



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

BIOLOGIA E BIOCHIMICA DELL'UOMO E DELL'AMBIENTE

Ciclo XXVI

Studio di componenti del lattice di
Euphorbia characias

Settore scientifico disciplinare di afferenza

BIO/10

Presentata da:	Dott.ssa Claudia Mascia
Coordinatore Dottorato	Prof. Emanuele Sanna
Tutor/Relatore	Prof.ssa Rosaria Medda

Esame finale anno accademico 2013–2014

*Nella speranza che il futuro sia ricco di sorprese e di opportunità,
questo traguardo lo dedico a voi, amori miei, che non avete mai
smesso, neanche per un secondo, di credere in me.*

INDICE

Abstract	1
1. INTRODUZIONE	
1.1 <i>Euphorbia characias</i>	2
1.2 Sostanze bioattive	6
1.2.1 Antiossidanti	6
1.2.2 Inibitori delle acetilcolinesterasi	15
1.3 Gomme naturali e cis-preniltransferasi	19
2. Obiettivo del lavoro di tesi	25
3. MATERIALI E METODI	26
3.1 Metodi basati sullo scavenging radicalico	27
3.1.1 Saggio dell' ABTS	27
3.1.2 Saggio del DPPH	29
3.2 Determinazione del contenuto totale di polifenoli	29
3.2.1 Metodo di Folin-Ciocalteu	30
3.2.2 Metodo enzimatico	31
3.3 Determinazione del contenuto totale di flavonoidi	31
3.4 Determinazione dell' inibizione dell' attività enzimatica della acetilcolinesterasi	32
3.5 Gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS)	34
3.6 Estrazione, purificazione e caratterizzazione della gomma naturale	35
3.6.1 Risonanza magnetica nucleare (NMR)	36
3.6.2 Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR)	38
3.6.3 Cromatografia di permeazione su gel (GPC)	39
3.7 Caratterizzazione molecolare di un gene	41
3.7.1 Strategia <i>CODEHOP</i>	42
3.7.2 Estrazione dell' RNA totale	43
3.7.3 Reverse transcriptase-PCR (RT-PCR)	45
3.7.4 Strategia 5',3' RACE (Rapid Amplification cDNAs Ends)	46
3.7.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)	49
3.7.6 Purificazione dell' amplificato di DNA	51
3.7.7 Sequenziamento Sanger	52
4. PARTE SPERIMENTALE	54
4.1 Studio delle sostanze bioattive presenti nel lattice	54
4.1.1 Preparazione degli estratti	54
4.1.2 Saggi spettrofotometrici	55
I. Scavenging radicalico	55

II.	Contenuto totale di composti polifenolici	56
III.	Contenuto totale di flavonoidi	57
IV.	Determinazione dell'inibizione delle AChE	58
4.1.3	GC-MS	59
I.	Analisi GC-MS di composti polifenolici come derivati TBDMS dell'estratto in TCA	59
II.	Analisi GC-MS di quercetina e miricetina come derivati TMSI dell'estratto in TCA	60
4.2	Gomma naturale	60
4.2.1	Estrazione della gomma	61
4.2.2	Determinazione del contenuto in gel della gomma	62
4.2.3	Determinazione del contenuto in resina della gomma	62
4.2.4	Analisi NMR	63
4.2.5	Analisi FT-IR	64
4.2.6	Analisi GPC	64
4.3	Caratterizzazione molecolare della cis-preniltransferasi	64
4.3.1	Estrazione dell'RNA	65
4.3.2	Caratterizzazione molecolare della porzione interna del gene	66
4.3.3	Caratterizzazione molecolare delle estremità del gene	70
4.3.4	Purificazione dell'amplificato di DNA e sequenziamento	74
5.	RISULTATI	75
5.1	Antiossidanti e composti inibitori dell'attività acetilcolinesterasica	75
5.2	Gomma naturale	80
5.3	Cis-prenil transferasi	85
6.	CONCLUSIONI	89
	BIBLIOGRAFIA	91
	PUBBLICAZIONI	98
	SEQUENZE DEPOSITATE IN GeneBank	98
	RINGRAZIAMENTI	99

Study of latex components of *Euphorbia characias*

Abstract

The aim of the present study was to contribute to the knowledge of the components of the latex, a milky fluid exudated from the Mediterranean shrub *Euphorbia characias*.

The antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities were explored in *E. characias*. The latex was extracted using several conventional methods and a new procedure involving the use of the trichloroacetic acid. The results of this research indicate that *E. characias* latex exhibits antioxidant activities, is rich in total polyphenolic and flavonoids content and exhibited substantial inhibition of acetylcholinesterase activity.

A natural rubber was identified and characterized for the first time in the latex of *E. characias*. Four different methods, i.e. acetone, acetic acid, trichloroacetic acid and Triton® X-100, followed by successive treatments with cyclohexane/ethanol, were employed to extract the natural rubber. The higher yield (14%) was achieved after extraction with acetic acid. *E. characias* rubber showed a molecular weight of 93000 with a M_w/M_n of 2.9. ^1H NMR, ^{13}C NMR and FTIR analysis revealed the characteristic of the *cis*-1,4-polyisoprene typical of natural rubber.

The enzyme catalyzing the rubber molecule elongation is *cis*-prenyltransferase called “rubber transferase”. We cloned the cDNA encoding for the *E. characias* rubber transferase by RT-PCR. The cDNA contains an open reading frame of 810 bp encoding a protein of 270 amino acids (GenBank JX564541). The cDNA nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence appear to be highly homologous to the sequence of several plant *cis*-prenyltransferases.

The results provided novel insight into latex components and will ultimately benefit the broader understanding of *E. characias* latex composition.

Keywords: *Euphorbia characias*, latex, antioxidants, acetylcholinesterase inhibitors, natural rubber, *cis*-prenyltransferase.

Corresponding Author: Claudia Mascia,

Department of Life and Environment Sciences,
Biomedical Section

University of Cagliari, 09042 Monserrato
Cagliari, Italy.

E-mail: cl.mascia1@studenti.unica.it

clausmasci@hotmail.it

1. INTRODUZIONE

1.1 *Euphorbia characias*

L'*Euphorbia characias* è una pianta arbustiva, non succulenta, appartenente alla famiglia delle *Euphorbiaceae*, largamente distribuita in diversi habitat (costoni rocciosi, uliveti, foreste), endemica nel bacino del Mediterraneo e nelle coste del Portogallo.

È una pianta legnosa e flessibile, con foglie lanceolate di colore verde-blu che presentano venature più chiare. Le foglie sono distribuite nella parte alta del fusto e disposte a spirale (Figura 1).



Figura 1. Pianta di *E. characias*

I fiori formano un'infiorescenza che prende il nome di ciazio, questo presenta dei nettari di forma trapezoidale di colore rosso-bruno che costituiscono un involucro a forma di coppa all'interno del quale si trova il fiore femminile circondato dai fiori maschili.

Il fiore femminile è di colore giallo intenso (Figura 2) mentre i fiori maschili sono sprovvisti di perianzio e sono formati dai soli stami. Fiorisce da gennaio ad aprile e si riproduce tramite impollinazione entomogama.



Figura 2. Pianta di *E. characias* fiorita.

Il frutto è una capsula pelosa tricarpellare all'interno del quale sono presenti tre semi di colore grigio-argenteo provvisti di caruncola conica.

La disseminazione avviene in due stadi, inizialmente la pianta disperde i semi nell'ambiente circostante tramite un meccanismo balistico, i semi vengono poi raccolti da diverse specie di formiche e portati all'interno dei formicai.

All'interno del fusto legnoso dell'*E. characias* viene prodotto e immagazzinato il lattice, ad opera di particolari cellule allungate altamente specializzate che formano un sistema di vasi in grado di raggiungere diverse parti della pianta, che prendono il nome di laticiferi. In base all'origine anatomica i laticiferi vengono classificati in articolati e non articolati.

Vengono definiti articolati quando hanno origine da serie di cellule unite o fuse longitudinalmente tra loro. Le pareti delle cellule adiacenti possono essere anastomosizzate o non anastomosizzate in base alla specie.

Vengono definiti invece non articolati quando hanno origine da singole cellule embrionali che si estendono durante la crescita della pianta per

formare un sistema di vasi ramificati o non ramificati (Pintus et al, 2010; Hagel et al, 2008).

In molte piante appartenenti alla famiglia delle *Euphorbiaceae* possiamo trovare dei laticiferi non articolati come nel caso dell'*E. characias* (Bauer et al, 2014), di altre specie di *Euphorbia* (Hagel et al, 2008) e di *Croton draco* (Farías et al, 2009), altre piante appartenenti a questa famiglia, come l'*Hevea brasiliensis*, presentano invece laticiferi articolati anastomosizzati (Bauer et al, 2014; Hagel et al, 2008).

I laticiferi sono delle importanti strutture vegetali utilizzate per la classificazione tassonomica, studiando la loro struttura è possibile infatti ottenere informazioni inerenti ai rapporti filogenetici esistenti tra diverse specie vegetali che producono lattice (Hagel et al, 2008).

Il citoplasma dei laticiferi contiene il lattice (Figura 3), un'emulsione di colore bianco opalescente che presenta una composizione estremamente eterogenea, al suo interno sono stati identificati composti di diversa natura come alcaloidi, terpenoidi, resine, amido, olii, diversi metaboliti secondari e diverse attività enzimatiche (Pintus et al, 2010).



Figura 3. Lattice essudato da un ramo di *E. characias*

Dagli studi effettuati finora è emerso che il lattice presenta diverse funzioni importanti: partecipa ai meccanismi di cicatrizzazione della pianta, presenta una funzione di riserva idrica, presenta un' importante funzione di difesa contro agenti patogeni e parassiti (Hagel et al, 2008). A livello dei laticiferi vengono inoltre confinati molti prodotti secondari dannosi per la pianta.

Nel lattice di diverse piante appartenenti al genere *Euphorbia* sono stati identificati diversi metaboliti specifici, come gli alcoli triterpenici, che possono essere utilizzati come marker chimici per la classificazione chimico-tassonomica delle specie (Shi et al, 2008).

Dal genere *Euphorbia* sono stati identificati cerebrosidi con funzione antimicrobica, composti diterpenoidi con funzione citotossica, esteri diterpenici con funzione pro-cancerogena (Shi et al, 2008), composti con funzione antivirale, glicolipidi con funzione antinfiammatoria, flavonoidi e polifenoli con funzione antiossidante (Tsao et al, 2010), composti diterpenoidi e diterpeni biciclici con funzione pro-infiammatoria (Appendino et al 2000, Helmboldt et al 2009), tocoferoli, acidi grassi essenziali, steroli (Bruni et al, 2004), composti diterpenoidi con funzione antiproliferativa (Valente et al, 2004), composti polifenolici con azione antitumorale (Marzouk 2012), mucillagini con funzione anti-iperlicemizzante (Yvette Fofie, 2015), e composti con funzione anticoagulante (Silva et al, 2014) e antifungina (Giordani et al, 2001).

Dagli studi effettuati è emerso che le piante del genere *Euphorbia* non sono ricche di composti cumarinici, i principali composti isolati sono la scopoletina, la 7,7'-diidrossi-6,8'-bicumarina, la 6,7,8-trimetossicumarina, e la 6-idrossi-7-metossicumarina (Shi et al, 2008).

Recenti studi effettuati sugli estratti di *Euphorbia characias* hanno mostrato la presenza di diversi metaboliti non polari come polimeri di *cis*-poliisoprene, esteri dell'acido linolenico, alcoli liberi, triterpen-3-oli, ed esteri dei triterpeni (Palomino et al, 2011).

Nel lattice di *E. characias* sono state identificate numerose proteine e tra queste diversi enzimi come una perossidasi Ca^{2+} /calmodulina dipendente, una catalasi e un'antiquitina con funzione antiossidante, una amminossidasi (Pintus et al, 2010), una fosfatasi acida, una nucleotide pirofosfatasi/fosfodiesterasi (Medda et al, 2011), e una lipasi (Moulin et al, 1994).

Partendo dagli apici fogliari o dal lattice della pianta sono stati isolati diversi geni codificanti per proteine e le relative sequenze sono state depositate in banca dati (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Recentemente è

stata sequenziata la porzione interna del gene codificante per una chitinasi (GenBank: KF472315.2).

Il lattice di *E. characias* è ancora oggi oggetto di studio, la sua caratterizzazione biochimica è un processo complesso ma necessario per comprenderne il ruolo nella fisiologia della pianta.

1.2 Sostante bioattive

Sono dette bioattive quelle sostanze che esercitano un effetto su un organismo vivente, su un tessuto o su una cellula. Dal punto di vista nutrizionale le sostanze bioattive non sono nutrienti essenziali ma alcune sostanze, se assunte con la dieta, possono esercitare un'azione preventiva contro l'insorgenza di malattie, migliorando le condizioni generali di salute. Le sostanze bioattive possono essere di origine animale, vegetale o di sintesi. Le piante rappresentano la più importante fonte di sostanze bioattive naturali. I prodotti naturali rappresentano ancora oggi la fonte principale di innovazione per la ricerca di nuovi farmaci.

Dagli studi effettuati è emerso che i composti fitochimici bioattivi sono in grado di influenzare diversi processi biologici esplicando la loro azione preventiva attraverso diversi meccanismi d'azione. Fanno parte di questa categoria composti con azione antiossidante, antinfiammatoria, antimicrobica, antivirale e anti-proliferativa, composti che fungono da modulatori enzimatici e composti immunostimolanti.

I risultati sperimentali ottenuti dagli studi effettuati finora sono promettenti, per questo motivo la ricerca di sostanze bioattive è particolarmente intensa soprattutto nel mondo vegetale.

1.2.1 Antiossidanti

Gli antiossidanti sono in grado di esercitare un'importante azione preventiva contro lo stress ossidativo, causa principale di danno cellulare, per questo negli ultimi 20 anni hanno guadagnato importanza sia nell'industria alimentare che nell'industria farmaceutica (Barla et al, 2007).

Ogni organismo vivente evoluto ha sviluppato diverse strategie di difesa per impedire il danno cellulare causato dalle diverse specie chimiche reattive

(SCR) prodotte durante il metabolismo, tra cui troviamo le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e le specie reattive dell'azoto (RNS).

Fanno parte delle ROS l'anione superossido (O_2^-), il perossido di idrogeno (H_2O_2), e il radicale idrossilico (OH^\cdot), la specie ROS più reattiva. Fanno invece parte delle RNS l'ossido nitrico (NO) e il perossinitrito ($ONOO^-$).

Gli antiossidanti appartengono ad un gruppo eterogeneo di composti in grado di prevenire o addirittura annullare l'azione dannosa delle SCR (Cotgreave et al, 1988; Maxwell et al 1995). Secondo una prima classificazione vengono suddivisi in base alla loro origine in endogeni ed esogeni. Vengono classificati in base alla struttura chimica in antiossidanti enzimatici e non enzimatici, e in base alla loro solubilità in idrosolubili e liposolubili. Inoltre, in funzione del meccanismo d'azione che utilizzano, vengono classificati in antiossidanti preventivi, *radical scavengers*, e antiossidanti di riparazione.

Gli antiossidanti preventivi costituiscono una prima barriera difensiva specifica esplicando la loro azione attraverso l'utilizzo di diversi meccanismi. Un meccanismo d'azione preventivo consiste nella chelazione dei metalli di transizione, come nel caso della transferrina. Altri antiossidanti, come i carotenoidi, esplicano la loro azione preventiva attraverso un meccanismo di *quencing* delle specie reattive dell'ossigeno. Enzimi come la catalasi e la perossidasi invece svolgono la loro azione inattivando il perossido di idrogeno. Tutti i meccanismi appena illustrati hanno come fine ultimo quello di inibire l'innesco delle reazioni radicaliche da cui hanno origine i radicali liberi.

