
|----------------------------------|---------------------|----------------------|
| Cianidina                        | OH                  | OH                   |
| Cianina                          | OGlc                | OH                   |
| Pelargonidina                    | OH                  | H                    |



| ISOFLAVONI | R <sub>1</sub> (C3) | R <sub>2</sub> (C3') |
|------------|---------------------|----------------------|
| Genisteina | OH                  | OH                   |
| Genistina  | OGlc                | OH                   |
| Crisina    | OH                  | H                    |

Due esempi di flavonoidi sottoforma di glicoside sono la **naringina** e la **neoesperidina** (Figura 11.2); in queste molecole gli agliconi appartengono alla classe dei flavanoni e sono rispettivamente la naringenina e l'esperetina; dal punto di vista biosintetico la naringenina rappresenta un importante nucleo di partenza per gli altri flavonoidi.

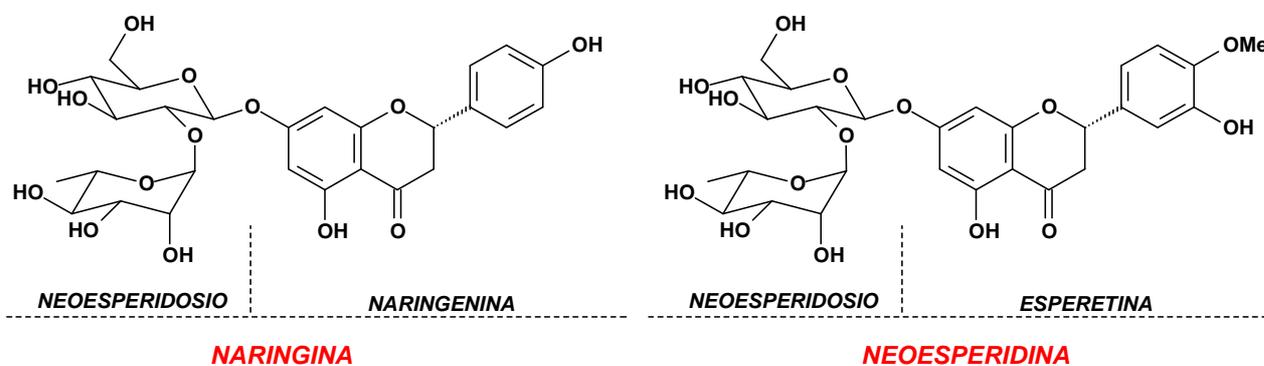


Figura 11.2 [neoesperidosio = ramnosil( $\alpha 1 \rightarrow 2$ )glucosio]

### Importanza dei flavonoidi

I flavonoidi sono importanti componenti nella dieta umana e, sebbene essi siano considerati dei non-nutrienti, la quantità giornaliera assunta è piuttosto elevata (50-800 mg) e dipende dal consumo di vegetali e frutta e di specifiche bevande come vino, thè e birra.

Per questo motivo, recentemente, la **rutina** (quercetina + rutinosio) ricavato dal grano saraceno e dalla ruta, e l'**esperidina** (esperetina + rutinosio), ricavato dalla buccia di *Citrus*, sono stati inclusi in coadiuvanti dietetici come vitamina P, ed indicati per il trattamento della fragilità capillare.

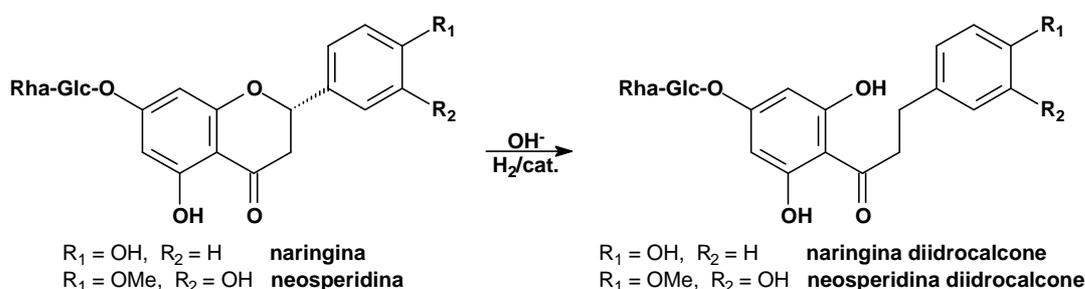
Di seguito vengono riportate alcune importanti proprietà dei flavonoidi:

- ❖ **capacità di impartire colorazioni:** i *flavonoli* ed i *calconi* danno colorazioni gialle, le *antocianidine* danno colorazioni rosso, blu e violetto. Anche le sostanze incolori come i *flavoni*, assorbendo fortemente la luce UV, sono percepibili dagli insetti e possono agire come segnali visivi per gli insetti impollinanti;
- ❖ **proprietà astringente:** le *catechine* formano degli oligomeri (piccoli polimeri) detti *tannini condensati* che contribuiscono al gusto astringente di alcuni cibi e bevande (queste sostanze hanno anche importanza commerciale nella concia delle pelli), inoltre insieme ad altri *flavonoidi* rappresentano un sistema difensivo contro insetti nocivi;
- ❖ funzione di **catalizzatori** nella fotosintesi e/o come regolatori dei canali del ferro attraverso la

fosforilazione di proteine;

- ❖ **azioni antiossidanti** nelle cellule vegetali attraverso sistemi di trasporto di elettroni. E' stato dimostrato che i flavonoidi del vino rosso (**quercetina**, **kaempferolo** e antocinidine) e del tè (**catechine** e suoi esteri con l'acido gallico) si sono dimostrati efficaci antiossidanti contro i radicali liberi.

Una particolarità della **neoesperidina** (ricavata dall'arancia amara) e della **naringina** (ricavata dalla buccia di pompelmo) è che sono sostanze estremamente amare; queste sostanze però, dopo essere state convertite in **diidrocalconi** (per idrogenazione in ambiente alcalino, schema 11.1), acquisiscono un sapore estremamente dolce (300-1000 volte più dolci dello zucchero). Questi ed altri diidrocalconi sono stati studiati come agenti dolcificanti non zuccherini.



*Schema 11.1. Sintesi di diidrocalconi.*

Molti studi sono stati effettuati riguardo alle proprietà farmacologiche, biologiche e medicinali dei flavonoidi, che hanno dimostrato molteplici e diverse attività come quella:

- ❖ **vasodilatatoria** (migliorano l'elasticità dei vasi sanguigni);
- ❖ **antibatterica e antivirale** (contro HIV, Herpes simplex, virus dell'influenza, Rhinovirus ecc.);
- ❖ **antiinfiammatoria e anti allergica** (attraverso l'inibizione della lipossigenasi);
- ❖ **immunostimolante**;
- ❖ **anticarcinogenica e antitumorale** (prevenendo certi tipi di tumore);
- ❖ **inibitoria di numerosi enzimi** come la ciclossigenasi, la fosfolipasi A<sub>2</sub> e la lipossigenasi.

Un interesse particolare è stato dimostrato verso l'**attività antiossidante** svolta dai flavonoidi, ovvero alla loro abilità di ridurre la formazione e/o di eliminare i radicali liberi.

Esempi di radicali liberi sono le specie reattive dell'ossigeno come l'anione superossido ( $O_2^{\cdot-}$ ), i radicali perossido ( $ROO\cdot$ ), alcossido ( $RO\cdot$ ) ed ossidrilico ( $HO\cdot$ ), e l'ossido nitrico (NO).

Le specie reattive dell'ossigeno possono provocare notevoli danni attaccando i lipidi delle membrane cellulari, le proteine dei tessuti e gli enzimi, i carboidrati e il DNA inducendo processi ossidativi i quali causano danni alle membrane biologiche, modificazioni nell'attività enzimatica e danni ancor più gravi al DNA.

Fortunatamente esistono delle barriere contro il danno ossidativo: sono i sistemi *scavenger* (lett. spazzino) che consistono in una serie di enzimi atti all'arresto della cascata di reazioni dei radicali:

- la **superossido dismutasi**, che converte il superossido in perossido di idrogeno;
- la **catalasi**, che demolisce l'acqua ossigenata in acqua ed ossigeno molecolare;
- la **glutazione perossidasi**, che spazza via i perossidi a spese del glutazione.

Malattie attribuite ai radicali liberi sono: il cancro, l'infarto, l'arteriosclerosi, l'ipertensione, l'ictus, la demenza di alzheimer, il morbo di parkinson, la cataratta, la retinite pigmentosa, l'artrite e l'invecchiamento.

Gli ambiti cellulari in cui l'ossigeno è molto attivo sono i mitocondri, il reticolo endoplasmatico e le membrane. Nel corso dei normali processi metabolici si formano radicali liberi che danneggiano i mitocondri e le membrane cellulari, queste ultime sono rinnovate ogni 5-6 giorni; nel cancro e nell'ischemia il danno ossidativo è talmente elevato, che i processi riparativi diventano insufficienti, le membrane si danneggiano in modo irreversibile; sodio e calcio, penetrando nell'interno, provocano la morte della cellula; invecchiando, la velocità di riparazione dei mitocondri e delle membrane diminuisce e ne risulta un progressivo deterioramento delle loro funzioni.

Numerose condizioni aumentano lo stress ossidativo: l'ipercolesterolemia, il diabete, il fumo, le radiazioni, intossicazioni di vario genere, l'esercizio fisico esagerato. In conigli in cui è stata indotta l'ipercolesterolemia con una dieta ricca di grassi è stato riscontrato che la formazione dell'anione superossido aumenta di 3 volte; nel diabete si osserva una autossidazione del glucosio e l'aumento delle proteine glicosilate (ovvero coniugate con gli zuccheri), che provocano un aumento dei radicali liberi e soprattutto dell'anione superossido. Normalmente la glicosilazione delle proteine è ostacolata dalle vitamine C ed E.

Quando i fattori di difesa sono sopraffatti dai radicali liberi, questi ultimi aggrediscono il DNA, i cromosomi, i mitocondri, le membrane, le proteine e i grassi. I grassi polinsaturi e i fosfolipidi sono particolarmente vulnerabili allo stress ossidativo, che provoca ad esempio conversione della fosfatidilcolina in lisofosfatidilcolina (quest'ultima è il principale componente dei mitocondri del cuore con il 39%) ed ossida la apoproteina B 100 delle LDL, rendendola irriconoscibile ai recettori. Le lipoproteine LDL ossidate provocano vasocostrizione, aumento della adesività dei globuli bianchi, aumento della aggregazione piastrinica: è questa la fase iniziale dell'**arteriosclerosi**.