I radicali liberi sono molecole altamente reattive e instabili a causa della presenza di uno o più elettroni spaiati, essendo fortemente instabili tendono a reagire con altre molecole più stabili, trasformandole in radicali e scatenando reazioni a catena deleterie per la cellula. In condizioni fisiologiche le cellule producono piccole quantità di radicali liberi che vengono inattivati da sistemi enzimatici o da altri composti antiossidanti. Quando la concentrazione di radicali liberi è troppo alta la cellula va incontro a stress ossidativo, in questa condizione i meccanismi di difesa non sono più in grado di neutralizzare le molecole radicaliche che reagendo con le strutture cellulari (membrane, DNA, proteine) causano danno cellulare.

Lo stress ossidativo è un processo implicato nell'insorgenza di malattie come il cancro, l'invecchiamento precoce e le malattie neurodegenerative (Lee et al, 2010).

I *radical-scavengers* (spazzini di radicali) costituiscono una seconda barriera difensiva aspecifica atta a rinforzare la barriera difensiva specifica esercitata dagli antiossidanti preventivi. Fanno parte di questo gruppo composti con caratteristiche eterogenee che sono in grado di inattivare le specie radicaliche causando il decremento della loro concentrazione, presentando quindi un'azione antiradicalica.

Gli antiossidanti di riparazione invece comprendono gli enzimi che intervengono solo in seguito alla comparsa del danno cellulare, costituendo la terza barriera difensiva. Fanno parte di questo gruppo di enzimi le idrolasi (glicosidasi, lipasi, proteasi), le transferasi e le polimerasi.

Gli studi effettuati finora hanno dimostrato la presenza di svariati composti antiossidanti in diverse piante che producono lattice, come per esempio in *Ficus indica* (Oliveira et al, 2010), e nel lattice di molte piante appartenenti alla famiglia delle *Euphorbiaceae*, come l'*Hevea brasiliensis*, e molte specie di *Euphorbia* (Shi et al, 2008).

I composti *radical scavengers*, i polifenoli e i flavonoidi sono gli antiossidanti più studiati nelle piante.

Come detto in precedenza il gruppo dei *radical scavenger* è estremamente eterogeneo, fanno parte di questo gruppo l'acido urico (Kang et al, 2014), l'ubichinone (Zhang et al, 2013), acido lipoico (Castañeda et al, 2014), l'acido ferulico (Shahwar et al, 2009), la vitamina E (Niki et al, 2014), e l'acido ascorbico (Sato et al, 2015) (Figura 4).

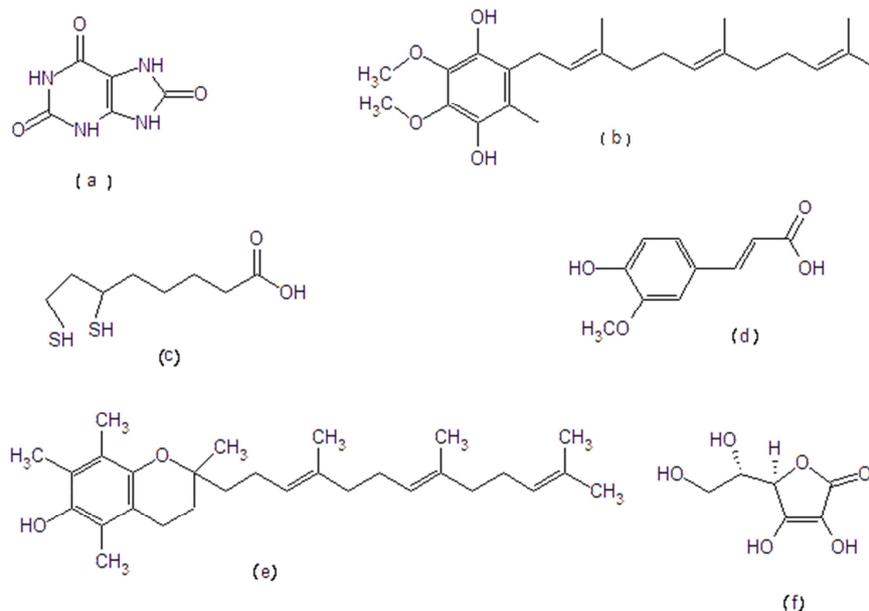


Figura 4. a) Acido urico. b) Ubichinone. c) Acido lipoico. d) Acido ferulico. e) Vitamina E. f) Acido ascorbico.

I polifenoli rappresentano invece il più grande gruppo di composti fitochimici che recentemente hanno dimostrato un ruolo chiave nella prevenzione di disturbi degenerativi come cancro, malattie cardiovascolari, e malattie neurodegenerative (Tsao et al, 2010; Lee et al, 2010). Presentano una forte azione antiossidante preventiva contro lo stress ossidativo causato dalle ROS (Tsao et al, 2010).

Attualmente conosciamo circa 8000 molecole che presentano una struttura polifenolica; 4000 sono composti flavonoidi, un gruppo di molecole che presentano caratteristiche strutturali fenoliche.

Troviamo alte concentrazioni di polifenoli nella frutta, nei vegetali, e in altri prodotti alimentari come il tè, il cioccolato e il vino.

I polifenoli vengono classificati in acidi fenolici, flavonoidi e amidi polifenolici.

Gli acidi fenolici sono diffusi nei cereali (Tsao et al, 2010; Chandrasekara et al 2010) si dividono in derivati dell'acido benzoico come l'acido vanillico e l'acido gallico (Figura 5), e in derivati dell'acido cinnamico come l'acido *p*-cumarico, l'acido caffeico, l'acido ferulico e l'acido sinapico (Figura 5).

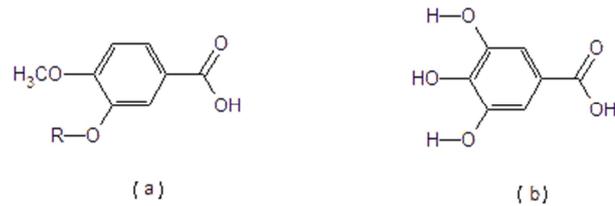


Figura 5. (a) Acido vanillico. (b) Acido gallico.

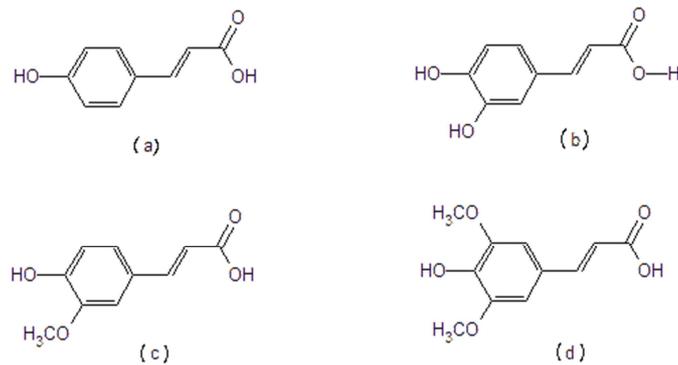


Figura 6. (a) Acido-*p*-cumarico. (b) Acido caffeico. (c) Acido ferulico. (d) Acido sinapico.

La classe di composti fenolici più vasta è rappresentata dai flavonoidi, composti idrosolubili generalmente presenti sotto forma di glicosidi. Il precursore dei composti flavonoidi è formato da due anelli aromatici (anello A e anello B) collegati tra loro da un anello cromonico (anello C) (Figura 7) (Tsao et al, 2010).

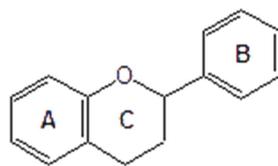


Figura 7. Struttura del precursore di un generico flavonoide.

Grazie alle modificazioni e allo stato di ossidazione dell'anello C è possibile suddividere i flavonoidi in diversi sottogruppi:

- isoflavoni, neoflavonoidi e calconi
- flavoni, flavonoli, flavononi e flavononoli
- flavanoli e proantocianine
- antocianidine

Gli isoflavoni sono largamente distribuiti in diverse piante appartenenti alla famiglia delle leguminose. La genisteina e la daidzeina sono gli isoflavoni più diffusi (Figura 8) (Wang et al, 1994; Mazur et al, 1998).

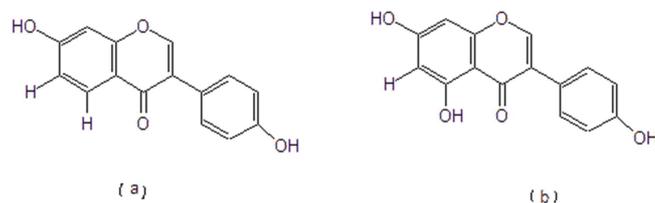


Figura 8. Isoflavoni distribuiti nella famiglia delle leguminose. (a) Daidzeina. (b) Genisteina.

I neoflavonoidi non sono largamente distribuiti nelle piante ad uso alimentare. Un composto neoflavonoide largamente distribuito nel regno vegetale è la dalbergina, (Garazd et al, 2003) (Figura 9).

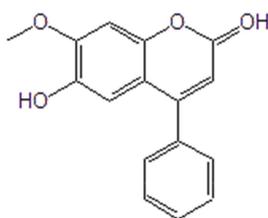


Figura 9. Dalbergina, neoflavone largamente distribuito nel regno vegetale.

I composti appartenenti al sottogruppo dei calconi invece si trovano in frutti come le mele (Tsao et al, 2003), nel luppolo e nella birra (Zhao et al, 2005) (Figura 10).

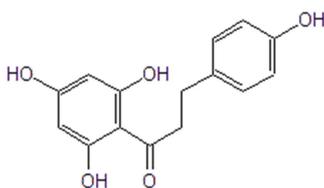


Figura 10. Floretina, composto appartenente al sottogruppo dei calconi.

I flavoni, i flavonoli, i flavononi e i flavononoli sono dei composti flavonoidi ubiquitari nel regno vegetale. I flavoni e i flavonoli rappresentano il più grande sottogruppo di composti polifenolici (Figura 11). I flavonoli sono i derivati 3-idrossi dei flavoni. Il più comune flavonolo è la quercetina (Tsao et al, 2010).

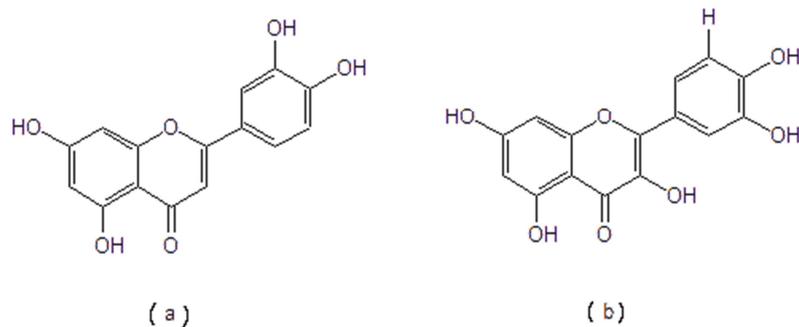


Figura 11. (a) Luteolina (flavone). (b) Quercetina (flavonolo).

I flavononoli invece sono i derivati 3-idrossi dei flavononi. La taxifolina presente negli agrumi è il flavononolo più diffuso nelle specie vegetali (Figura 12) (Grayer et al, 2006; Kawaii et al, 1999).

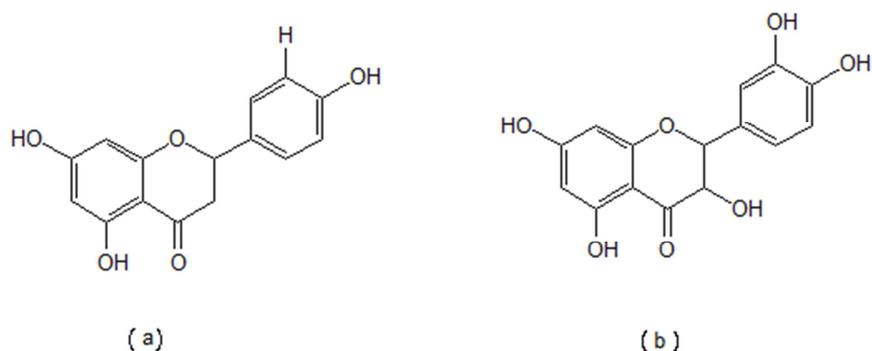


Figura 12. (a) Naringenina (flavonone). (b) Taxifolina (flavononolo).

I flavanoli invece vengono comunemente chiamati catechine e si trovano spesso nelle piante ad uso alimentare come l'uva, le mele, i mirtilli, le foglie di tè e le fave di cacao (Figura 13) (Si et al, 2006; Prior et al, 2001).

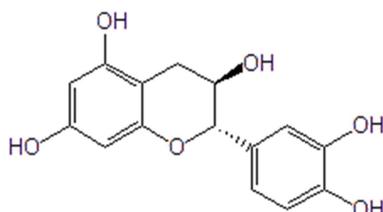


Figura 13. Catechina.

Le proantocianidine presentano un forte potere antiossidante, sono derivati delle catechine, hanno infatti origine dalla condensazione di più molecole di catechina (Tsao et al, 2010) (Figura 14).

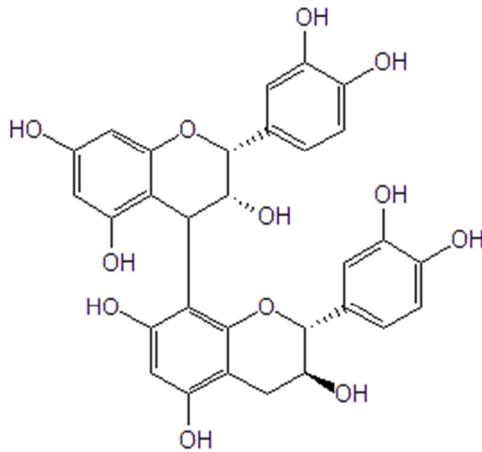


Figura 14. Procianidina B1 molecola appartenente al sottogruppo delle proantocianidine.

Le antocianidine sono i principali costituenti dei pigmenti rossi, blu e viola presenti nei fiori, nei frutti, nei vegetali e in certe varietà di grano (Figura 15) (Tsao et al, 2010).

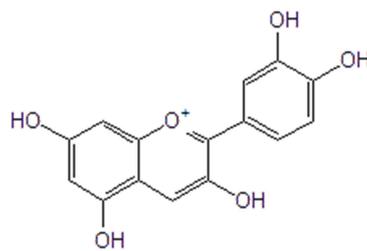


Figura 15. Cianidina, molecola appartenente al sottogruppo delle antocianidine.

Gli amidi polifenolici sono largamente distribuiti nei vegetali ad uso alimentare, comprendono i composti capsaicinoidi presenti nei peperoncini piccanti (Davis et al, 2007) e i composti avenantramidi presenti nell'avena (Bratt et al, 2003).

Tra i capsaicinoidi troviamo la capsaicina che presenta un forte potere antiossidante e antinfiammatorio (Figura 16).

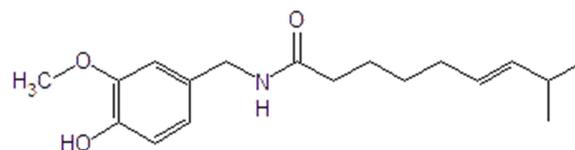


Figura 16. Capsaicina.

I composti avenantramidi invece sono coinvolti nell'inibizione dell'ossidazione delle lipoproteine LDL (Figura 17).