In numerosi studi si è accertato che la mortalità per infarto è inversamente proporzionale all'assunzione di flavonoidi e dopo svariate analisi si è accertato che i grassi saturi e il fumo sono all'origine dell'infarto mentre gli antiradicali liberi ne contrastano l'insorgenza. Si ritiene che se il blocco dei danni provocati dai radicali liberi fosse maggiormente applicato e più conosciuto, si avrebbe un calo della spesa sanitaria negli USA del 33 per cento.

In ambito farmaceutico i flavonoidi più conosciuti ed utilizzati sono ad esempio la rutina, la diosmina e l'esperidina, presenti negli agrumi ed in piante del genere Citrus, gli antociani del Mirtillo, ed altri. Questi rappresentano una componente importante anche di molti estratti fitoterapici quali il Carciofo, la Passiflora, il Timo, la Camomilla, l'Achillea, l'Equiseto, il Sambuco, il Tiglio, e numerosissime altre piante officinali. Inoltre li possiamo ritrovare anche in piante utilizzate comunemente nell'alimentazione, in bevande salutistiche (es.: spremuta d'arancia), in integratori ed anche in specialità medicinali.

## Attività antiossidante dei flavonoidi

I meccanismi che sono alla base dell'attività antiossidante includono:

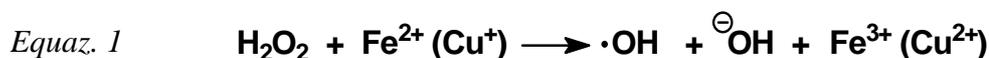
- ❖ *soppressione delle specie reattive dell'ossigeno formate*, attraverso l'inibizione di enzimi o la chelazione di elementi coinvolti nella produzione di radicali liberi;
- ❖ *eliminazione delle specie reattive dell'ossigeno*;
- ❖ *“up-regulation” o protezione delle difese antiossidanti del corpo umano*.

In particolare, per quanto riguarda i meccanismi di soppressione ed eliminazione dei radicali liberi, si possono verificare i seguenti meccanismi:

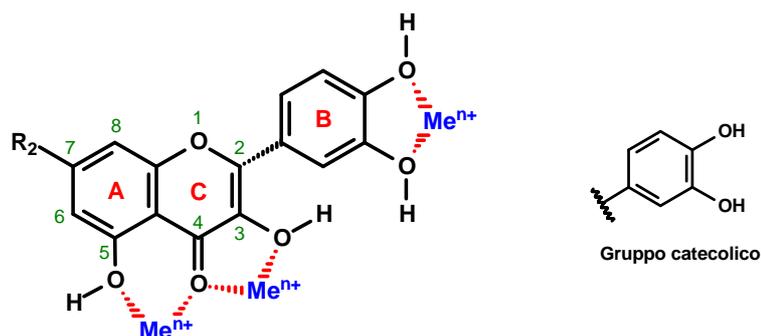
- ◆ *inibizione degli enzimi responsabili della produzione dell'anione superossido*, come la xantina ossidasi e la proteina chinasi C.
- ◆ *influenza sull'attività di numerosi enzimi coinvolti nella generazione di speci reattive dell'ossigeno* come la ciclossigenasi, la lipossigenasi, la monossigenasi microsomiale, la glutatione S-tranferasi, NADH ossidasi.

La capacità dei flavonoidi di agire come antiossidanti in vitro è stata oggetto di molti studi in passato ed è stata evidenziata un'importante relazione attività-struttura analizzando le varie classi di composti.

Alcuni flavonoidi riescono a chelare efficacemente i metalli coinvolti nel metabolismo dell'ossigeno, come ad esempio il ferro e il rame, che riducono il perossido di idrogeno generando il radicale ossidrilico ( $\text{HO}\cdot$ ), una specie molto reattiva (*Equaz. 1*), ed ossidano le LDL (lipoproteine a bassa densità) (*Equaz. 2*).



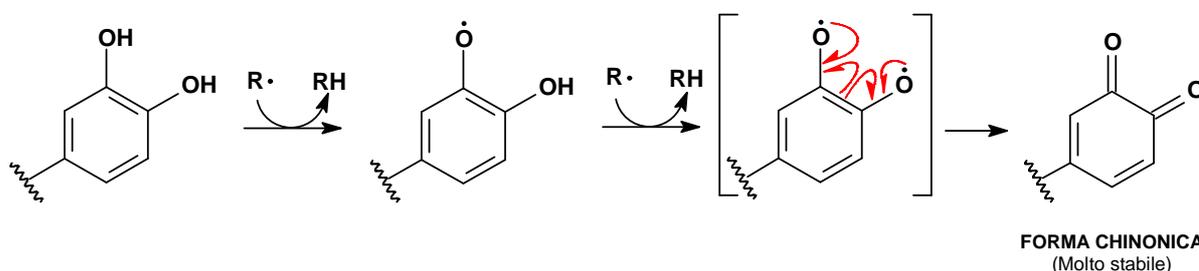
I gruppi funzionali dei flavonoidi che possono chelare questi metalli sono il gruppo *catecolico*, l'ossidrilico in C-3 e la funzione chetonica in C-4 dell'anello eterociclico, la funzione chetonica in C-4 e l'ossidrilico in C-5 dell'anello A (Figura 11.3).



**Figura 11.3.** Chelazione di un metallo da parte di un flavonoide ( $R = OH$ , quercetina).

I Flavonoidi hanno un valore di potenziale redox basso (0,23V-0,75V) e sono termodinamicamente capaci di ridurre i radicali liberi con potenziali redox nel range di 2,13-1,0 V. Oltre al potenziale redox, un ruolo importante è svolto anche dal tipo di struttura dei flavonoidi.

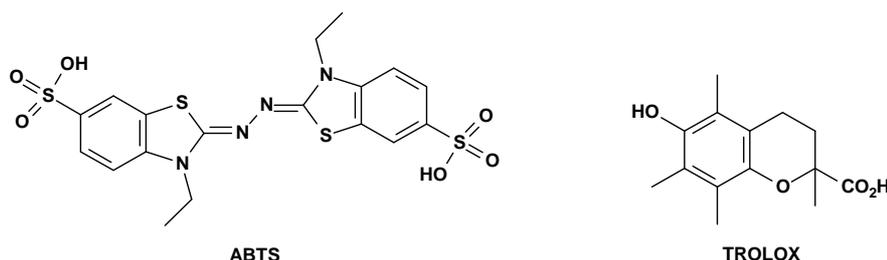
Un esempio di come chimicamente avviene la neutralizzazione dei radicali liberi è riportato nella schema 11.2, e coinvolge il gruppo catecolico. Questo gruppo è in grado di formare delle specie radicaliche molto stabili, per effetto soprattutto della delocalizzazione dell'elettrone spaiato sull'anello aromatico ad opera della risonanza. Il gruppo catecolico reagisce con un primo radicale libero ( $R\cdot$ ) neutralizzandolo tramite la cessione di un "H." da parte del gruppo fenolico; in virtù della presenza di una seconda funzione fenolica, il radicale catecolico può neutralizzare un secondo radicale libero, portando alla formazione di una struttura chinonica molto stabile, attraverso la scissione omolitica di un legame  $\pi$  e la condivisione di questi elettroni con quelli spaiati degli ossigeni.



**Schema 11.2.** Neutralizzazione di due radicali liberi da parte del gruppo catecolico.

Molti studi sono stati fatti per stabilire la relazione esistente tra attività antiossidante (**radical-scavenging**) e la struttura dei diversi flavonoidi. Per questo motivo è stata sviluppata una procedura che ha permesso la costruzione di una scala di abilità radical-scavenging dei flavonoidi e relativi acidi fenolici. Il

saggio è basato sulla capacità di un antiossidante di eliminare a pH 7.4 un radicale catione preformato dall'acido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico) (ABTS), abilità che viene messa a confronto con l'acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbossilico noto con il termine **TROLOX**, un analogo della vitamina E solubile in acqua.



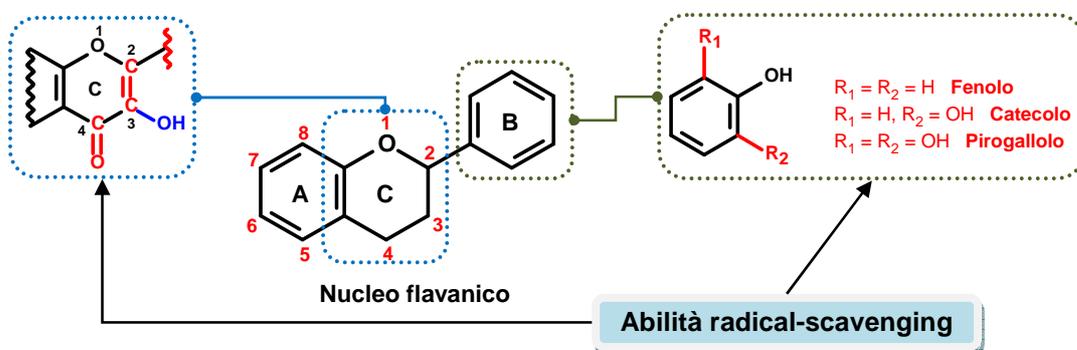
Il **TEAC**, ovvero la "**capacità antiossidante TROLOX equivalente**" è definita come la concentrazione di TROLOX avente la stessa capacità radical-scavenging di un antiossidante sotto studio in concentrazione 1mM.

I dati ottenuti provano chiaramente che l'abilità radical-scavenging dipende dalla struttura e dai sostituenti dell'anello eterociclico e dell'anello B.

Dal punto di vista strutturale è stato dimostrato che l'attività antiossidante dei flavonoidi è influenzata dal tipo di gruppi funzionali che possiedono. Ad esempio si avrà un contributo maggiore quando l'anello B è costituito da un catecolo, in quanto risulta essere un migliore gruppo elettron-donatore rispetto ad un semplice fenolo (Figura 11.4).