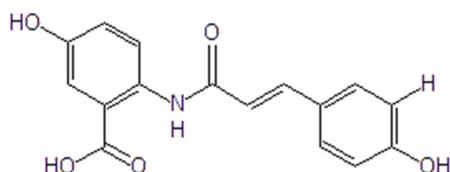


Figura 17. Avenantramide A.

Esistono poi dei composti polifenolici non flavonoidi largamente distribuiti nel regno vegetale. Fanno parte di questo sottogruppo composti come il resveratrolo presente nell'uva e nel vino, l'acido ellagico e i suoi derivati presenti nei frutti di bosco e sulla pelle di diverse noci, il matairesinolo presenti nel lino, nel sesamo, nel grano e in diversi frutti, e la curcumina un potente antiossidante presente nelle piante del genere *Curcuma* (Figura 18) (Tsao et al, 2010).

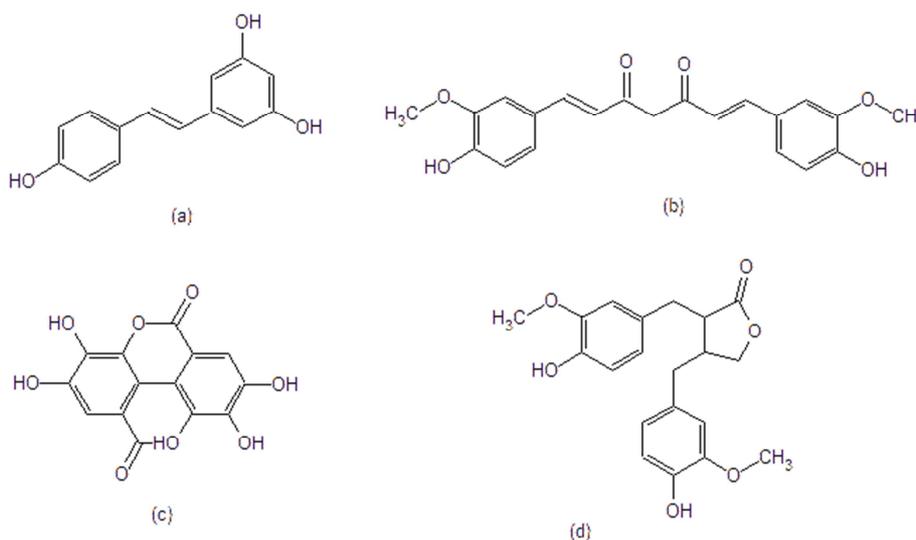


Figura 18. Composti fenolici non flavonoidi largamente distribuiti nelle piante ad uso alimentare. (a) Resveratrolo. (b) Curcumina (c) Acido ellagico. (d) Matairesinolo.

Nelle piante appartenenti al genere *Euphorbia* sono stati isolati composti antiossidanti che comprendono diversi flavonoidi (Yvette Fofie., 2015, Shi et al, 2008), derivati della quercetina e del campferolo (Song. et al, 2014), e composti polifenolici come l'acido gallico, il metil gallato, l'avicularina, l'astragalina, la juglanina, l'isoquercetina-6"-gallato, l'astragalina-6"-gallato, l'acido ellagico, l'acido 3,3'-dimetossiellagico, acido 3,3'-di-O-

metil-4-(β -D-xilopiranosilellagico (Nugroho et al, 2014; Gu. et al, 2013), esteri dell'acido ferulico (Ruan et al, 2007), e la rutina (Tsumbu et al, 2012).

Tra i *radical scavenger* isolati finora da piante appartenenti alla famiglia delle *Euphorbiaceae* troviamo alcuni composti polifenolici come l'acido ellagico, l'astragalina-6"-gallato, l'isoquercetina-6"-gallato (Nugroho et al, 2014), acido *p*-cumarico, acido caffeico, acido ferulico (Chakravartula et al, 2007), e acido vanillico (Zhang et al, 2006), galattosidi e glucosidi (Yu et al, 2006), cerebrosidi, e altri metaboliti lipidici come il diacilmonogalattosilglicerolo, il digalattosildiacylglicerolo e il glucoclonasterolo (Cateni. et al, 2014).

1.2.2 Composti inibitori della acetilcolinesterasi

L'acetilcolinesterasi (AChE), enzima appartenente alla classe enzimatica delle colinesterasi, partecipa al processo di trasmissione colinergica rivestendo un ruolo chiave durante il processo di interruzione dell'impulso nervoso colinergico in quanto capace di idrolizzare l'acetilcolina (ACh) in acetato e colina, causando la diminuzione dei livelli sinaptici del neurotrasmettitore.

Diversi studi hanno dimostrato che esiste una forte correlazione tra i livelli di ACh a livello sinaptico e il decorso di molte malattie neurodegenerative tra cui la malattia d'Alzheimer (Ingkaninan et al, 2003). Gli inibitori della AChE rivestono quindi un ruolo importante inibendo il meccanismo di interruzione del segnale colinergico favorendo l'aumento della concentrazione di ACh a livello sinaptico (Onor et al, 2007), e favorendo un rallentamento del decorso della malattia.

Dagli studi effettuati è emerso che l'utilizzo degli inibitori della AChE come coadiuvanti del trattamento farmacologico permette un miglioramento dei sintomi della malattia di Alzheimer di media entità, migliorando lo stile di vita e le capacità cognitive degli individui affetti da questo disturbo (Onor et al, 2007).

Molti composti inibitori delle AChE sono stati isolati da diverse specie vegetali tra le quali troviamo *Butea superba*, *Piper nigrum*, *Piper interruptum*, *Stephania suberosa*, *Cassia fistula* (Ingkaninan. et al. 2003), molte piante appartenenti alla famiglia delle *Euphorbiaceae* come *Euphorbia antiquorum* (Pulok et al, 2007), *Acalypha indica* L, *Codiaeum variegatum*, *Euphorbia hirta*, *Euphorbia milii*, *Euphorbia neriifolia*, *Euphorbia pulcherrima*, *Jatropha infegerrima*, *Phyllanthus fraternus*, *Putranjiva roxburghii* e *Ricinus communis* (Gupta A and Gupta R, 1997).

L'AChE può essere inibita sia da composti naturali che da composti sintetici, tra gli inibitori naturali troviamo la fasciculina, una proteina con azione neurotossica presente nel veleno del serpente “*green mamba*” (Karlsson et al, 1984) e l’alcaloide tubocurarina principale costituente del curaro, mentre fungono da inibitori sintetici gli insetticidi e i gas nervini (Figura 19).

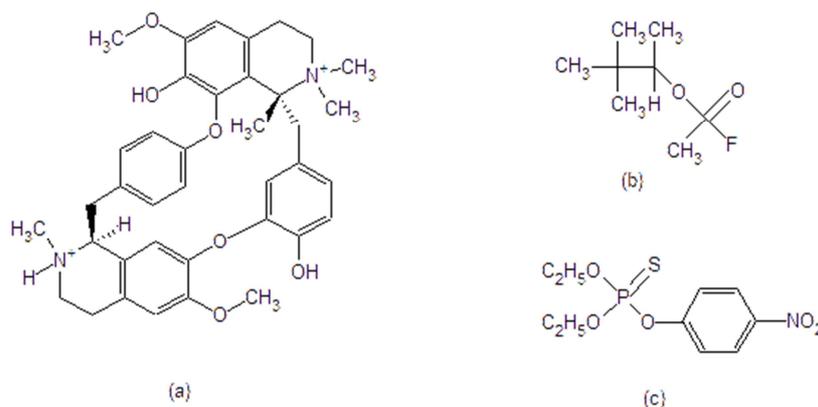


Figura 19. (a) Tubocurarina inibitore alcaloide naturale, (b) pinacolil-metilfluorofosfonato un gas nervino altamente tossico, (c) dietil 0-(4-nitrofenil)-tiofosfato un insetticida.

Un primo approccio investigativo ha permesso di ricercare e studiare gli inibitori della AChE portando alla luce diversi composti alcaloidi naturali come la fisostigmina estratta dal seme maturo secco di *Physostigma venenosum* (Zhao et al, 2004), e la galantamina estratta dai bulbi di *Galanthus woronowii* (*Amaryllidaceae*) (Maláková et al, 2007) (Figura 20).

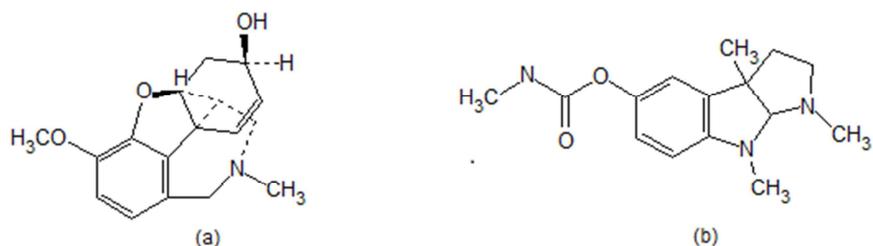


Figura 20. Formule di struttura di due inibitori della AChE. (a) Galantamina. (b) Fisostigmina.

La molecola della fisostigmina è stata utilizzata come modello per la progettazione della rivastigmina, (Figura 21) un inibitore reversibile delle AChE utilizzato per il trattamento della malattia d'Alzheimer di media entità (Mukherjee et al, 2007).

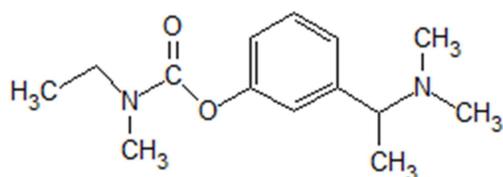


Figura 21. Rivastigmina.

Dagli studi effettuati è emerso che molti metaboliti secondari prodotti dalle piante presentano un'elevata attività inibitoria della AChE come i composti flavonoidi (Hillhouse et al, 2004), flavoni (Sawasdee et al, 2009), xantoni (Howes et al, 2003), composti polifenolici come l'acido ferulico (Durre Shahwar et al, 2010), steroidi, terpenoidi e oli (Ji & Zhang, 2008; Mukherjee et al. 2007), furanocumarine, glicosidi, composti terpeni (Mukherjee et al. 2007), cumarine di sintesi e cumarine naturali (Fallarero et al, 2008).

I composti inibitori più efficaci sono in grado di attraversare la barriera ematoencefalica come i composti alcaloidi, tra cui troviamo la galantamina, la fisostigmina, la rivastigmina (Cummings et al, 2004), e la tacrina (inibitore di sintesi) (Palmer Taylor, 2006) .

Gli inibitori della AChE oltre ad essere classificati in base all'origine in naturali e di sintesi, vengono classificati in base al tipo di interazione che sono in grado di effettuare con l'enzima.

Si dividono quindi in inibitori reversibili e inibitori irreversibili. Gli inibitori reversibili sono in grado di inibire temporaneamente l'attività acetilcolinesterasica come per esempio la fisostigmina, la galantamina, la rivastigmina, tacrina, e donepezil, mentre gli inibitori irreversibili provocano un'inibizione prolungata come gli insetticidi e i gas nervini (Palmer Taylor, 2006).

Gli inibitori reversibili possono utilizzare due diversi meccanismi d'azione. Esistono degli inibitori reversibili in grado di legarsi in maniera non covalente ai siti attivi dell'enzima, come la tacrina e il donepezil (Figura 22) (Palmer Taylor, 2006).

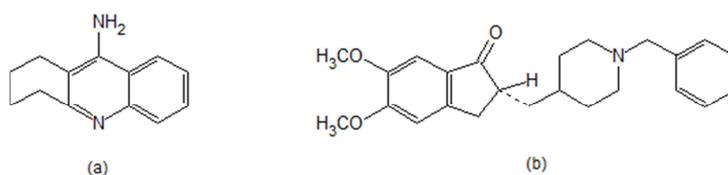


Figura 22. Composti sintetici inibitori della AChE: (a) Tacrina. (b) Donepezil.

Altri inibitori reversibili invece presentano una struttura carbamica come la fisostigmina, la neostigmina e la rivastigmina (Figura 23) (Palmer Taylor, 2006).

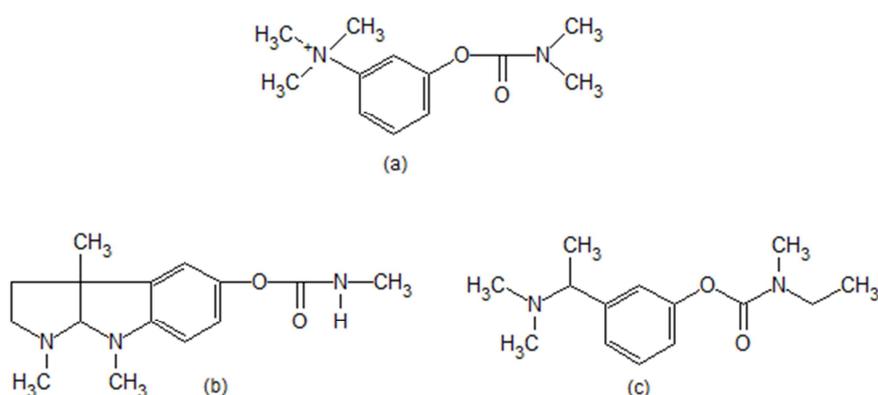


Figura 23. Composti inibitori delle AChE reversibili carbamici. (a) neostigmina. (b) fisostigmina. (c) rivastigmina.

Gli inibitori irreversibili invece presentano una struttura organofosforica come gli insetticidi e i gas nervini (Palmer Taylor, 2006).

Attualmente la ricerca mira all'identificazione e allo studio di nuovi composti inibitori facilmente isolabili che non presentino effetti collaterali, come un'elevata epatotossicità, o delle limitazioni come una bassa emivita.

Si sta cercando infatti un composto che possa avere un'alta emivita, che richieda poche dosi di somministrazione e che allo stesso tempo presenti meno effetti collaterali per il paziente.

La fisostigmina e la tacrina hanno mostrato effetti collaterali gravi come epatotossicità e una breve emivita. La galantamina invece presenta un'emivita abbastanza lunga e poche limitazioni, possiamo quindi identificarla tra gli inibitori reversibili della AChE molto efficaci. (Shahwar et al, 2009).

Nonostante esistano delle sostanze anti AChE consigliate per il trattamento farmacologico della malattia di Alzheimer di media entità come la rivastigmina, la galantamina e il donepezil (Fallarero et al, 2008), la ricerca mira all'individuazione di nuovi inibitori naturali da utilizzare come nuovo approccio terapeutico più efficace delle terapie attualmente in uso.

1.3 Gomma naturale e *cis*-preniltransferasi

La gomma naturale è un composto poliisoprenoide, un biopolimero composto da unità di *cis*-1,4-isoprene. Insieme alla cellulosa, lignina e amido, è il più abbondante biopolimero. A partire dalla fine del 19° secolo, microbiologi, biochimici e genetisti molecolari hanno studiato la struttura, la biosintesi, e la degradazione di questo polimero per migliorare la sua produzione.

La gomma naturale ad alto peso molecolare (> 1 milione Dalton), principalmente a causa della sua struttura, ha proprietà e alte prestazioni che non possono essere eguagliate dalla gomma sintetica prodotta dal petrolio. Queste proprietà includono la resilienza, l'elasticità, la resistenza all'abrasione e all'impatto, l'efficace dispersione del calore e la malleabilità a temperature fredde. Nonostante i migliori sforzi della tecnologia e

dell'industria chimica, queste proprietà non sono state raggiunte da materiali sintetici.

Esistono più di 2500 specie vegetali in grado di produrre lattice dalle quali è possibile estrarre la gomma, ma l'*Hevea brasiliensis*, una pianta appartenente alla famiglia delle *Euphorbiaceae*, rappresenta la fonte naturale più utilizzata, sia per l'alta resa di estrazione che per le proprietà fisiche della gomma stessa e dei suoi prodotti (Asawatreratanakul et al, 2003).

La sintesi della gomma avviene all'interno di particelle localizzate nel citosol dei laticiferi. La struttura delle particelle è simile in tutte le specie vegetali studiate finora, presentano un lume interno contenente la gomma circondato da una singola membrana fosfolipidica (Cornish, 2001) a cui sono associate diverse proteine tra cui una deputata alla sintesi della gomma.

La dimensione media delle particelle varia notevolmente nelle diverse specie, si può quindi definire specie-specifica. In *Ficus benjamina* presentano un diametro compreso tra 0.34 μm e 9.36 μm , mentre le particelle di *Euphorbia amigdaloides*, *Euphorbia myrsinites* presentano un diametro compreso tra 0.1 μm e 0.3-0.51 μm (Bauer et al, 2014). Da recenti studi è emerso che le particelle di *E. characias* presentano un diametro compreso tra 0.02 μm e 1.2 μm (Spanò et al, 2015).

L'enzima coinvolto nella sintesi della gomma naturale fa parte della classe enzimatica delle transferasi, sottoclasse delle preniltransferasi. Le preniltransferasi, in base alla geometria del polimero isoprenico che sintetizzano vengono classificate in *trans*-preniltransferasi e *cis*-preniltransferasi (Ogura & Koyama, 1998; Wang & Ohnuma, 2000) (Figura 24).

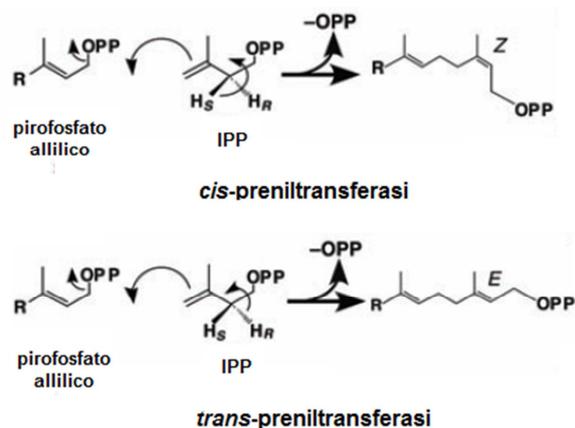


Figura 24. Prodotti poliisoprenici della *cis*-preniltransferasi e della *trans*-preniltransferasi.

Mentre il meccanismo d'azione delle *trans*-preniltransferasi è stato da tempo chiarito, il meccanismo d'azione delle *cis*-preniltransferasi è ancora oggetto di studio (Kharel et al, 2001).

È noto da letteratura che le *cis*-preniltransferasi e le *trans*-preniltransferasi oltre che differire per la configurazione del poliisoprene, si differenziano sia per la struttura primaria che per la struttura tridimensionale (Kharel & Koyama, 2005; Fujihashi, 2001).

Le *cis*-preniltransferasi sono coinvolte nel processo di sintesi della gomma naturale, il *cis*-1,4-poliisoprene, mentre le *trans*-preniltransferasi sono coinvolte nella sintesi di composti isoprenici.

Esistono due modelli che descrivono il meccanismo di sintesi della gomma, il primo modello ipotizza che la transferasi sia solubile nel citosol e si associ alla membrana temporaneamente durante la catalisi, il modello alternativo invece ipotizza che la transferasi sia integrata nella membrana della particella della gomma. Gli studi effettuati sinora hanno dimostrato che il meccanismo di sintesi della gomma è compatibile con il secondo modello illustrato (Cornish K., 2001).

La sintesi della gomma consiste nella reazione di condensazione sequenziale di molecole di isopentenil pirofosfato (IPP) a partire da un pirofosfato allilico iniziatore. Fungono da iniziatori diversi pirofosfati allilici come il

dimetilallil-pirofosfato (DMAPP), geranyl-pirofosfato (GPP) e il farnesil-pirofosfato (FPP) (Figura 25).

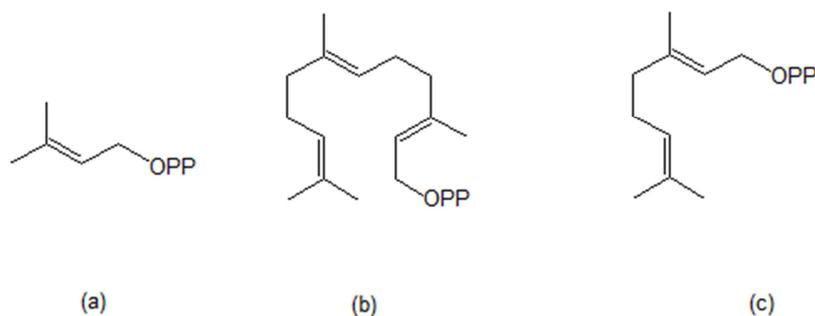


Figura 25. Formula di struttura di diversi pirofosfati allilici. (a) DMAPP. (b) FPP. (c) GPP.

I pirofosfati allilici, essenziali per la sintesi della gomma, vengono sintetizzati nel citosol ad opera di *trans*-preniltransferasi solubili non associate alla membrana, e ad opera di una IPP isomerasi (Asawatreratanakul et al, 2003).

L'IPP viene prodotto a partire dalla via metabolica del mevalonato che avviene nel citosol, e a partire dalla via del deossixilulosio che avviene invece nei plastidi (Figura 26).

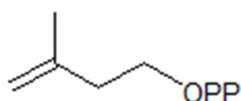


Figura 26. Formula di struttura dell'isopentenil pirofosfato (IPP) substrato della *cis*-preniltransferasi.

La gomma viene sintetizzata a partire da una molecola di pirofosfato allilico, che funge da iniziatore, attivando la reazione di polimerizzazione tramite la formazione di un catione allilico. Da questa reazione ha origine un polimero formato da unità monomeriche di *cis*-1,4-isoprene in seguito ad una condensazione sequenziale di molecole non alliliche di IPP, in presenza di cationi Mg^{2+} che fungono da cofattori enzimatici. La transferasi può usare diversi iniziatori allilici (DMAPP, GPP, FPP) ma utilizza un'unica fonte di unità isopenteniliche (IPP) per avviare la polimerizzazione. L'iniziatore

infatti si lega al sito di legame presente sulla transferasi attivando l'incorporazione delle molecole di IPP (Cornish, 2001).

Grazie all'analisi molecolare della sequenza nucleotidica di *cis*-preniltransferasi in diverse specie vegetali sono state identificate cinque regioni della sequenza nucleotidica altamente conservate.

Le regioni conservate vengono chiamate rispettivamente: regione I, regione II, regione III, regione IV e regione V (Apfel et al, 1999; Asawatreratanakul et al, 2003).

Tutte queste regioni giocano un ruolo importante per l'attività catalitica dell'enzima, sono tutte coinvolte nel legame con l'IPP, la regione II influenza la specificità dell'enzima per il substrato e per il prodotto della reazione, le regioni III e V sono inoltre coinvolte nel legame con il pirofosfato allilico (Kang et al, 2014; Fujikura Et al, 2003; Kharel. et al, 2001; Pan et al, 2000).

È stata studiata la gomma di diverse specie vegetali, e dagli studi effettuati è emerso che piante diverse producono gomme naturali che presentano dimensioni molecolari variabili.

Il peso molecolare della gomma è probabilmente influenzato dalla concentrazione dei substrati, soprattutto del pirofosfato allilico. Maggiore è la concentrazione dell'iniziatore minore sarà il peso molecolare del polimero, è stato infatti ipotizzato che le molecole di pirofosfato allilico libere possano competere con l'iniziatore allilico, causando l'allontanamento del polimero dall'enzima e innescando una nuova iniziazione. Questa competizione spiegherebbe quindi l'accorciamento del polimero (Cornish, 2001).

La gomma che si ottiene dalle piante appartenenti alla specie *Hevea brasiliensis* è una gomma ad alto peso molecolare, di alta qualità che presenta proprietà come l'elevata elasticità, resilienza, dispersione termica e resistenza abrasiva, caratteristiche che rendono questa gomma facilmente commercializzabile. (Cornish, 2001). Il proteoma del lattice di *H.brasiliensis* è stato largamente studiato, e dagli studi effettuati è emersa la presenza di proteine in grado di causare reazioni allergiche.

La ricerca quindi è rivolta ad identificare nuove fonti naturali di gomma di alta qualità con ridotte proprietà allergeniche che possano sostituire a livello commerciale la gomma dell'*Hevea brasiliensis* (Spanò et al, 2012).

Dal *Parthenium argentatum* (Cornish et al, 1999; Cornish, 2001) è stata estratta una gomma ad alto peso molecolare paragonabile in termini di qualità con quella dell'*H.brasiliensis*, proposta come fonte alternativa commerciale di lattice anallergico.

Oltre al *Parthenium argentatum* altre piante come *Taraxacum kok-saghyz*, *Scorzonera tau-saghyz*, *Scorzonera uzbekistanica* (Buranov et al, 2010), *Ficus benghalensis* (Kang et al, 2000), *Lactuca seriola e Lactuca sativa* (Bushman et al, 2006) producono una gomma naturale ad alto peso molecolare.

Heliantus annuus (Pearson, et al, 2010) *Ficus elastica* (Cornish, 2001), *Ficus carica* (Kang, 2000), *Euphorbia lactiflua* (Gnecco et al, 1997), *Euphorbia etherophylla* (Makkriengkrai et al, 2004) producono invece gomme a basso peso molecolare. Queste piante non possono essere considerate delle fonti alternative di gomma naturale in quanto le gomme a basso peso molecolare non sono utilizzabili per applicazioni ad alte prestazioni come le gomme che vengono estratte dall' *H. brasiliensis* e dal *P. argentatum*. Nonostante ciò presentano un'applicazione pratica, infatti possono essere impiegate per la sintesi di polimeri derivati della gomma naturale (Gnecco et al, 1997). In letteratura è riportato che la gomma a basso peso molecolare può essere utilizzata per la sintesi di derivati epossidati, i quali grazie alla loro composizione e alle loro caratteristiche fisiche presentano una maggiore resistenza alle abrasioni (Spanò et al, 2012).

Oltre alle dimensioni molecolari è molto importante la resa in gomma che si può ottenere dalla pianta, che si pensa sia correlata al numero di laticiferi presenti all'interno del fusto, maggiore è il numero di laticiferi maggiore sarà la resa in gomma (Hagel et al, 2008).

2. Obiettivi del lavoro di tesi

Il lattice prodotto dalle piante di varie famiglie, e tra queste quella delle *Euphorbiaceae*, ha una composizione estremamente eterogenea che include alcaloidi, terpenoidi, resine, gomme, amido, olii, diversi metaboliti secondari e varie proteine. L'identificazione delle componenti del lattice è necessaria per l'individuazione dei possibili ruoli fisiologici di questo materiale e per la comprensione della fisiologia dell'organismo vegetale.

L'*E. characias* è stata selezionata dal nostro gruppo di ricerca come pianta modello per lo studio della complessità del lattice. Gli studi effettuati finora erano rivolti alla componente proteica, in particolare a proteine enzimatiche che sono state caratterizzate dal punto di vista cinetico e molecolare. L'obiettivo di questo studio invece è rivolto prevalentemente alla ricerca di componenti non proteiche.

Proseguendo quindi nello studio della caratterizzazione del lattice di *E. characias*, sono state considerate due linee di ricerca, la prima rivolta all'identificazione di sostanze bioattive come composti *scavenger* di radicali, polifenoli, flavonoidi e inibitori della acetilcolinesterasi, la seconda linea rivolta all'estrazione, purificazione e caratterizzazione della gomma naturale dal lattice a cui è seguita la caratterizzazione molecolare del gene codificante per la *cis*-preniltransferasi, l'enzima principale implicato nella sintesi della gomma.

3. MATERIALI E METODI

Le piante rappresentano una fonte naturale di sostanze bioattive per questo sono state largamente studiate negli ultimi tempi. Per caratterizzare le sostanze bioattive vegetali è necessario però estrarle a partire dal materiale vegetale (radici, fusto, foglie, fiori, lattice). Il materiale da utilizzare per l'estrazione deve essere sminuzzato meccanicamente nel caso in cui sia di natura solida, se è invece liquido, come il lattice, può essere utilizzato direttamente.

Il materiale vegetale di partenza può essere trattato utilizzando dei metodi estrattivi che coinvolgono l'utilizzo di solventi organici come ad esempio metanolo (MetOH), etanolo (EtOH), cloroformio e metanolo, etere di petrolio e metanolo (PE/MetOH).

Generalmente il materiale vegetale viene lasciato in agitazione per un determinato periodo di tempo. Una volta terminata l'incubazione l'estratto viene centrifugato per recuperare la frazione solubile, che verrà in seguito utilizzata per saggiare un'eventuale attività biologica.

Le sostanze bioattive più studiate negli ultimi tempi per la loro importante applicazione nel campo farmacologico sono i composti antiossidanti e i composti inibitori delle acetilcolinesterasi.

I saggi spettrofotometrici più utilizzati per lo studio dei composti antiossidanti sono quelli basati sullo *scavenging* radicalico che comprendono i saggi dell'acido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonico) (ABTS^{•+}) e dell'acido 2,2'-difenile-1-picrilidrozile (DPPH[•]), i metodi per la determinazione del contenuto totale di polifenoli che comprendono il saggio del Folin-Ciocalteu e il metodo enzimatico, e i metodi per la determinazione del contenuto totale di flavonoidi tra cui il metodo del nitrato di alluminio. Per determinare l'inibizione dell'attività enzimatica delle AChE invece viene utilizzato il saggio di Ellman.

3.1 Metodi basati sullo scavenging radicalico

Per la determinazione dello scavenging radicalico vengono utilizzati due saggi spettrofotometrici che sfruttano la capacità degli antiossidanti, intrinseci agli estratti di interesse, di cedere elettroni ai radicali standard presenti in soluzione. Questi due metodi utilizzano come radicale standard il radicale dell'acido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonico) (**ABTS^{•+}**) o il radicale dell'acido 2,2'-difenile-1-picrilidrozile (**DPPH[•]**).

Per entrambi i metodi è necessario costruire una curva standard di riferimento, utilizzando il trolox come composto antiradicalico standard.

3.1.1 Saggio dell'ABTS.

Questo metodo (Re R. et al, 1999) è basato sulla capacità degli antiossidanti presenti negli estratti di cedere un idrogeno o un elettrone ai radicali **ABTS^{•+}** presenti in soluzione.

Per ottenere il catione radicalico ABTS si prepara una soluzione di ABTS ridotto che viene fatta reagire con potassio persolfato, la soluzione così ottenuta viene incubata 24 ore a temperatura ambiente e al buio prima dell'utilizzo (Figura 28).

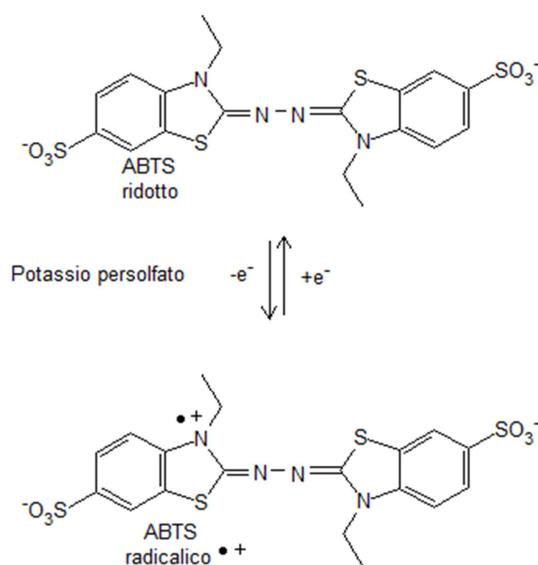


Figura 28. Reazione di ossidazione dell'ABTS in presenza di potassio persolfato.