Inoltre è necessario un doppio legame in posizione  $\Delta^{2,3}$  coniugato con un gruppo "oxo" in C-4, il quale è responsabile della delocalizzazione degli elettroni.

La presenza di un gruppo OH sul C-3 nell'anello eterociclico incrementa l'abilità radical-scavenging, mentre un gruppo addizionale OH e/o Metossilico in posizione 5 e 7 degli anelli A e C sembra essere meno importante.



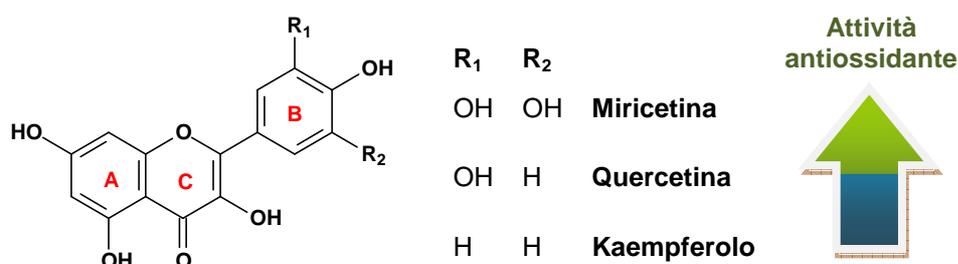
**Figura 11.4.** Gruppi funzionali essenziali ai fini dell'attività antiossidante.

Sulla base di queste considerazioni ne consegue che i flavonoli e i flavoni che presentano un catecolo, come anello B, sono i più attivi ed in particolare i flavonoli sono più potenti dei corrispondenti flavoni per la presenza del gruppo OH in posizione 3.

Ad esempio la quercetina (un flavonolo) presenta un'attività antiossidante maggiore rispetto alla luteina (un flavone), fatto confermato anche dal maggiore valore di TEAC della quercetina.

Per quanto riguarda l'OH in posizione 3, la sua glicosilazione, come nella rutina (quercetina + rutinosio) riduce di molto l'attività radical-scavenging.

La presenza di un ulteriore gruppo OH nell'anello B (gruppo pirogallico), come nella miricetina, incrementa l'attività radical-scavenging rispetto ad analoghi flavonoidi. Al contrario la presenza di un solo gruppo OH nell'anello B (gruppo fenolico), come nel Kaempferolo, diminuisce l'attività antiossidante (Figura 11.5).



**Figura 11.5.** Variazione dell'attività antiossidante in funzione del tipo di anello B.

## ***Biosintesi dei flavonoidi***

La provenienza dei flavonoidi è da attribuirsi ad un duplice meccanismo biosintetico, che coinvolge la via dei polichetidi, per la sintesi degli anelli A e C, e la via dell'acido scichimico (scritto anche shikimico) per quanto riguarda la sintesi dell'anello B (Figura 11.6).

Quest'ultimo è in realtà il primo passaggio della biosintesi è porta ad intermedi riconducibili all'acido caffeico e cinnamico. Successivamente questi substrati subiscono un allungamento della catena laterale ad opera dell'acetilcoenzima A, che in seguito a due successive ciclizzazioni, andrà a costituire gli anelli A e C.

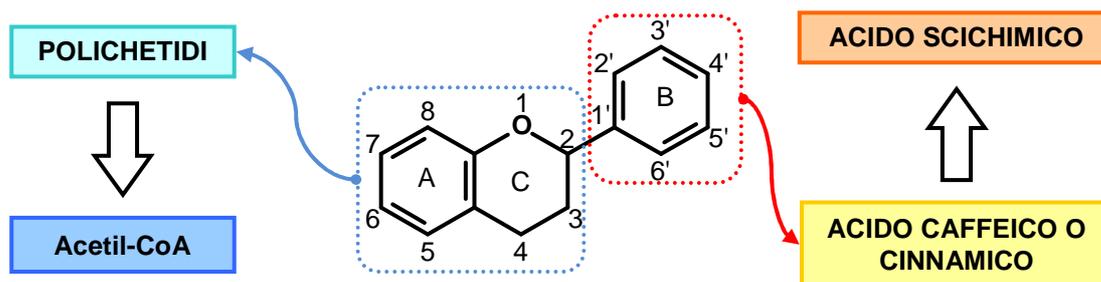
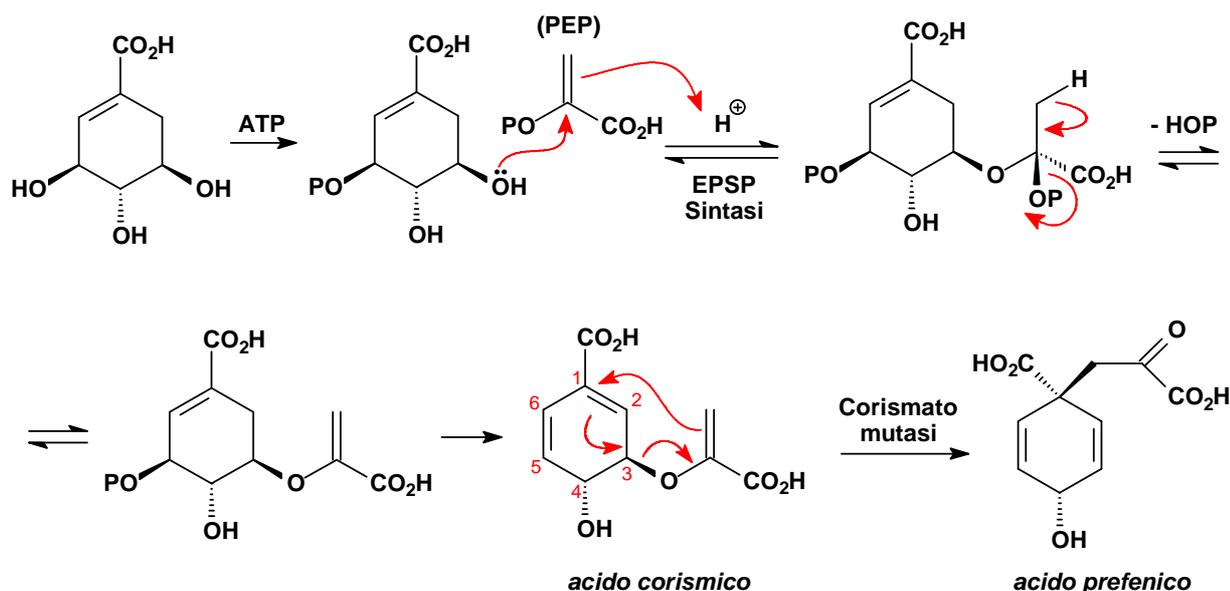


Figura 11.6. Origine biosintetica dei flavonoidi.

Come mostrato schematicamente nella figura 11.6, i derivati cinnamici e caffeici derivano dalla trasformazione dell'acido scichimico attraverso un discreto numero di passaggi. Questa biosintesi (Schema 11.3), prevede che inizialmente l'acido scichimico venga fosforilato ad opera dell'ATP, per poi dare una reazione di addizione su una molecola di acido **fosfoenolpiruvico** (PEP), ad opera dell'EPSP-sintasi, che porta ad un intermedio di tipo acetalico. Questo intermedio subisce una prima eliminazione di fosfato, che ripristina il gruppo enolpiruvico, e poi una seconda eliminazione che porta alla formazione del sistema dienico dell' **acido corismico**. A questo punto avviene una singolare trasposizione, detta di Claisen, la quale trasferisce la catena laterale costituita dal gruppo enolpiruvico in modo tale che essa venga legata direttamente al C-1 del sistema cicloesadienico ottenendo così l'**acido preferico**.



Scherma 11.3. Trasformazione dell'acido scichimico in acido preferico.

Sebbene questa reazione possa avvenire anche termicamente, in natura, la presenza dell'enzima *corismato mutasi* aumenta la velocità di questo passaggio di  $10^6$  volte.

L'alta velocità della trasposizione di Claisen è dovuta alla presenza di un conformero pseudoassiale dell'acido corismico il quale verrebbe legato dall'enzima permettendo uno stato di transizione a sedia (Figura 11.7).