L'ABTS radicalico presenta 3 picchi di assorbimento caratteristici tra cui un assorbimento massimo a 734 nm, che viene considerato per il saggio.

In presenza di composti *scavenger* la soluzione di ABTS radicalico si decolora. La decolorazione della soluzione di partenza è accompagnata da un decremento dell'assorbanza a 734 nm, indice dell'incremento dell'ABTS ridotto e della scomparsa delle specie radicaliche in soluzione (Figura 29).

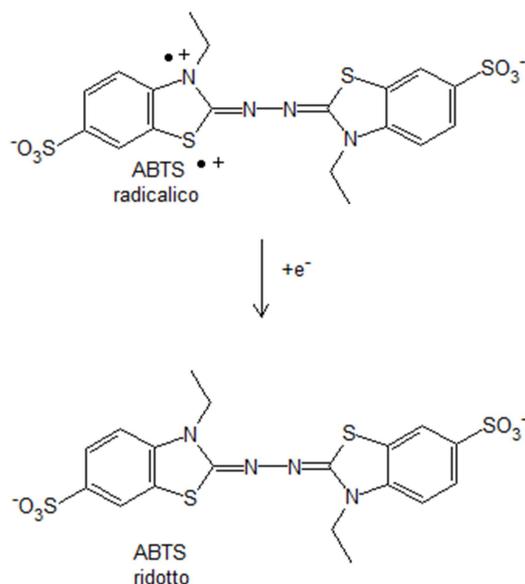


Figura 29. Reazione di riduzione del catione radicalico ABTS.

Il decremento dell'assorbanza a 734 nm in relazione al controllo viene utilizzato per calcolare l'attività antiossidante espressa come equivalenti di potere antiossidante di TROLOX, un antiossidante standard (Figura 30).

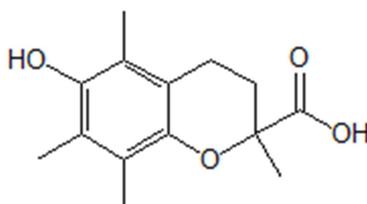


Figura 30. Acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcromone-2-carbossilico (TROLOX).

3.2.1 Metodo di Folin-Ciocalteu

Il saggio di Folin-Ciocalteu (FC) sfrutta la capacità del reattivo di FC di reagire con i fenoli presenti negli estratti vegetali di interesse. In ambiente basico si ha la deprotonazione dell'anello fenolico con formazione dell'anione fenolato, ione in grado di ridurre il FC che, una volta ridotto, presenta un picco di assorbimento a 750 nm (Figura 32).

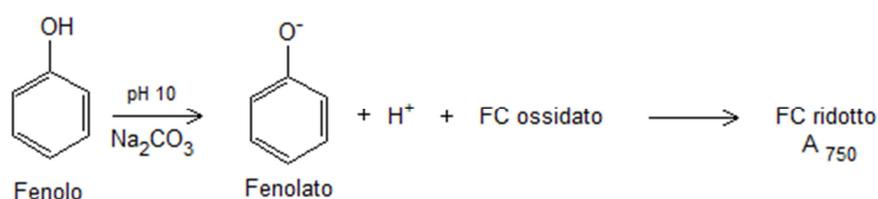


Figura 32. Reazione di riduzione del reattivo di Folin-Ciocalteu in presenza di composti fenolici.

L'incremento dell'assorbanza a 750 nm è quindi una conseguenza della presenza di composti fenolici negli estratti di interesse. La concentrazione di polifenoli viene poi espressa come equivalenti di acido gallico (GAE mM) (Figura 33).

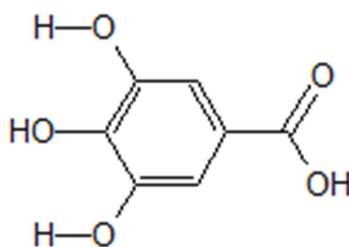


Figura 33. Acido Gallico.

3.2.2 Metodo enzimatico

Il metodo enzimatico sfrutta invece la reazione enzimatica della perossidasi da rafano (HRP).

L'HRP in presenza di H_2O_2 reagisce con il fenolo presente nel campione di interesse causando la formazione di un radicale fenossido che a sua volta reagisce con la 4-amminoantipirina formando così un chinone imminico, complesso cromoforo con picco di assorbimento a 500 nm (Figura 34).

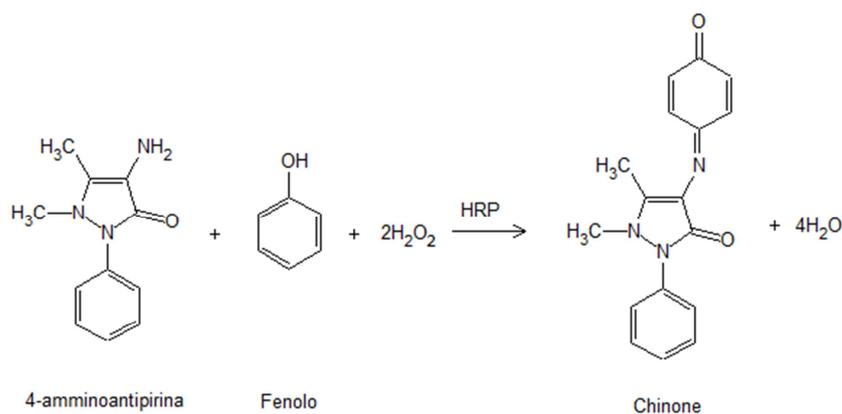


Figura 34. Formazione del chinone in seguito alla reazione dell'HRP in presenza di composti fenolici.

Anche in questo caso l'incremento dell'assorbanza a 500 nm indica la presenza di composti fenolici negli estratti di interesse. La concentrazione di polifenoli viene espressa come equivalenti di acido gallico (GAE mM).

3.3 Determinazione del contenuto totale di flavonoidi

Per determinare il contenuto totale in flavonoidi nei vari estratti viene utilizzato il metodo del nitrato d'alluminio (Moreno M.I.N. et al, 2000).

Questo metodo sfrutta la capacità del nitrato d'alluminio di formare dei complessi cromofori con i flavonoidi presenti all'interno del campione d'interesse, permettendo di distinguerli dagli altri composti polifenolici.

I complessi cromofori presentano un picco d'assorbimento a 415 nm, un incremento dell'assorbanza indica quindi la presenza di composti flavonoidi negli estratti considerati. La concentrazione di flavonoidi viene determinata usando una curva standard di riferimento costruita utilizzando un flavonoide

standard, la quercetina (Figura 35). Il contenuto totale di flavonoidi viene quindi espresso come equivalenti di quercetina (QE mM).

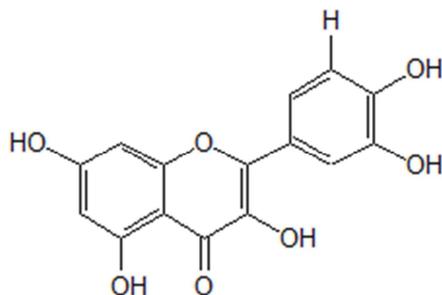


Figura 35. Quercetina.

3.4 Determinazione degli inibitori della acetilcolinesterasi.

Per determinare un'eventuale inibizione dell'attività enzimatica delle AChE viene utilizzato il saggio di Ellman (Rhee I.K. et al, 2001) che sfrutta la reazione dell'AChE in presenza di acetiltiocolina ioduro (ATCI) e acido 5,5'-ditiobis-(2,2'-dinitrobenzoico) (DTNB).

L'ATCI viene riconosciuta e idrolizzata dall'AChE per formare tiocolina e acetato, la tiocolina presenta un gruppo SH che riduce il DTNB, si ha la liberazione di un nitrobenzoato che presenta un picco di assorbimento a 405 nm (Figura 36). Se negli estratti da saggiare sono presenti composti con attività inibitoria delle AChE si noterà un decremento dell'assorbanza a 405 nm che verrà utilizzato per calcolare la percentuale di inibizione dell'attività.

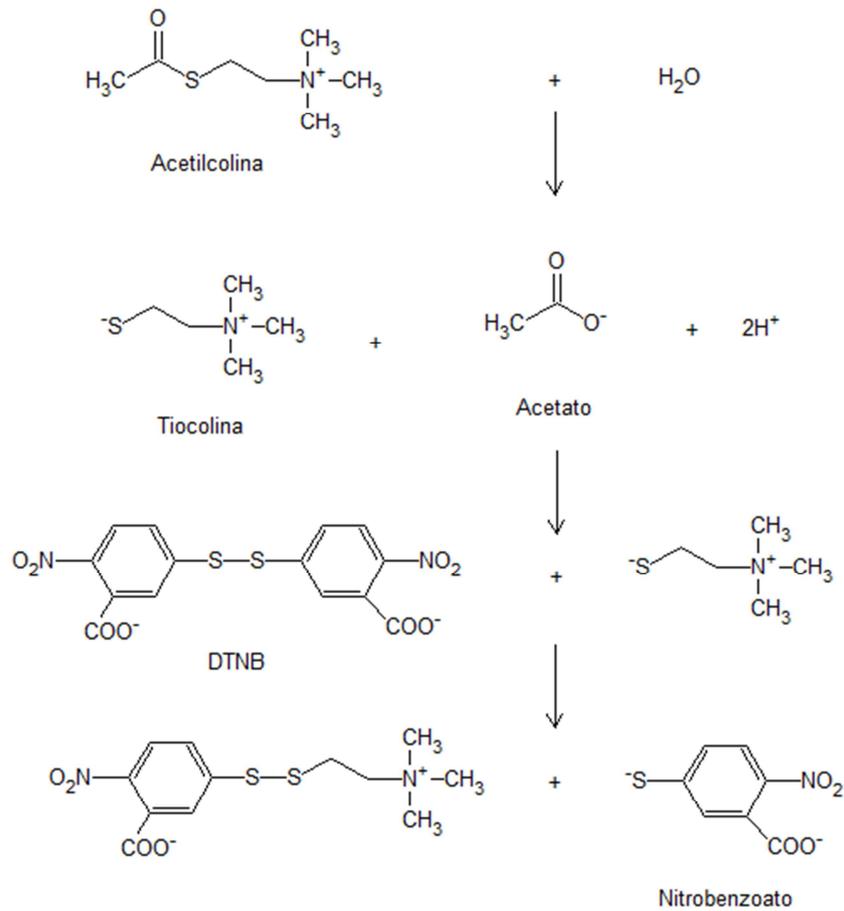


Figura 36. Formazione del nitrobenzoato in seguito alla reazione di idrolisi dell'acetiltiocolina.

Viene poi calcolata l'IC₅₀, cioè la quantità di estratto necessaria per inibire il 50% dell'attività acetilcolinesterasica, comparando la percentuale di inibizione del campione di interesse con una retta standard costruita con concentrazioni crescenti di inibitore standard, la galantamina (Figura 37).

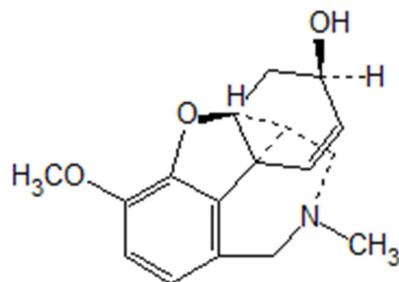


Figura 37. Galantamina.

3.5 Gas cromatografia-spettrofotometria di massa (GC-MS)

La gas cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS) è una tecnica analitica che permette di effettuare una determinazione sia qualitativa che quantitativa di composti organici in campioni gassosi, liquidi o solidi.

I campioni liquidi e solidi prima di essere analizzati devono subire un trattamento che varia in base al tipo di analita, possono essere necessari degli stadi di estrazione, idrolisi e derivatizzazione.

Il gascromatografo presenta una sorgente di gas carrier, un iniettore, una colonna capillare, un rivelatore e un registratore. Il campione viene iniettato attraverso un iniettore all'interno di un sistema gas cromatografico che presenta una colonna capillare attraversata da un flusso di gas inerte che funge da carrier (elio, azoto, idrogeno, argon). Il gas carrier deve presentare un buon grado di purezza, scarsa reattività con la fase stazionaria e deve essere in grado di favorire la separazione del campione.

La siringa dell'iniettore penetra un setto per iniettare il campione all'interno di una camera di vaporizzazione dove il campione viene evaporato, di solito ad una temperatura di 280 °C. Il gas carrier che entra dal sistema di iniezione trasporta il campione verso la colonna capillare.

La colonna capillare gascromatografica generalmente è formata da un tubo di vetro o di metallo con diametro che varia da 0.1 a 0.5 mm, con una lunghezza di decine di metri. Sulle pareti della colonna è depositata la fase stazionaria, mentre la fase mobile è rappresentata dal gas carrier che trasporta il campione attraverso la colonna, così facendo le varie componenti si separano. Ogni componente del campione presenta un tempo di ritenzione relativo in funzione di diverse variabili come la pressione del gas carrier, il tipo di fase stazionaria, e la lunghezza della colonna. Se viene utilizzato lo stesso strumento in presenza delle stesse condizioni sperimentali i tempi di ritenzioni rimangono costanti.

Le varie componenti separate a livello della colonna capillare vengono convogliate verso il sistema di entrata dello spettrometro di massa, fino ad arrivare alla sorgente ionica che rappresenta la parte dello strumento in cui avviene la ionizzazione e la frammentazione delle molecole presenti nel campione, gli ioni così prodotti vengono separati dall'analizzatore in funzione del rapporto massa/carica (m/z) e in seguito convogliati e raccolti all'interno del rivelatore che permette l'amplificazione dei segnali ionici che vengono poi convertiti in spettro dal registratore. Ogni molecola presenta una frammentazione specifica per questo dall'analisi degli ioni è possibile identificare la molecola madre incognita.

L'analisi GC-MS ci permette di ottenere un profilo molecolare dettagliato dei vari composti organici che vengono identificati in seguito al confronto con composti standard o librerie di spettri di massa.

3.6 Estrazione, purificazione e caratterizzazione della gomma naturale

Per estrarre la gomma a partire dal lattice vengono utilizzati diverse procedure che richiedono l'utilizzo di reagenti come acetone, acido acetico, e Triton[®] X100, che causano la precipitazione del polimero in seguito a centrifugazione. Dalla centrifugazione si ottiene un surnatante contenente gran parte delle contaminanti, che viene eliminato, e un precipitato contenente la gomma grezza, che invece viene recuperato. La gomma grezza subisce un trattamento di purificazione al fine di eliminare eventuali contaminanti residue.

Un trattamento di purificazione largamente utilizzato è quello in cicloesano/etanolo. Il precipitato ottenuto da ciascun metodo estrattivo viene risospeso in cicloesano, la miscela viene centrifugata e si ottiene un surnatante corrispondente alla frazione solubile in cicloesano, e un precipitato corrispondente alla frazione insolubile. La frazione solubile che contiene la gomma viene recuperata e trattata con etanolo, mentre la frazione insolubile contenente le contaminanti viene eliminata. Aggiungendo l'etanolo alla frazione solubile in cicloesano la gomma presente in soluzione precipita.