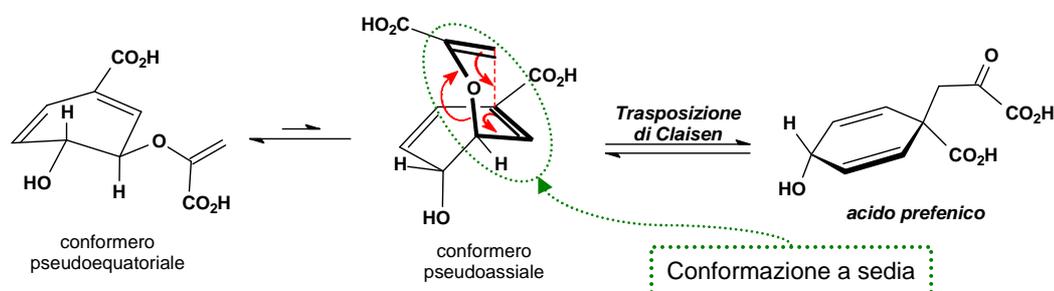


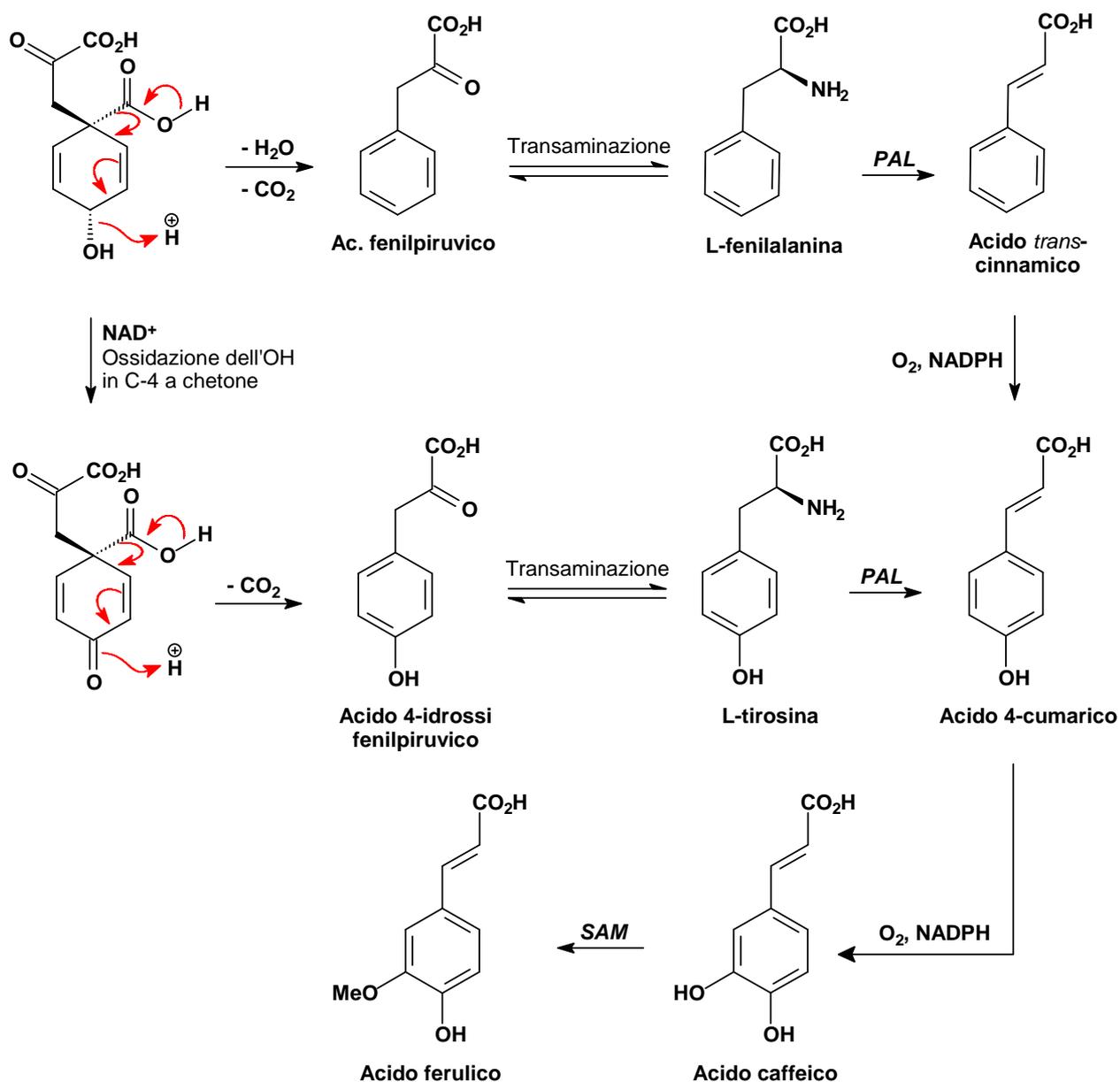
Figura 11.7.

Il residuo piruvico sul C-1 dell'acido pterfenico è fondamentale per la formazione della porzione aminoacidica degli aminoacidi aromatici *L-fenilalanina* e *L-tirosina* e dei loro derivati (acido caffeico e acido cinnamico). Da notare che il percorso che dall'acido pterfenico porta alla fenilalanina ed alla tirosina dipende dal tipo di organismo e, spesso, per lo stesso organismo può operare più di una via biosintetica, a secondo delle attività enzimatiche presenti.

Fondamentalmente per tale trasformazione occorrono solo tre reazioni, quali l'aromatizzazione decarbossilativa dell'anello cicloesandienico, la transaminazione e l'ossidazione (nel caso della biosintesi della tirosina), ma non necessariamente secondo questo ordine.

Nella prima sequenza biosintetica dello schema 11.4 viene riportata la trasformazione dell'acido pterfenico in acido *fenilpiruvico*, tramite un'aromatizzazione decarbossilativa, e di seguito la sua transaminazione a *L-fenilalanina*.

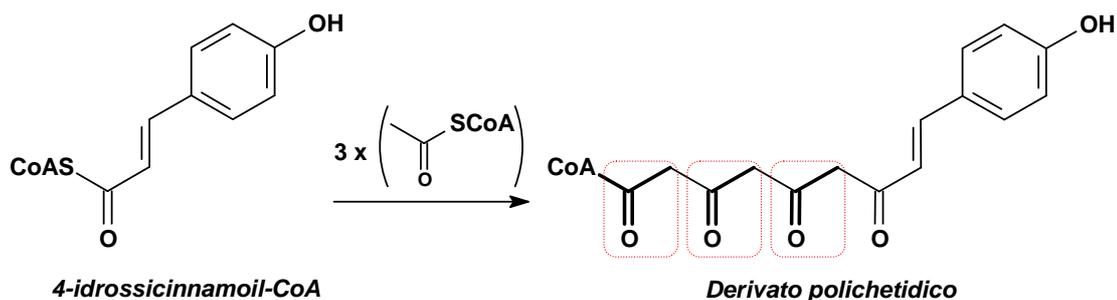
La fenilalanina va incontro ad una reazione di deamminazione, ad opera della *fenilalanina ammonia liasi* (PAL), ed a varie reazioni di ossidrilazione dipendenti dal citocromo P-450. Meno comune sembra invece la deamminazione della tirosina, essendo questa limitata solo alle graminacee.



*Schema 11.4. Trasformazione dell'acido fenilpiruvico negli aminoacidi fenilalanina e tirosina e derivati.*

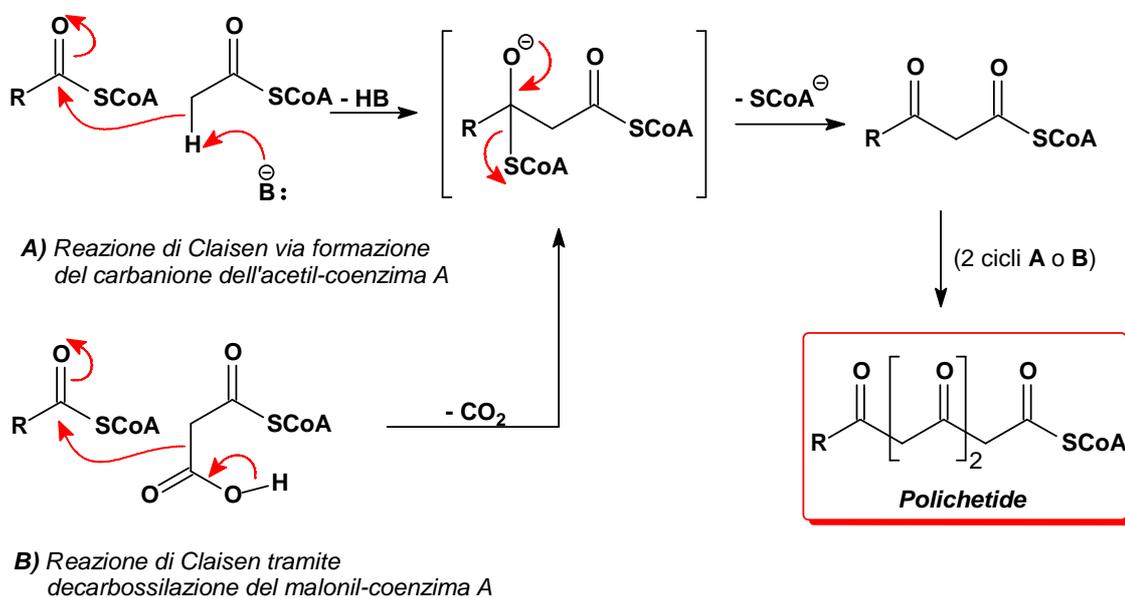
I vari intermedi di questo processo biosintetico, possono rimanere come tali o venire derivatizzati, ad esempio come esteri o glucosidi, e quindi prendere vie diverse (aminoacidi, alcaloidi, etc.).

L'acido cinnamico ed i suoi derivati (ac. 4-cumarico, ac. caffeico, ac. ferulico etc.), esterificati con il coenzima A, costituiscono le unità iniziali su cui avviene l'allungamento della catena laterale da parte dell'acetil-CoA, con formazione di intermedi di tipo **polichetidico** (Schema 11.5).



*Schema 11.5. Formazione del derivato polichetidico precursore dei flavonoidi.*

In realtà, come già anticipato nel capitolo dei lipidi, la biosintesi dei polichetidi può coinvolgere un altro tipo di intermedio: il *malonil-CoA*. La reazione di condensazione del malonil-CoA avviene con le solite modalità, ovvero secondo un meccanismo di tipo Claisen. L'unica differenza risiede nel fatto che dei tre carboni del malonil-CoA, solo due vengono addizionati, mentre il terzo, il gruppo carbossilico, viene perso per decarbossilazione come  $\text{CO}_2$ . Il tutto avviene in modo concertato, come riportato nello schema 11.6, dove la via dell'acetato (A) e quella del malonato (B) vengono messe a confronto: notare la formazione dello stesso tipo di intermedio di addizione.

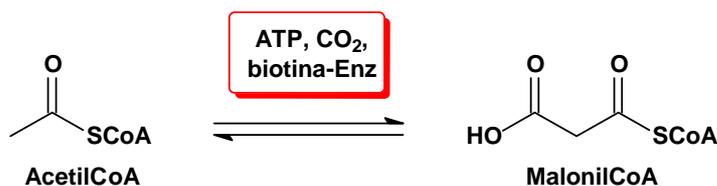


*Schema 11.6. Meccanismo generale della biosintesi dei polichetidi (nel caso dei flavonoidi R corrisponde al residuo dell'ac. 4-cumarico, caffeico, ferulico etc.).*

E' importante evidenziare che la conversione dell'acetil-CoA in malonil-CoA comporta un

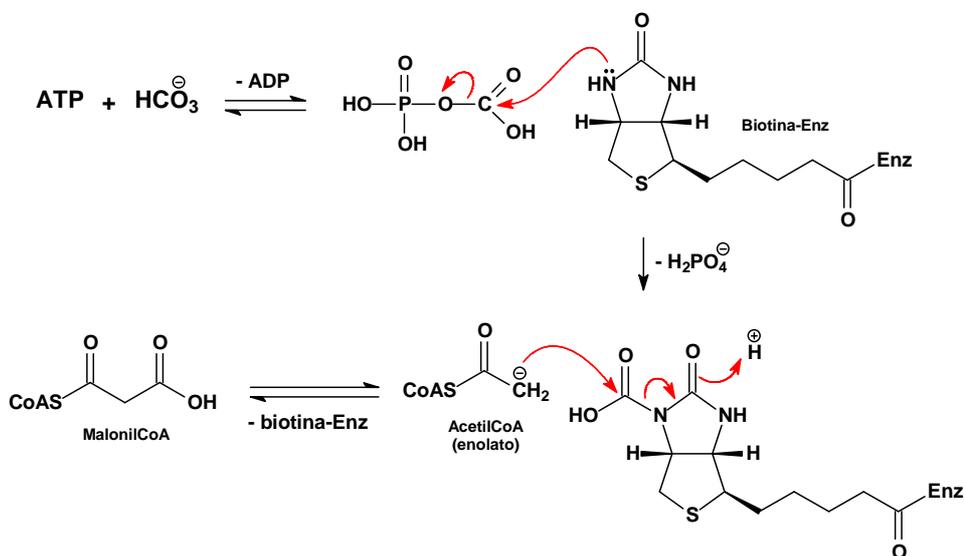
aumento dell'acidità degli idrogeni che vengono a trovarsi tra due gruppi carbonilici. L'introduzione di un gruppo carbossilico sull'acetil-CoA ha quindi il solo ruolo di aumentare la reattività del nucleofilo per facilitare la reazione di Claisen, venendo infatti rimosso una volta svolto il suo compito. Per questo motivo non si osserva mai la formazione di derivati acilati di tipo malonico.

La reazione di conversione dell'acetilCoA in malonilCoA si può vedere in una forma schematica semplificata di equilibrio tra le due specie (schema 11.7), in cui è coinvolta la presenza di ATP,  $\text{CO}_2$  (sotto forma di bicarbonato:  $\text{HCO}_3^-$ ) e del cofattore enzimatico *biotina*.



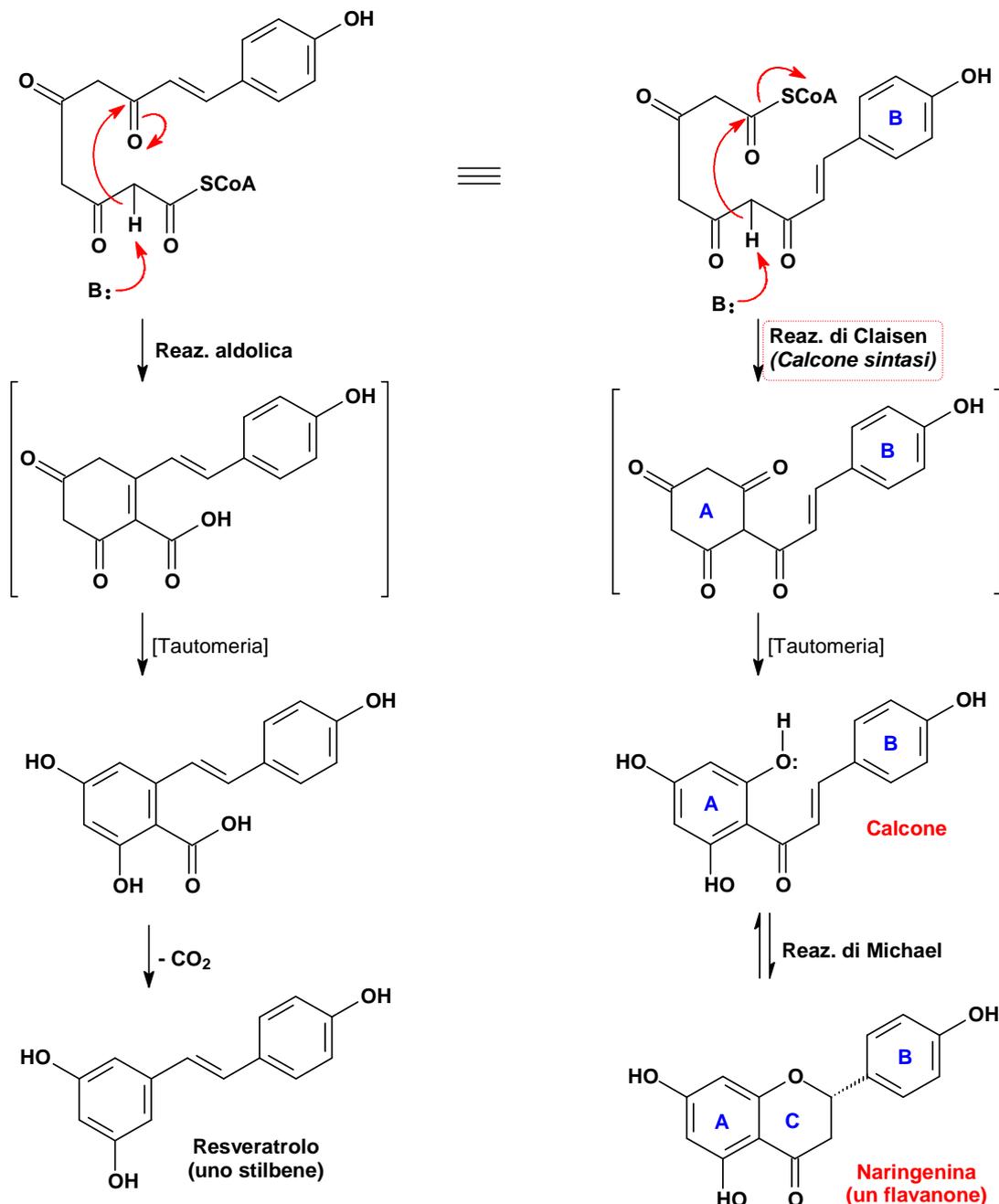
Schema 11.7. Conversione dell'acetilCoA in malonilCoA.

Nello schema seguente si possono vedere in dettaglio i meccanismi coinvolti in questa conversione.



A questo punto, a secondo della natura del sistema enzimatico che interviene, gli intermedi polichetidici possono ripiegarsi in conformazioni diverse e subire reazioni di condensazione aldolica (via degli stilbeni) oppure reazioni di condensazione di Claisen (via dei flavonoidi) che portano alla formazione del secondo anello aromatico (schema 11.8). Nella via biosintetica dei flavonoidi la ciclizzazione della catena polichetidica viene catalizzata dall'enzima *calcone sintasi* e

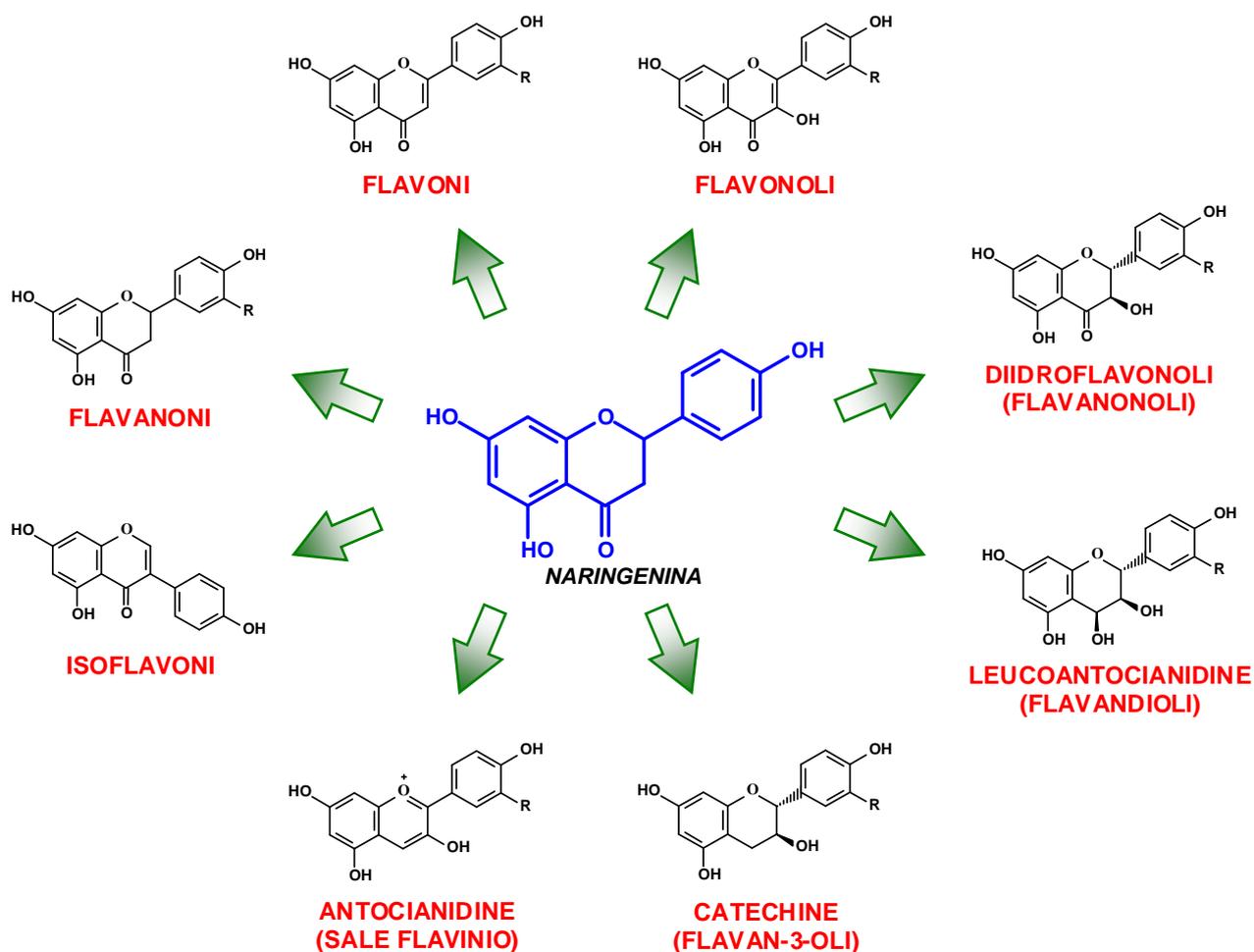
porta alla formazione dell'anello aromatico "A" dei flavonoidi.



Schema 11.8. Ciclizzazione della catena polichetidica.