Per ottenere una gomma con un buon grado di purezza è necessario effettuare diversi cicli del trattamento in cicloesano/etanolo.

Una volta terminati i cicli di purificazione viene effettuata l'analisi NMR per verificare il grado di purezza e la struttura polimerica del prodotto ottenuto.

Il precipitato ottenuto con il metodo estrattivo in acetone può essere purificato utilizzando un trattamento alternativo al cicloesano/etanolo che prevede l'utilizzo del benzene. Il precipitato viene risospeso in benzene e centrifugato, il surnatante ottenuto viene recuperato ed evaporato attraverso l'utilizzo di un evaporatore termostato sotto vuoto, il residuo solido che si ottiene conterrà la gomma purificata.

Per ogni metodo estrattivo è importante determinare la resa percentuale in gomma considerando la quantità di lattice di partenza.

La resa percentuale però è un dato che non fornisce informazioni accurate sul prodotto ottenuto, per questo è importante determinarne la struttura polimerica e la purezza tramite analisi NMR.

Un altro dato importante per effettuare la caratterizzazione chimica della gomma è il peso molecolare e la distribuzione dei pesi molecolari che vengono determinate tramite cromatografia di permeazione su gel (GPC).

3.6.1 Risonanza magnetica nucleare (NMR)

La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare si basa sulla perturbazione dei livelli energetici dei nuclei sotto l'effetto di un forte campo magnetico. Il nucleo di alcune specie atomiche, se inserito in un campo magnetico, è in grado di occupare diversi livelli energetici e quindi di assorbire energia nel passare dai livelli inferiori ai livelli superiori. L'insieme delle bande di assorbimento costituisce lo spettro NMR.

Durante l'analisi NMR il campione di interesse viene immerso in un campo magnetico B_0 , una certa percentuale dei nuclei presenti all'interno del campione si allineano al campo magnetico esterno (stato a bassa energia), mentre una certa percentuale si oppone ad esso (stato ad alta energia).

Se il campione viene in seguito irradiato con una radiazione elettromagnetica ad una determinata frequenza i nuclei che presentano un'orientazione parallela al campo elettromagnetico ruotano il loro spin e raggiungono uno stato ad alta energia. Si ha quindi una transizione di spin in cui i nuclei del campione sono in risonanza con la radiazione elettromagnetica applicata.

La frequenza della radiazione elettromagnetica applicata dipende dalle caratteristiche del nucleo e dalla forza del campo magnetico esterno in cui il campione è stato immerso.

Lo scopo dell'NMR è quello di ottenere informazioni inerenti alla frequenza di risonanza dei nuclei attivi presenti nel campione, come per esempio ^1H e ^{13}C . Se al nucleo viene fornita per mezzo di una radiazione elettromagnetica l'energia sufficiente per passare da un livello inferiore a uno superiore, si osserverà una banda di assorbimento in corrispondenza del valore della frequenza che soddisfa l'equazione:

$$\Delta E = h\nu = h\gamma H_0/2\pi$$

Dove: ν = frequenza della radiazione in Hz; h = costante di Plank; γ = rapporto giromagnetico; H_0 = intensità del campo applicato in Gauss.

Il segnale emesso dal campione viene diretto verso un decodificatore in modo tale che questo venga analizzato per ottenere informazioni riguardanti la molecola, come la sua struttura e ciò che la circonda.

Quando i vari momenti magnetici dei vari nuclei si inclinano completamente sul piano orizzontale rispetto al campo magnetico applicato, è possibile analizzarli, grazie ad una antenna che capta le onde radio che questi generano, collocata esattamente in modo perpendicolare al campo magnetico applicato.

Ogni nucleo mostra le sue caratteristiche perché ruota nel piano a velocità differente a seconda della sua posizione nella molecola e all'ambiente che gli atomi vicini creano ovvero, due nuclei diversi risuonano a frequenze differenti.

Ciò significa prima di tutto che un atomo di carbonio per esempio, deve essere colpito da un' onda radio con frequenza diversa da quella necessaria ad un atomo di idrogeno per ribaltarsi di 90° , ma anche che atomi simili in

ambienti diversi, come un atomo di idrogeno legato a uno di ossigeno e un atomo di idrogeno legato a uno di carbonio si ribaltano a frequenze diverse. Vedendo a quale frequenza questi diversi nuclei si ribaltano si può determinare sia la struttura di una molecola che altre sue proprietà.

Il perché gli atomi simili in ambienti diversi risuonano a frequenze diverse è dovuto alla schermatura. Questo avviene perché gli elettroni sono delle particelle cariche, se immerse in un campo magnetico esterno B_0 tendono a generare un piccolo campo magnetico opposto al campo magnetico applicato. La generazione di questo campo magnetico opposto scherma il nucleo dalla forza totale del campo magnetico applicato. Maggiore è la densità elettronica del nucleo, maggiore sarà la schermatura.

I nuclei che possiedono una densità elettronica maggiore percepiranno quindi un campo magnetico minore e subiranno la transizione ad una frequenza applicata più bassa rispetto ai nuclei che presentano una densità elettronica minore. I protoni e i carboni presenti in prossimità di atomi elettronegativi non vengono schermati, quindi sentono un campo magnetico più intenso e subiscono transizione a frequenze maggiori.

Lo spostamento del segnale nello spettro NMR prende il nome di spostamento chimico (*chemical shift*).

L'analisi NMR presenta diverse applicazioni, e fra queste, l'utilizzazione per determinare la struttura di diversi materiali di natura polimerica.

3.6.2 Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR)

Per spettroscopia infrarossa o vibrazionale si intende l'assorbimento di radiazioni elettromagnetiche comprese fra 2 e 50 μm dovuti a transizioni vibrazionali di atomi all'interno di una molecola.

La FT-IR è una metodica che viene utilizzata per effettuare la determinazione sia qualitativa che semiquantitativa di composti organici ed inorganici in campioni liquidi o solidi.

I campioni solidi devono essere macinati prima di essere analizzati, mentre i campioni liquidi possono essere utilizzati per l'analisi direttamente, senza essere ulteriormente trattati.

Questa metodica consiste nel depositare il campione sotto forma di film sottile su una superficie trasparente alle radiazioni infrarosse, come per esempio delle celle di diamante, dei dischi di NaCl o dei dischi di KBr.

Il campione viene attraversato dalla radiazione infrarossa, parte della radiazione viene assorbita e si verificano quindi delle transizioni tra livelli energetici vibrazionali.

L'analisi FT-IR permette di identificare, a partire dalle bande di assorbimento, la struttura molecolare di composti anche molto complessi. Ogni raggruppamento chimico ha una caratteristica frequenza di vibrazioni che permette la sua identificazione all'interno di un composto di struttura sconosciuta.

3.6.3 Cromatografia di permeazione su gel (GPC)

La determinazione del peso molecolare di un polimero viene effettuata mediante un processo cromatografico chiamato GPC (Gel Permeation Chromatography) o SEC (Size Exclusion Chromatography). In questa tecnica HPLC i componenti di un campione vengono separati in base alla dimensione delle loro molecole.

Il campione d'interesse viene sciolto nella fase mobile e viene fatto passare attraverso una colonna contenente una fase stazionaria, in genere un gel che opera una esclusione sterica, trattenendo le molecole più piccole e lasciando passare prima quelle più grosse; la fase mobile non deve interagire con la fase stazionaria, opera solo come trasportatore dell'analita, che deve sciogliersi completamente in esso. Tra le fasi mobili più utilizzate troviamo cloruro di metilene, cloroformio, toluene e tetraidrofurano (THF).

Le fasi stazionarie che vengono utilizzati attualmente presentano dei pori di dimensione definite resistenti ad alte pressioni, come per esempio i gel rigidi di tipo divinilbenzenico. Tali materiali presentano diverse gradazioni, ciascuna gradazione copre un intervallo definito di dimensioni molecolari.

Le fasi stazionarie fungono quindi da setacci molecolari permettendo alle molecole più piccole di entrare all'interno dei pori (permeazione) e alle molecole più grandi di attraversare velocemente la colonna (esclusione).

Le molecole più piccole vengono quindi rallentate perché devono diffondere nei pori della fase stazionaria.

Il peso molecolare e la dimensione di una molecola sono fortemente correlate tra loro, infatti il tempo di eluizione di una molecola attraverso la colonna può essere utilizzato per effettuare una misura abbastanza fedele del peso molecolare.

L'analisi GPC permette quindi la separazione delle molecole presenti in un campione in base alle dimensioni delle sue componenti, le molecole più piccole infatti diffondendo all'interno dei pori della fase stazionaria verranno quindi rallentate, mentre le molecole più grandi non riuscendo a diffondere attraverso i pori non verranno rallentate.

Le molecole che non vengono rallentate presentano un fattore di capacità pari a zero e un tempo di ritenzione più breve, mentre le molecole più piccole avranno un fattore di capacità diverso da zero e un tempo di ritenzione più lungo.

Il primo picco del cromatogramma rappresenta quindi la molecola più grande presente nel campione di partenza mentre l'ultimo picco rappresenta la molecola più piccola.

Se viene effettuata un'analisi della distribuzione dimensionale emerge che il cromatogramma non presenta dei picchi distinti ma un unico picco composto, che consiste nell'involuppo dei picchi corrispondenti alle varie molecole presenti nel campione di partenza.

Per effettuare l'analisi della distribuzione dei pesi molecolari del campione è necessario suddividere il cromatogramma in frazioni.

L'analisi della distribuzione dimensionale del campione in esame viene effettuata utilizzando delle curve di taratura standard mediante molecole standard a peso molecolare noto.

L'analisi consiste nel confrontare i tempi di ritenzione delle varie molecole presenti nel campione d'interesse con i tempi di ritenzione delle molecole standard, per poi ottenere il peso molecolare medio corrispondente.

Il peso molecolare medio però non è un valore significativo quindi per effettuare una valutazione accurata dei campioni è necessaria l'introduzione di valori che descrivano le diverse caratteristiche delle molecole presenti nel campione.

I polimeri sono tutti più o meno eterogenei rispetto alla massa molecolare. Accanto a molecole molto grandi il polimero può contenere molecole relativamente piccole e di dimensioni intermedie, sono cioè polidispersi. Quindi piuttosto che da un singolo peso molecolare, il polimero è meglio caratterizzato da una distribuzione di pesi molecolari. Per esprimere l'ampiezza della distribuzione occorre definire diverse medie del peso molecolare.

Con peso molecolare medio numerico, M_n , si intende la somma dei singoli pesi molecolari divisa per il loro numero. Viene utilizzato per determinare le molecole a basso molecolare, che presentano caratteristiche come la flessibilità e l'adesività.

Con peso molecolare medio ponderale, M_w , si intende invece la somma dei quadrati dei pesi divisa per la somma dei pesi molecolari. Permette di identificare le molecole ad alto peso molecolare che contribuiscono alla resistenza meccanica del polimero. M_w è sempre maggiore di M_n per un materiale polidisperso.

L'indice di polidispersività (PI) M_w/M_n (media ponderale/media numerica) indica la disomogeneità del campione, sarebbe pari a 1,0 se tutte le catene avessero esattamente la stessa lunghezza (possibile solo teoricamente); in genere i polimeri hanno valori PI compresi tra 1,5 e 30.

Il peso molecolare medio viscosimetrico (M_v) permette di effettuare una correlazione tra peso molecolare e viscosità media del materiale.

3.7 Caratterizzazione molecolare di un gene

Per effettuare la caratterizzazione molecolare di un gene è necessario utilizzare diverse metodiche di biologia molecolare.

La strategia CODEHOP premette di progettare dei *primer* parzialmente degenerati per la caratterizzazione molecolare della porzione interna di un

gene. Una volta progettati i *primer* parzialmente degenerati si procede con l'estrazione e la purificazione dell'RNA totale a partire dal materiale vegetale utilizzando un kit commerciale che sfrutta l'utilizzo di colonnine in silice ad alto potere adsorbente per l'RNA.

Una volta estratto l'RNA totale questo viene utilizzato per la reazione di retrotrascrizione (RT-PCR) che permette la sintesi del cDNA.

Il cDNA di nuova sintesi insieme ai *primer* parzialmente degenerati e una DNA polimerasi vengono poi utilizzati per effettuare diversi esperimenti di PCR.

In seguito ad una serie di esperimenti preliminari vengono ottenute le bande di interesse, individuate grazie all'utilizzo dell'elettroforesi su gel di poliacrilammide.

Le PCR contenenti le bande d'interesse vengono ulteriormente amplificate e purificate da gel d'agaroso, utilizzando un kit commerciale provvisto di colonnine in silice ad alto potere adsorbente per le molecole di DNA.

Il DNA purificato verrà in seguito utilizzato per la preparazione dei campioni da sequenziare tramite sequenziamento Sanger.

Una volta sequenziata la porzione interna del gene è possibile progettare dei *primer* specifici utilizzabili per la strategia 5',3' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) che permette di effettuare la caratterizzazione molecolare delle estremità del gene.

Una volta ottenuta l'intera sequenza, questa verrà inserita nel database Blast NCBI per effettuare la classificazione della proteina.

3.7.1 Strategia CODEHOP

Questa strategia sperimentale permette di progettare *primer* oligonucleotidici parzialmente degenerati (ibridi).

I primers ibridi sono formati da una regione 5' non degenerata (18-25 basi) chiamata *clamp*, e da una regione 3' degenerata (11-12 basi) che prende il nome di *core*.

L'utilizzo di questo tipo di *primer* riduce l'insorgere di molti problemi che si potrebbero incontrare utilizzando i *primer* completamente degenerati, come per esempio la riduzione della concentrazione nella miscela di reazione o la formazione di prodotti aspecifici.

La strategia CODEHOP si divide in due fasi. Nella prima fase viene effettuata una ricerca nel database del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), vengono selezionate diverse sequenze amminoacidiche note della proteina di interesse.

Le sequenze vengono poi allineate utilizzando il programma informatico CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/>), per identificare le regioni ad alta omologia.

Nella seconda fase le zone ad alta omologia ottenute vengono allineate ed elaborate dal programma informatico CODEHOP (<http://blocks.fhcr.org/blocks/>).

Questo programma progetta i *primer* utilizzando un codice specifico, detto alfabeto di degenerazione (Tabella 1).

A	C	G	T	R	Y	M	K	W	S	B	D	H	V	N
A	C	G	T	AG	CT	AC	GT	AT	CG	CGT	AGT	ACT	ACG	ACGT

Tabella 1. Alfabeto degenerato utilizzato dal programma CODEHOP.

3.7.2 Estrazione dell'RNA totale

Per effettuare l'estrazione dell'RNA totale a partire da materiale vegetale vengono generalmente utilizzati dei kit commerciali che utilizzano colonnine in silice ad alto potere adsorbente per le molecole di RNA. Questi kit generalmente contengono:

- lysis binding solution
- plant RNA isolation aid
- Wash solution 1
- Wash solution 2/3
- Elution solution
- Colonnine in silice

A causa dell'instabilità molecolare dell'acido ribonucleico vengono sempre utilizzate diverse precauzioni sperimentali per evitare la sua degradazione durante l'estrazione.

Il materiale da laboratorio utilizzato per questa procedura viene trattato con una soluzione di DEPC al 0.1 % e successivamente autoclavato.

Vengono utilizzati dei puntali sterili con il filtro, e viene effettuata una pulizia profonda del piano di lavoro, delle pipette e del rotore della centrifuga utilizzando l'RNasi Zap, un potente inibitore delle RNasi fornito dalla ditta Sigma Aldrich.

Il materiale vegetale da cui estrarre l'RNA viene sminuzzato e aggiunto alla *lisis binding solution* e *plant RNA isolation aid* contenenti un agente caotropico, la guanidina tiocianato.

La miscela ottenuta viene poi centrifugata a 20000 rcf per 10 minuti a 4 °C, viene recuperato il surnatante e trasferito in provette sterili da 1.5 ml.

Tutti i surnatanti vengono riuniti in un'unica provetta sterile da 15 ml ed a questo viene aggiunto un volume uguale di etanolo al 64% per favorire la precipitazione dell'acido nucleico.

La soluzione così ottenuta viene caricata in una colonnina provvista di una membrana che presenta un alto potere adsorbente per le molecole di RNA. Una volta terminata la soluzione si effettuano tre step di lavaggio per eliminare eventuali contaminanti attraverso l'utilizzo di due soluzioni *Wash solution 1* e *Wash solution 2/3*.

Questa procedura sfrutta l'alta affinità della membrana in silice della colonnina per le molecole di RNA, favorendo la separazione di quest'ultimo dalle diverse contaminanti presenti in soluzione (DNA, proteine, sali) che vengono eliminate.

Effettuati i vari step di lavaggio la colonnina verrà posizionata su una provetta sterile pulita per poi effettuare l'eluizione aggiungendo una soluzione di TRIS-HCl-EDTA preriscaldata a 80°C (*Elution solution*). Dopo un'incubazione di 1 minuto a temperatura ambiente il tutto viene centrifugato a 10000 rcf per 30 secondi.

L'eluato così ottenuto contenente l'RNA verrà poi recuperato, e ne verrà prelevata un'aliquota (40 µl) per determinarne il grado di purezza.

Per verificare il grado di purezza di un acido nucleico si effettua una determinazione spettrofotometrica e in seguito si stima il rapporto A260/A280, per valutare l'eventuale contaminante proteica. Un campione presenta un buon grado di purezza se il rapporto ha un valore compreso tra 1.8-2.0.

Una volta verificata la qualità dell'RNA quest'ultimo verrà utilizzato per la sintesi del cDNA utilizzando le metodiche RT-PCR e la strategia 5', 3'RACE.

3.7.3 Reverse-transcriptase-PCR (RT-PCR)

La metodica della reverse-transcriptase-PCR (RT-PCR) permette di sintetizzare DNA a partire da uno stampo di RNA messaggero, tramite una reazione di retrotrascrizione che avviene ad opera di una DNA polimerasi-RNA dipendente, una cosiddetta retrotrascrittasi.

La retrotrascrittasi essendo una DNA polimerasi necessita della presenza di un *primer* oligonucleotidico per iniziare la polimerizzazione, in questo caso chiamato oligodT, perché in grado di riconoscere ed ibridarsi alla coda di poliA dell'mRNA, per poi favorire la sintesi di DNA complementare (cDNA).

La RT-PCR sfrutta infatti la presenza della coda di poliA nell'estremità 3' dell'mRNA per distinguere quest'ultimo dagli altri RNA presenti nella miscela di partenza (rRNA, tRNA, snRNA).

Per la RT-PCR vengono utilizzati dei kit commerciali contenenti:

- Enhanced Avian Reverse Transcriptase
- Buffer for AMV Reverse Transcriptase 10X
- Oligo (dT)

Nella prima fase della reazione vengono aggiunti in provetta i seguenti reagenti:

- H₂O sterile
- Oligo dT
- dNTP
- RNA (0.68 µg)

La miscela di reazione viene miscelata bene senza vorticare, e poi incubata per 10 minuti a 70 °C, per favorire la denaturazione di eventuali strutture secondarie formate dall'mRNA.

Le provette vengono poi messe in ghiaccio e alla miscela di reazione vengono aggiunti i seguenti reagenti:

- H₂O sterile
- Buffer
- Inibitore delle RNasi
- AMV reverse transcriptase

La miscela di reazione viene poi incubata per 15 minuti a 25 °C per favorire l'ibridazione dell'oligo dT alle code di poliA, e di nuovo incubata per 50 minuti a 42 °C per favorire la polimerizzazione ad opera della trascrittasi inversa.

3.7.4 Strategia 5', 3' RACE (Rapid Amplification cDNA Ends)

La metodica RACE, è una metodica che viene utilizzata per amplificare sequenze localizzate tra una regione nota interna e l'estremità di un gene di interesse, permettendo di amplificare le estremità 5' e 3'.

La metodica RACE prevede l'utilizzo di:

- Primer antisenso (reverse) specifici per l'amplificazione dell'estremità 5'
- Primer senso (forward) specifici per l'amplificazione dell'estremità 3'.
- Primer di ancoraggio (oligodT anchor primer e anchor primer)

La metodica 5'RACE consiste di diverse fasi:

- Sintesi del cDNA

- Purificazione del cDNA
- Reazione di tailing
- XLPCR
- PCR

Il cDNA viene sintetizzato tramite una reazione di retrotrascrizione per cui viene utilizzato un *primer* specifico reverse che si annida a circa 300 pb dall'estremità 5', causando la perdita della coda di poliA del mRNA (Figura38)

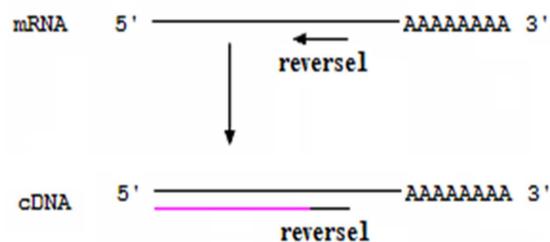


Figura 38: Sintesi del cDNA durante la procedura 5' RACE.

Il cDNA ottenuto viene purificato per eliminare eventuali contaminanti, utilizzando un kit commerciale che sfrutta l'utilizzo di colonnine adsorbenti ad alta affinità per il DNA che contiene:

- Binding buffer (Tris-HCl 10 mM pH 6.6 + 5% EtOH + 3M guanidina tiocianato)
- Washing buffer (Tris-HCl 2 mM pH + 20 mM NaCl + EtOH)
- Elution buffer (Tris-HCl 10 mM pH 8.5)

A 20 µl di cDNA vengono aggiunti 100 µl di *binding buffer*. La miscela viene poi versata all'interno della colonnina disposta sopra un collettore sterile che verrà centrifugata a 13000 rpm per 30 secondi. L'eluato verrà eliminato, vengono poi aggiunti 500 µl di *wash buffer* in colonna che verrà centrifugata a 13000 rpm per 30 secondi, l'eluato e il collettore vengono poi eliminati e si procede con l'eluizione versando in colonna 50 µl di *elution buffer* e centrifugando a 13000 rpm per 30 secondi. Il cDNA purificato verrà poi utilizzato per la reazione di tailing

La reazione di tailing si suddivide in due fasi.

Nella prima fase viene utilizzata una miscela contenente:

- cDna purificato
- Reaction Buffer
- dATP (2 mM)

Questa miscela di reazione verrà poi incubata 3 minuti a 93°C e successivamente raffreddata in ghiaccio.

Nella seconda fase alla miscela viene aggiunta la deossinucleotidiltransferasi terminale, la miscela così ottenuta verrà poi 30 minuti a 37°C e per 10 minuti a 70°C.

In seguito alla reazione di tailing il cDNA presenterà nell'estremità 3' una coda di poliA artificiale.

Attraverso la reazione di tailing è possibile allungare il cDNA ad opera di una deossinucleotidiltransferasi terminale che aggiunge una serie di adenilati al cDNA di nuova sintesi, creando quindi una coda di poliA artificiale che fungerà in seguito come sito d'ancoraggio per l'anchor primer (Figura 39).

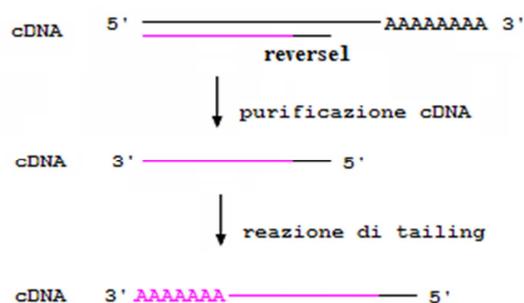


Figura 39: Reazione di mailing.

Il cDNA così ottenuto viene utilizzato come prodotto di partenza per la reazione di XL-PCR che prevede l'utilizzo di un primer reverse specifico che si annida in una posizione più vicina all'estremità e di un oligodT anchor primer provvisto di due porzioni, una oligonucleotidica e una coda di

poliT in grado di riconoscere ed ibridarsi alla coda di poliA. Il prodotto ottenuto dalla XL-PCR viene poi utilizzato per effettuare diversi esperimenti di PCR.

La metodica 3' RACE invece è molto simile alla RT-PCR, anche questa metodica sfrutta la presenza della coda di poliA dell'mRNA (Figura 40).

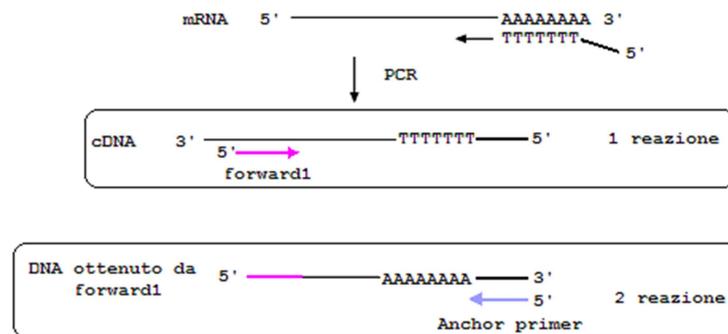


Figura 40. Metodica 3'RACE.

Per la sintesi del cDNA viene utilizzato un oligodT anchor primer come quello utilizzato per la XL-PCR in grado di riconoscere ed ibridarsi alla coda di poliA presente nell'mRNA. Il cDNA di nuova sintesi presenta quindi in posizione 3' una porzione oligonucleotidica protrudente.

Per le reazioni di PCR viene utilizzato un primer forward specifico e un anchor primer sprovvisto però della coda di poliT, in grado di riconoscere e ibridarsi alla porzione protrudente del cDNA.

Una volta identificate le bande di interesse queste sono state ulteriormente amplificate e purificate.

3.7.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Tra le metodiche più utilizzate per la caratterizzazione molecolare di un gene compare la reazione di PCR (Polymerase Chain Reaction).

La PCR permette di amplificare ed isolare frammenti genici di interesse in vitro, partendo da piccole quantità di DNA, utilizzando la cosiddetta reazione a catena della polimerasi.

L'amplificazione è favorita dalla ripetizione di cicli di numero variabile (da 25 a 40) ad opera di uno strumento che prende il nome di termociclatore.

La miscela di reazione contiene tutti i componenti fondamentali coinvolti nella replicazione del DNA: deossinucleotidi trifosfato (dNTP), *primer* d'innescio, DNA polimerasi e il $MgCl_2$, importante cofattore enzimatico che favorisce la polimerizzazione.

La PCR consta di 3 fasi principali:

- Denaturazione.
- Annealing o ibridazione.
- Estensione o allungamento.

La fase di denaturazione ha una durata variabile da 30 secondi a un minuto, avviene a circa 94-95 °C sia per favorire la denaturazione delle strutture secondarie, che per favorire la rottura dei legami idrogeno coinvolti nella formazione delle doppie eliche. Si ha quindi la despiralizzazione delle molecole ibride RNA-DNA ottenute dalle reazioni di retrotrascrizione precedentemente illustrate.

In seguito alla denaturazione la miscela di reazione si arricchisce di molecole di DNA a singolo filamento (*single stranded*) utilizzate in seguito come stampo dalla DNA polimerasi, mentre le molecole di RNA, a causa dell'alta instabilità, vengono completamente degradate.

La fase di denaturazione del primo ciclo è preceduta da una fase preliminare di 5 minuti a 94-95 °C, necessaria per favorire la completa denaturazione delle strutture secondarie. Alla miscela di reazione si aggiunge l'enzima, una Taq DNA polimerasi, estratta dal batterio termoresistente *Thermus aquaticus*.

La fase di annealing (o ibridazione) rappresenta quella fase della PCR dalla quale dipende la buona resa della reazione, avviene ad una temperatura che varia dai 37 ai 65 °C. La temperatura di annealing viene modificata in funzione delle caratteristiche del *primer*, può essere calcolata utilizzando la seguente formula:

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 4 \times (\text{G} + \text{C}) + 2 \times (\text{A} + \text{T})$$

Le DNA polimerasi in vivo necessitano della presenza di inneschi (*primer*) per riconoscere la sequenza bersaglio e per poter procedere con la polimerizzazione, in quanto non sono in grado di sintetizzare nuove molecole di DNA *ex novo*. Nella miscela di reazione della PCR vengono aggiunti due tipi di *primer* oligodesossinucleotidici, i *primer* senso (forward) che si ibridano al filamento 3' → 5', e i *primer* antisenso (reverse) che invece si ibridano al filamento 5' → 3'.

Questi primers vengono progettati per ibridarsi a livello di sequenze bersaglio fortemente conservate della sequenza di interesse. Se il *primer* non dovesse ibridarsi con successo alla sequenza bersaglio, la Taq DNA polimerasi non sarebbe in grado di iniziare la polimerizzazione e la reazione non avrebbe inizio.

La fase di estensione rappresenta la fase finale della PCR in cui avviene la polimerizzazione ad opera della Taq DNA polimerasi, che polimerizza a partire dai *primer* utilizzando i deossinucleotidi trifosfato presenti nella miscela di reazione.

In questa ultima fase avviene quindi la sintesi del frammento da isolare ed amplificare, ad una temperatura di 72 °C, temperatura ottimale per favorire la polimerizzazione. Al termine del programma di solito si effettua un'ulteriore incubazione di 10 minuti a 72 °C per favorire la *final elongation* dei frammenti di interesse.

3.7.6 Purificazione dell'amplificato di DNA

Il DNA amplificato viene poi purificato utilizzando un kit commerciale contenente:

- Gel solubilisation solution
- Column preparation solution
- Wash solution
- Elution buffer

- Colonnine in silice

Tale kit sfrutta l'alto potere adsorbente che la colonnina in silice ha nei confronti delle molecole di DNA e prevede l'utilizzo di bande di DNA escisse da gel d'agaroso come materiale di partenza.

Le bande vengono prima di tutto trattate con la *gel solubilisation solution* (600 µl per ogni 100 mg di agaroso) per poi essere lasciate in incubazione per 10 minuti a 50 °C, per favorire la dissoluzione dell'agaroso.

Nel frattempo la colonnina viene trattata con 500 µl di *column preparation solution*.

Terminato il tempo di incubazione viene poi aggiunto l'isopropanolo (200 µl per ogni 100 mg di agaroso) e si procede con il caricamento delle miscele in colonna (700 µl alla volta fino a terminare la miscela).

Una volta terminata la miscela vengono effettuati due step di lavaggio aggiungendo la *wash solution* e centrifugando a 13000 rpm per 1 minuto. Viene poi trasferita la colonnina in una provetta sterile per effettuare l'eluizione finale. Di norma vengono effettuate due eluizioni aggiungendo in colonna l'*elution buffer* preriscaldato a 65 °C.

Vengono effettuate una prima ed una seconda eluizione aggiungendo rispettivamente 50 e 30 µl di buffer, si lascia in incubazione a temperatura ambiente per un minuto, ed in seguito all'incubazione la colonnina viene centrifugata a 13000 rpm per un minuto.

Il DNA purificato in seguito viene utilizzato per effettuare un controllo elettroforetico in agaroso per verificare la presenza dei frammenti di interesse, viene poi sequenziato tramite sequenziamento Sanger.