L'ultimo passaggio è la formazione dell'anello "C" del flavonoide che avviene per attacco nucleofilo dell'OH fenolico sul chetone  $\alpha,\beta$ -insaturo (reazione tipo Michael). Questo passaggio è reversibile e dipende dalle condizioni di reazione: nel caso siano acide, favoriscono la formazione

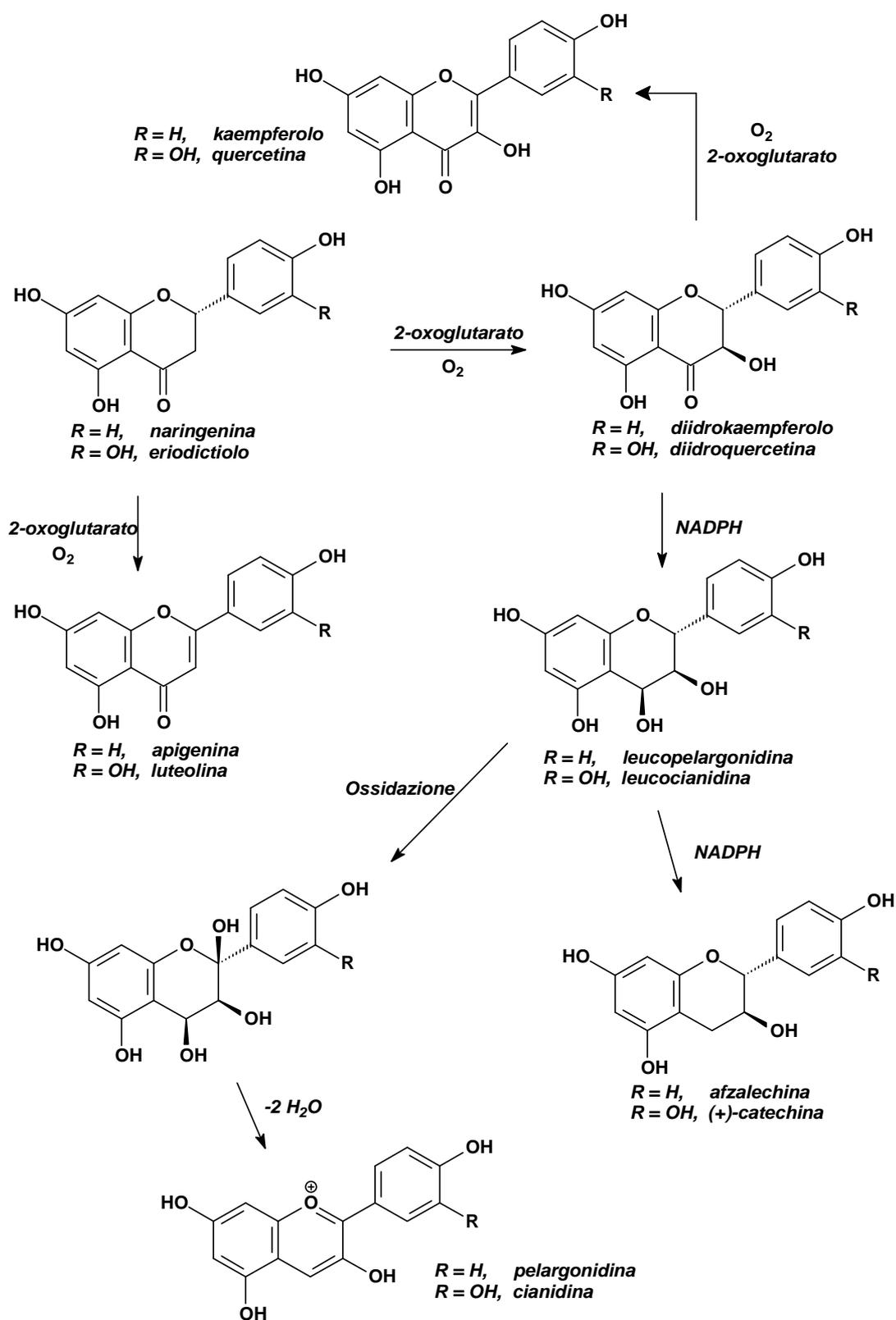
del flavanone, nel caso siano basiche, favoriscono la formazione del calcone; in natura tuttavia la reazione è catalizzata da un enzima che opera anche in maniera stereospecifica, generando un solo enantiomero del flavanone. Come risulta dallo schema 11.8, la naringenina è il primo flavonoide che si forma e che a sua volta è un intermedio di partenza per la biosintesi di molti altri flavonoidi (figura 11.8).



**Figura 11.8.** Rappresentazione generale delle varie sottoclassi di flavonoidi.

La naringenina, come anche altri flavonoidi, può subire diverse trasformazioni (ossidazione, glicosilazione, metilazione di funzioni fenoliche, etc.) che portano ad un aumento consistente del numero dei composti possibili pur mantenendo nuclei di base comuni.

Nella schema 11.9 vengono riportate le possibili trasformazioni che può subire la naringenina per ottenere varie sottoclassi di flavonoidi.

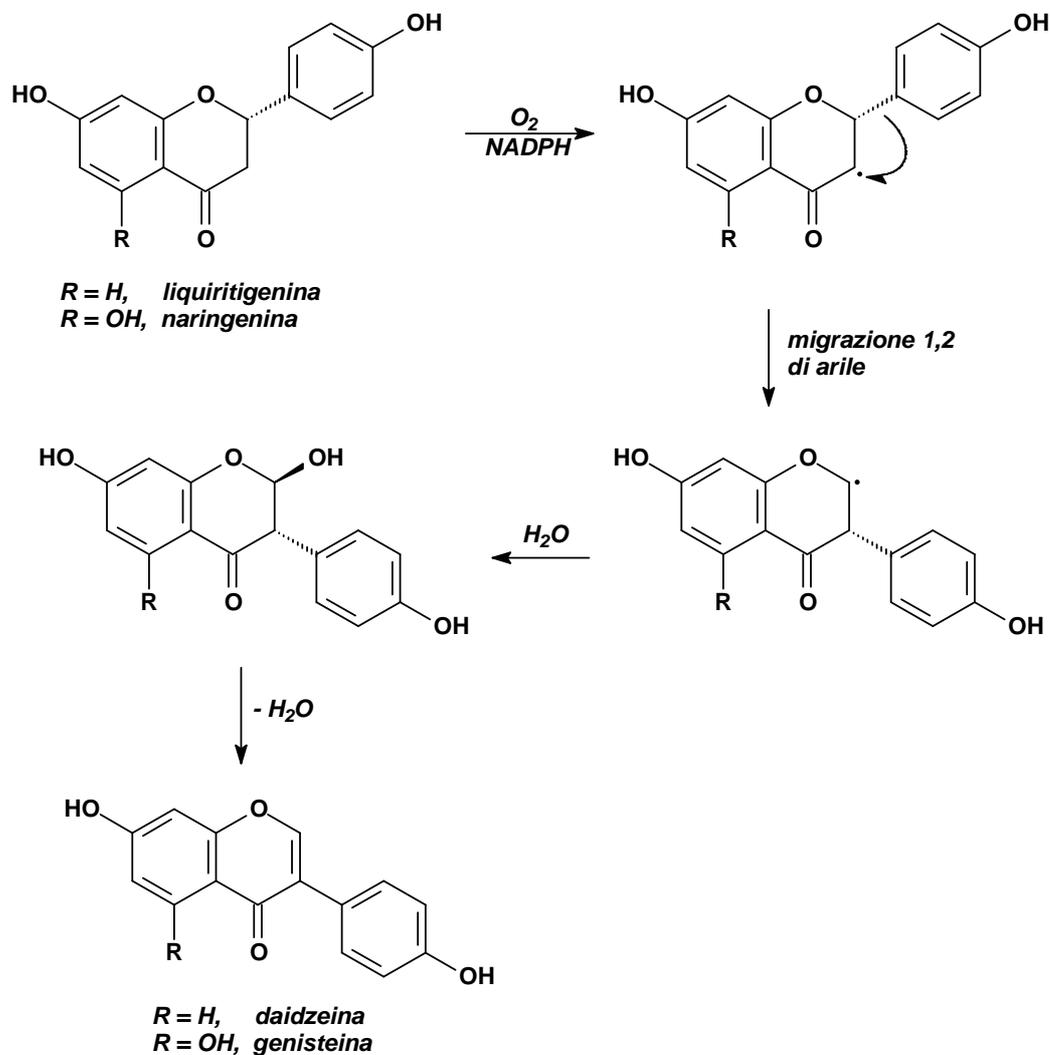


Schema 11.9. Trasformazione della naringenina in vari flavonoidi.

## Isoflavonoidi

Gli **isoflavonoidi**, formano una sottoclasse ben distinta dai flavonoidi, essendo una variante strutturale in cui l'anello aromatico derivato dalla via dell'acido scichimico (anello "B"), si è spostato sul carbonio adiacente, ovvero dalla posizione 2 alla posizione 3.

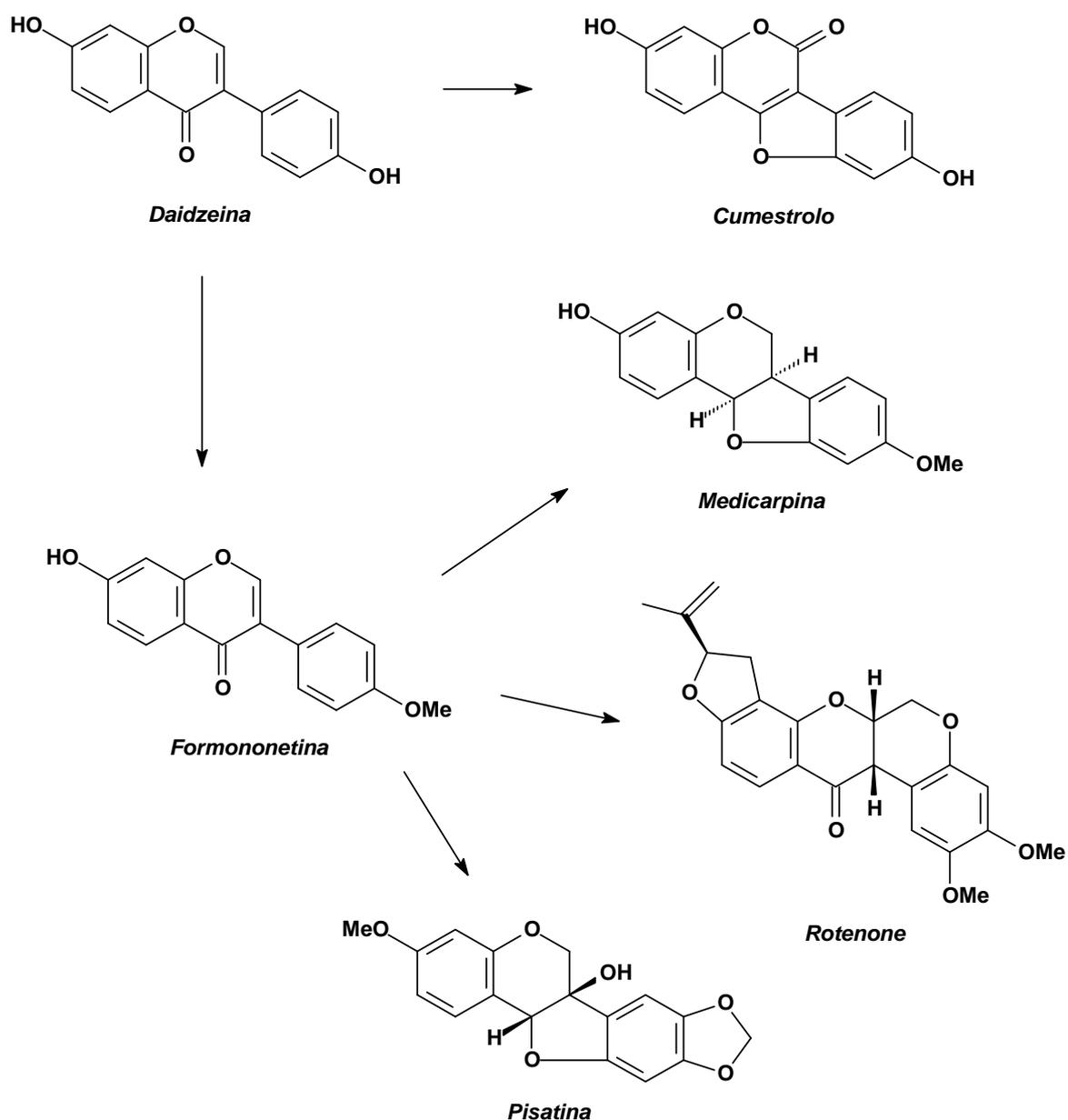
Questa trasposizione viene effettuata da un enzima dipendente dal citocromo P-450, il quale richiede  $O_2$  e NADPH come cofattori e trasforma i flavanoni liquiritigenina e naringenina rispettivamente negli isoflavoni daidzeina e genisteina, passando attraverso idrossiisoflavoni intermedi. Per questa reazione è stato proposto un meccanismo di tipo radicalico (schema 11.10), che risulta essere piuttosto raro in natura.



Schema 11.10. Biosintesi degli isoflavonoidi.

Da notare che gli isoflavonoidi sono piuttosto rari e sono limitati quasi esclusivamente alla famiglia delle Leguminose.

Nonostante ciò sono stati identificati molte centinaia di isoflavonoidi differenti, la cui complessità strutturale è ottenuta attraverso reazioni di ossidrilazione ed alchilazione che variano lo stato di ossidazione dell'anello eterociclico o formano anelli eterociclici aggiuntivi (Schema 11.11).



*Schema 11.11. Alcuni esempi di isoflavonoidi.*

Gli isoflavonoidi, sebbene meno comuni dei flavonoidi, possono presentare particolari attività biologiche; ad esempio la *medicarpina*, presente nell'erba medica, e la *pisatina*, presente nel

pisello, hanno attività antifungina e fanno parte del meccanismo naturale che queste piante usano per difendersi dagli attacchi dei funghi.

Semplici isoflavoni come la *daidzeina* ed il *cumestrola*, presenti nell'erba medica e nel trifoglio, hanno attività estrogenica sufficiente ad influenzare la riproduzione degli animali da pascolo e sono anche detti "*fitoestrogeni*". Queste molecole planari indubbiamente imitano la forma e la polarità dell'ormone steroideo estradiolo. Per questo motivo è necessario limitare il consumo di foraggio da leguminose da parte di questi animali, o in alternativa bisogna scegliere varietà con basso contenuto di isoflavoni. Si ritiene che gli isoflavoni nella dieta umana, provenienti ad esempio dal consumo di prodotti derivati della soia, diano una certa protezione verso i tumori dipendenti dagli estrogeni, come il cancro al seno, diminuendo la disponibilità dell'ormone naturale.

I **rotenoidi**, che prendono il nome dal primo composto conosciuto di questo tipo, il *rotenone*, presentano una grande attività *insetticida* e *pescicida* (veleni per i pesci), poiché interferiscono con la fosforilazione ossidativa. A meno che non entrino direttamente nella circolazione sanguigna, queste sostanze sono relativamente innocue per i mammiferi, in quanto una volta ingerite vengono rapidamente metabolizzate. Il rotenone costituisce un eccellente insetticida biodegradabile ed è usato in forma pura o come pianta polverizzata. Quantità consistenti di rotenone possono essere reperite nelle radici di *Derris elliptica* o di specie del genere *Lonchocarpus*.

## 12. ANTRACHINONI



I composti antrachinonici sono un eccellente esempio di metaboliti derivanti biosinteticamente dall'acetato. L'assemblamento dello scheletro antrachinonico (e delle strutture policicliche correlate) avviene con una sequenza a più stadi che impiega come materiale di partenza una catena polichetidica che, dopo essersi ripiegata, subisce un primo processo di ciclizzazione a cominciare dal centro della catena, seguita poi dalla formazione degli altri due anelli.

L'*endocrocina*, isolata da specie di *Penicillium* e *Aspergillus*, si forma da un polichetide contenente otto unità "acetato", che formano lo scheletro carbonioso. L'*emodina*, un metabolita isolato da alcune specie di *Penicillium* e da alcune piante superiori (per es. da specie di *Rhamnus* e *Rumex*), sembra che si formi dall'endocrocina in seguito ad una reazione di decarbossilazione. La O-metilazione dell'emodina porta alla formazione di *fiscione*.

L'*islandicina* è un altro pigmento antrachinonico prodotto da *Penicillium islandicum* e differisce dall'emodina in quanto un gruppo ossidrilico è stato ridotto, mentre un altro è stato incorporato in posizione adiacente al metile.

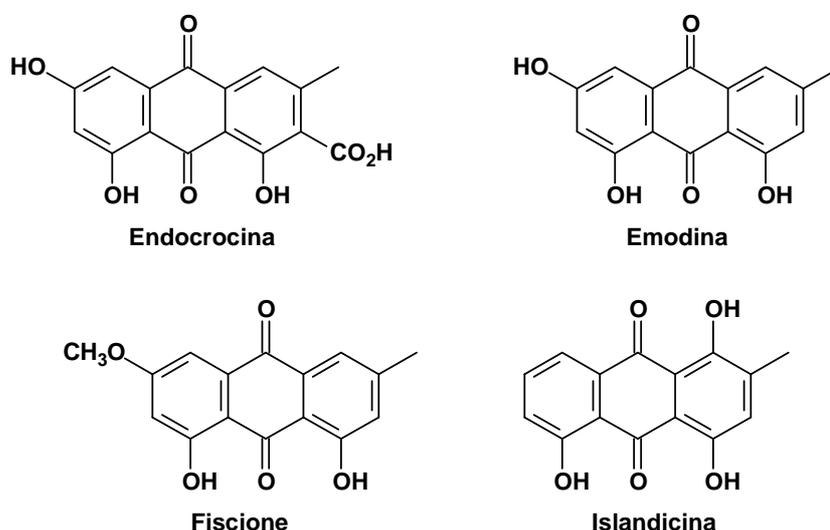
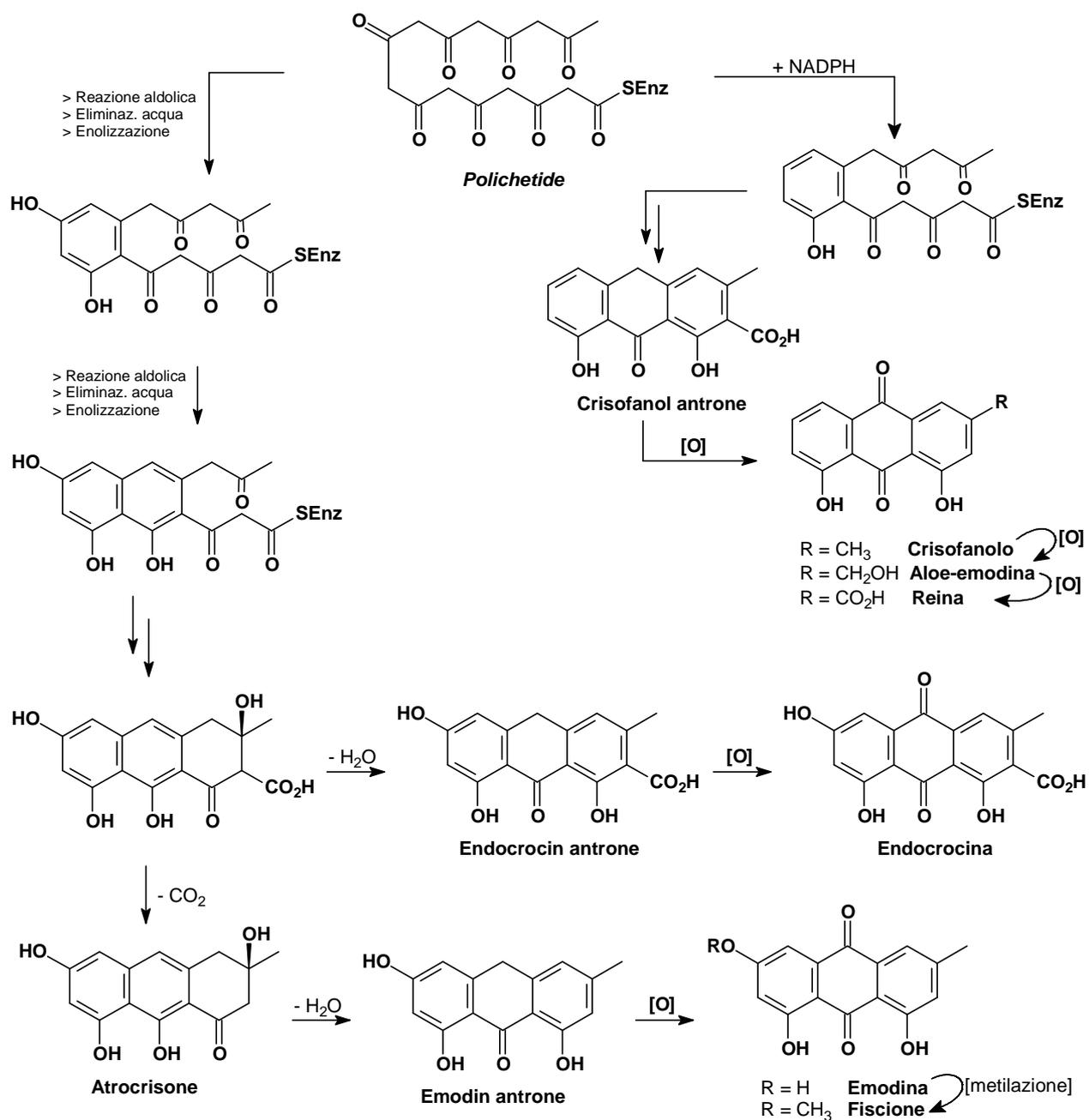


Figura 12.1. Esempi di nuclei antrachinonici.

Nello schema 12.1 viene riportata una possibile via biosintetica che porta all'**endocrocina** e all'**emodina**.



Schema 12.1. Biosintesi degli antrachinoni.

Vari derivati dell'emodina, del fiscione, del crisofanolo, della reina (etc.), sono i principi attivi presenti nei lassativi derivanti dalla Senna, Cascara, Frangola, Rabarbaro ed Aloe.

Questi per essere attivi ed esercitare la loro azione devono trovarsi sotto forma di glicosidi, che sono dei derivati solubili in acqua. Il maggiore effetto purgativo di queste droghe è dovuto però a composti come i **cascarosidi** (ad es. cascaroside A), che sono miscele di *O*-glicosidi e *C*-glicosidi ed ai **sennosidi** (ad es. sennoside A) che sono invece glicosidi di un diantrone (Figura 12.2).

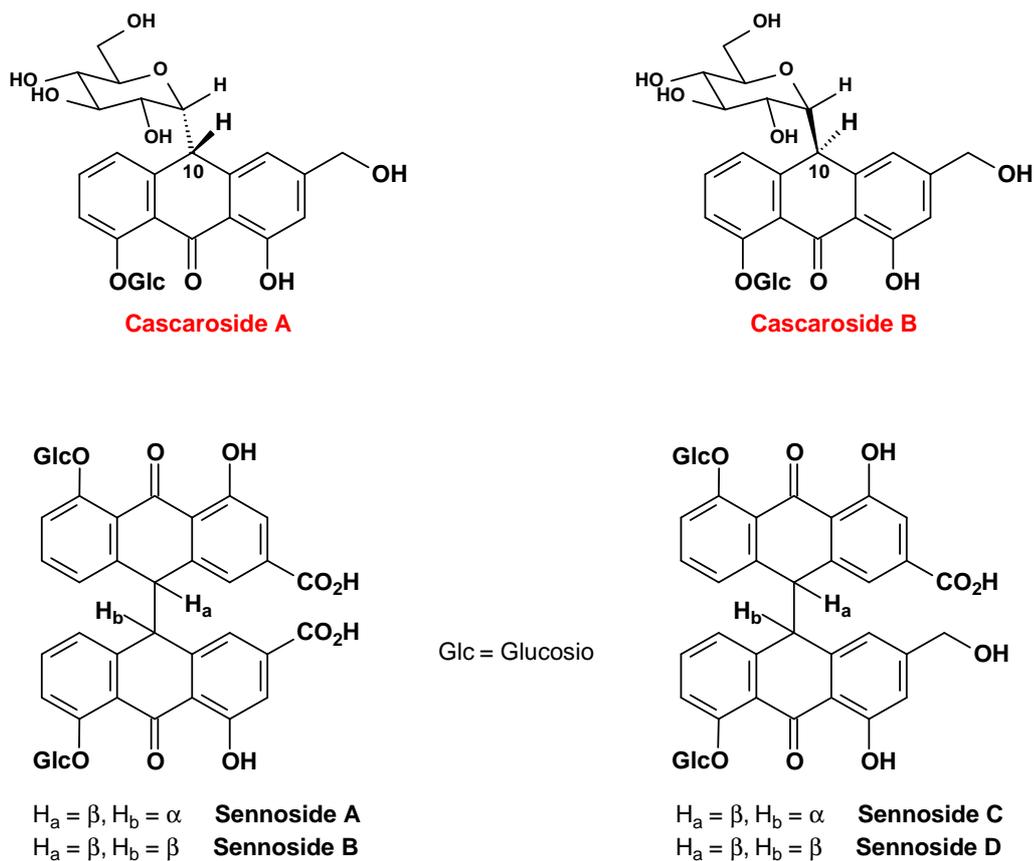
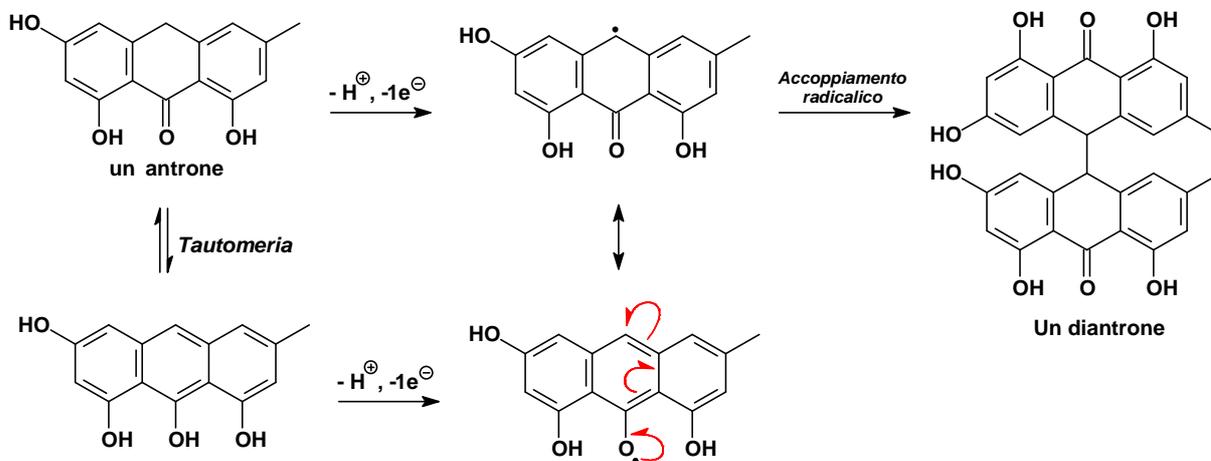


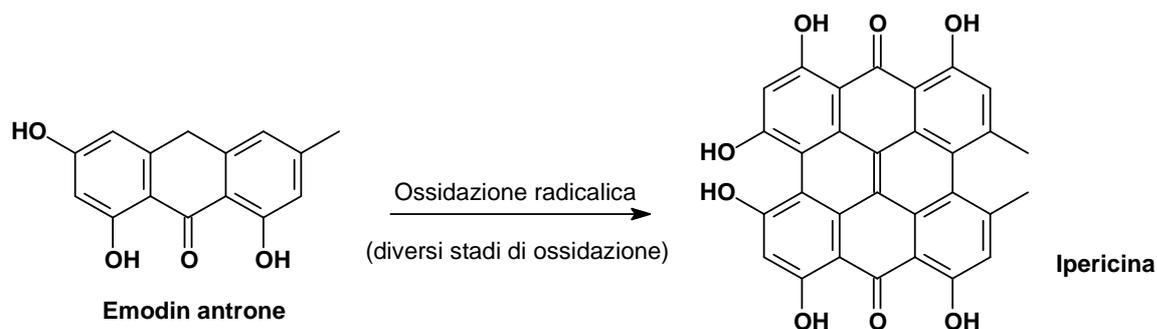
Figura 12.2. Esempi di derivati antrachinonici con attività purgante.

I **diantroni** possono formarsi per accoppiamento di due molecole di antroni, in seguito ad una reazione di ossidazione radicalica (schema 12.2), che si può spingere oltre e generare i **deidrodiantroni** come l'ipericina.



Schema 12.2. Formazione della specie diantronica.

L'**Ipericina** (Figura 12.3), isolata da culture del fungo *Dermocybe* e presente come costituente dell'*Hypericum perforatum* (Hypericaceae) utilizzato in erboristeria, non presenta un'azione purgativa, ma un'azione fotosensibilizzante. L'ingestione di ipericina provoca un maggiore assorbimento di raggi UV e quindi può provocare dermatiti e scottature. Recentemente è stata oggetto di studi riguardanti la sua azione antidepressiva ed antivirale (in particolare anti-HIV).



**Figura 12.3.** Ipericina, un diantrone policondensato.

Gli antrachinoni sono sostanze che stimolano la peristalsi intestinale e agiscono così come lassativi. Le piante ad antrachinoni sono probabilmente tra le più familiari al grande pubblico. Le più comuni sono *Cassia angustifolia* (Senna), *Rhamnus frangula*, e *Aloe vera*.

Gli antrachinoni sono pigmenti colorati presenti in molte piante, che però non contribuiscono molto alla colorazione nelle piante evolute in quanto sono presenti nelle cortecce, nei legni o nelle radici, oppure in tessuti, come le foglie, dove sono mascherati da altri pigmenti. Gli antrachinoni sono comunque piuttosto rari, e l'emodina è il più comune. Sono stati studiati soprattutto perché le piante che li contengono sono tradizionalmente utilizzate come purganti.

Si trovano prevalentemente nelle famiglie delle Poligonaceae, Caesalpinaceae, Rhamnaceae e Liliaceae.