3.7.7 Sequenziamento Sanger

Il sequenziamento Sanger, detto anche metodo della terminazione della catena, consiste nella sintesi di nuovi filamenti di DNA complementare a partire da uno stampo a singolo filamento. Prevede l'utilizzo di particolari nucleotidi modificati chiamati dideossinucleotidi (ddNTP) che hanno una funzione chiave per quanto riguarda l'interruzione della catena

polinucleotidica in punti specifici, permettendo la formazione di filamenti di diverse dimensioni.

La prima fase del sequenziamento Sanger consiste nella produzione di uno stampo a singolo filamento. Il DNA viene clonato in un vettore e successivamente denaturato per ottenere lo stampo.

Tale metodica prevede l'utilizzo di un primer oligonucleotidico specifico che viene riconosciuto dalla DNA polimerasi, l'utilizzo di dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) e l'utilizzo di una miscela di ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP).

Lo stampo a singolo filamento viene utilizzato per effettuare quattro reazioni distinte, ciascuna delle quali presenta una miscela di reazione contenente piccole quantità di uno dei quattro ddNTP. Ogni ddNTP presenta un marcatore fluorescente differente (fluorescina, nitrobenzofurazan, rosso Texas e tetrametilrodamina).

Come nelle reazioni di PCR la DNA polimerasi inizia la polimerizzazione a partire dal primer oligonucleotidico, la polimerizzazione procede fino a che l'enzima incorpora un ddNTP marcato. Quest'ultimo blocca la reazione, bloccando quindi l'allungamento della catena, in quanto presenta un solo atomo di idrogeno al posto del gruppo OH in posizione 3', per questo i ddNTP vengono anche chiamati terminatori dideossinucleotidici. Si formerà quindi per ogni reazione una famiglia di frammenti marcati di diverse dimensioni in funzione della posizione in cui i ddNTP vengono incorporati.

I frammenti vengono separati tramite elettroforesi continua, un laser eccita le specie fluorescenti, le emissioni fluorescenti vengono captate da un rilevatore ottico, e le informazioni vengono elaborate utilizzando degli specifici algoritmi per poi essere convertite in picchi di colore diverso, ogni picco avrà un'area proporzionale all'intensità dell'emissione e andranno a formare un cromatogramma.

4. PARTE SPERIMENTALE

4.1 Studio delle sostanze bioattive presenti nel lattice

Per saggiare la presenza di composti antiossidanti e inibitori dell'attività enzimatica della AChE in estratti di lattice di *E. characias* abbiamo utilizzato metodi d'estrazione comuni che fanno uso di solventi organici come metanolo (MetOH), etanolo (EtOH), etere di petrolio e metanolo (PE/MetOH), e un metodo alternativo basato sull'utilizzo dell'acido tricloroacetico (TCA).

Una volta preparati gli estratti con i vari metodi, sono stati effettuati diversi saggi spettrofotometrici per determinare: lo scavenging radicalico, contenuto totale di polifenoli, il contenuto totale in flavonoidi e l'inibizione dell'attività enzimatica delle AChE.

Tutti i reagenti chimici utilizzati: ABTS, DPPH, acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcromone-2-carbossilico (TROLOX), Folin-Ciocalteu reagent gallic, acido gallico, HRP (perossidasi da rafano), quercitina, nitrato di alluminio, AChE da *Electrophorus electricus*, acetiltiocolina (ATCI), acido 5,5'-ditiobis-(2,2'-dinitrobenzoico) (DTNB), sono stati ottenuti come prodotti commerciali, utilizzati direttamente senza effettuare un'ulteriore purificazione.

I dati di tutte le attività saggiate sono stati ottenuti utilizzando uno spettrofotometro Ultrospec 2100 (Biochrom Ltd, Cambridge, England), usando delle celle con cammino ottico di un cm.

L'estratto in TCA è stato inoltre analizzato utilizzando la tecnica della gas cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS).

4.1.1 Preparazione degli estratti

Il lattice è stato raccolto recidendo le porzioni apicali delle piante mature di *E. characias* ed è stato subito utilizzato per la preparazione degli estratti.

I primi tre estratti (*a*, *b* e *c*) sono stati preparati aggiungendo a 5 ml di lattice rispettivamente:

- a. 50 ml di metanolo (MetOH)

- b. 50 ml di etanolo (EtOH)
- c. 5 ml di etere di petrolio (PE) seguiti da 5 ml di metanolo (PE/MetOH)

Ciascuna delle tre miscele è stata posta in provette sigillate in agitazione *end over end* a 4 °C, per periodi da 1 a 12 ore.

Dopo il periodo di incubazione gli estratti sono stati centrifugati a 9000 rpm per 30 minuti. I precipitati ottenuti sono stati separati dal surnatante, ritrattati con i rispettivi solventi e centrifugati a 9000 rpm per 30 minuti. Tutti i surnatanti sono stati poi utilizzati per effettuare diversi saggi atti alla determinazione sia dell'attività antiossidante che dell'attività inibitoria delle AChE.

È stato poi preparato un estratto alternativo aggiungendo 0.5 ml di TCA puro a 5 ml di lattice, la miscela è stata immediatamente centrifugata a 9000 rpm per 30 minuti. È stato recuperato il surnatante e neutralizzato con NaOH 1 M. Il precipitato ottenuto è stato risospeso in TCA puro (concentrazione finale 10%) e centrifugato a 9000 rpm per 30 minuti.

I surnatanti ottenuti sono stati utilizzati per saggiare sia l'attività antiossidante che l'attività inibitoria dell'AChE.

4.1.2 Saggi spettrofotometrici

I. Metodi basati sullo scavenging radicalico

Per la determinazione dello scavenging radicalico sono stati utilizzati due saggi spettrofotometrici che utilizzano come radicale standard il radicale dell'acido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonico) (ABTS^{•+}) e il radicale dell'acido 2,2'-difenile-1-picrilidrozile (DPPH[•]).

A) Saggio dell'ABTS

Per ottenere il catione radicalico ABTS è stata preparata una soluzione di ABTS ridotto 7 mM, questa è stata fatta reagire con potassio persolfato 2.45 mM, la soluzione così ottenuta è stata incubata 24 ore a temperatura ambiente e al buio prima dell'utilizzo. Per il saggio è stata utilizzata una soluzione di ABTS in acqua con assorbanza a 734 nm di circa 0.7

A 10 µl di ogni estratto è stato aggiunto 1 ml di ABTS^{·+} diluito, dopo una incubazione a temperatura ambiente, al buio per 1 minuto, è stata registrata l'assorbanza a 734 nm, utilizzando come controllo 1 ml di ABTS^{·+} in assenza di alcun estratto.

Il decremento dell'assorbanza a 734 nm in relazione al controllo è stato utilizzato per calcolare l'attività antiossidante espressa come equivalenti di potere antiossidante di TROLOX (TEAC). Per costruire la curva standard, la soluzione di ABTS viene incubata con diverse concentrazioni (da 0 a 20 µM) di TROLOX ottenute da una soluzione madre 2.5 mM in etanolo.

B) Saggio del DPPH

A 975 µl di DPPH[•] (soluzione in etanolo assoluto 6×10^{-5} M), si aggiungono 25 µl di ciascun estratto. Dopo incubazione a temperatura ambiente e al buio per 15 minuti si registra l'assorbanza a 515 nm, considerando 1 ml di DPPH[•] come controllo, in assenza di estratti. Il decremento dell'assorbanza del DPPH[•], in relazione al controllo, è stato utilizzato per calcolare l'attività antiossidante degli estratti che è stata espressa anche in questo caso come TEAC utilizzando come riferimento una curva standard, costruita con diverse concentrazioni (da 0 a 20 µM) di TROLOX ottenute da una soluzione madre 2.5 mM in etanolo .

II. Metodi per la determinazione il contenuto totale di composti polifenolici.

Per la determinazione del contenuto di polifenoli totali nei vari estratti sono stati utilizzati due saggi spettrofotometrici differenti, un metodo in cui viene utilizzato il reattivo di Folin-Ciocalteu e il metodo enzimatico.

A) Metodo di Folin-Ciocalteu

A 10 µl di ciascun estratto sono stati aggiunti 50 µl di FC e 790 µl di acqua distillata. Dopo un minuto sono stati aggiunti 150 µl di una soluzione di carbonato di sodio satura (soluzione acquosa al 20%). La miscela di reazione è stata incubata a temperatura ambiente, al buio per 45 minuti e dopo il periodo di incubazione è stata subito registrata l'assorbanza a 750 nm.

L'incremento dell'assorbanza a 750 nm è una conseguenza della presenza di composti fenolici negli estratti di interesse. La concentrazione di polifenoli è stata quindi espressa come equivalenti di acido gallico (GAE), considerando una curva standard di riferimento costruita utilizzando concentrazioni da 0 a 0.1 mM di acido gallico.

B) Metodo enzimatico:

A 50 µl di ogni estratto sono stati aggiunti 1 ml di tampone potassio fosfato (KPi) 0.1 M pH 8,0, 4-aminoantipirina 3 mM, H₂O₂ 2 mM e HRP 0.33 µM.

Dopo 5 minuti di incubazione è stata registrata l'assorbanza a 500 nm. Anche in questo caso l'incremento dell'assorbanza a 500 nm indica la presenza di composti fenolici negli estratti di interesse. La concentrazione di polifenoli, è stata espressa come equivalenti di acido gallico (GAE), considerando una curva standard di riferimento.

III. Metodo del nitrato d'alluminio per la determinazione del contenuto totale di flavonoidi.

A 0.5 ml di ciascun estratto sono stati aggiunti 0.1 ml di nitrato di alluminio, 0.1 ml di sodio acetato 1 M e 4.3 ml di etanolo all'80%. La miscela è stata incubata a temperatura ambiente per 40 minuti, terminata l'incubazione è stata determinata l'assorbanza a 415 nm. La concentrazione di flavonoidi è stata espressa come equivalenti di quercetina (QE), considerando una curva standard di riferimento.

IV. Saggio di Ellman per la determinazione dell'inibizione delle AChE

Per saggiare l'azione anti-AChE degli estratti di *E. characias* è stato utilizzato il saggio di Ellman.

Prima di effettuare i saggi di inibizione è stata effettuata una prova per escludere un'eventuale auto-idrolisi spontanea dell'acetilcolina (ATCI) che porterebbe ad una sovrastima dei risultati.

Abbiamo incubato DTNB 1.5 mM in una soluzione di TRIS/HCl 0.05 M, pH 8.0, contenente lo 0.1% albumina e in presenza di ATCI 1.5 mM. La variazione di assorbanza a 405 nm di questa soluzione, in assenza di enzima.

Per valutare l'attività enzimatica si prepara una miscela di reazione contenente 0.5 ml di DTNB 1.5 mM, 0.1 ml di ATCI 1.5 mM, 0.2 ml di TRIS/HCl 0.05 M, pH 8.0, contenente lo 0.1% albumina e 0.1 ml di AChE (0.1 U/ml) . Si registra la variazione di assorbanza a 405 nm per tre minuti e lo *slope* ottenuto è considerato come il 100% di attività enzimatica (attività di riferimento).

Prima di saggiare l'attività inibitoria di ciascun estratto sono state effettuate delle prove preliminari, registrando per tre minuti la eventuale variazione di assorbanza della miscela di reazione enzimatica in presenza di solvente o reagente utilizzato per la preparazione degli estratti (MetOH, EtOH, PE/MetOH, TCA) e AChE (0.1 U/ml), per escludere una loro eventuale azione inibitoria indipendente dal contenuto dell'estratto.

L'attività inibitoria di ciascun estratto è stata saggiata aggiungendo 100 µl di ciascun estratto alla miscela di reazione e registrando l'attività enzimatica per tre minuti. Di ciascuna attività abbiamo determinato lo *slope* che è stato utilizzato per calcolare la percentuale di inibizione determinata da ciascun estratto.

È stata poi calcolata l'IC₅₀ di ciascun estratto, comparando la percentuale di inibizione calcolata per ciascun estratto con la retta standard di riferimento costruita utilizzando soluzioni di galantamina (in metanolo al 10% v/v) a concentrazioni comprese tra 0 e 100 µM. Il 50% di inibizione si ottiene alla concentrazioni di galantamina di 15 µM .

4.1.3 GC-MS

La gas cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa è stata utilizzata per identificare composti antiossidanti e inibitori della AChE presenti nell'estratto in TCA.

La GC-MS è stata effettuata utilizzando un gas cromatografo Agilent 6850A accoppiato con un rivelatore a spettrometria di massa a quadrupolo 5973N (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). La separazione cromatografica è stata effettuata utilizzando una colonna capillare di silice fusa Agilent HP5MS (30 m X 0.25 mm i.d.). Come fase stazionaria è stato utilizzato dimetilpolisilossano al 95% contenente il 5% di gruppi sostituenti fenilici (Film thickness 0.25 µm).

I. Analisi GC-MS di composti polifenolici come derivati TBDMS dell'estratto in TCA.

Dall'estratto in TCA sono stati prelevati 300 µl e addizionati a HCl 0.5 M per raggiungere il valore di pH 2. La miscela viene estratta tre volte con 1 ml di acetato di etile tramite vorticazione per 2 minuti.

Gli estratti in acetato di etile recuperati dopo centrifugazione vengono fatti passare attraverso solfato di magnesio anidro impaccato all'interno di una pipetta Pasteur ed evaporati a secco in atmosfera di azoto. L'estratto è stato risospeso in 30 µl di diclorometano, derivatizzato mediante l'aggiunta di 50 µl di N-tert-butildimetil-N-metiltrifluoro-acetamide (TBDMS) (70 °C, per un'ora), evaporato a secco in atmosfera di azoto e risospeso in 20 µl di acetato di etile per l'analisi GC-MS. L'iniezione è stata effettuata a 260 °C, con una temperatura di colonna di 70 °C per 1 minuto, poi fino a 300 °C per 10 minuti, con una velocità di 10 °C al minuto, utilizzando l'elio come gas carrier con un flusso costante di 1 ml al minuto.

Gli spettri sono stati ottenuti sia in modalità TIC (total ion current increment mode, range m/z 30-m/z 600) che in modalità SIM (selected ion monitoring mode) monitorando 2 ioni caratteristici per ogni composto fenolico, utilizzando un'energia di ionizzazione di 70 eV, con una sorgente ionica a 280 °C e una pressione di 10⁻⁵ torr.

II. Analisi GC-MS di quercetina e miricetina come derivati TMSi dell'estratto in TCA.

A 500 µl di estratto in TCA sono stati aggiunti 500 µl di metanolo acidificato contenente l'1% di HCl e 0.5 mg/ml di tert-butylhydroquinone (TBHQ). Alla miscela si aggiungono 100 µl di HCl 1.2 M, si mantiene in agitazione a refluxo per due ore per favorire la formazione degli agliconi dall'idrolisi dei glicosidi flavonolici.

L'estratto dopo essere stato raffreddato a temperatura ambiente è stato estratto tre volte con acetato di etile in rapporto 1:1 v/v. L'estratto così ottenuto è stato fatto passare attraverso solfato di magnesio anidro impaccato all'interno di una pipetta Pasteur ed evaporato a secco in atmosfera di azoto. L'estratto è stato risospeso in 30 µl di diclorometano e derivatizzato con l'aggiunta di 50 µl di trimetilclorosilano (TMS) (70 °C, 3 ore), evaporato a secco in atmosfera di azoto e risospeso in 20 µl di acetato di etile per poi essere utilizzato per l'analisi GC-MS.

Il campione è stato iniettato ad una temperatura di 280 °C, con una temperatura di colonna di 120 °C per 1 minuto poi fino a 320 °C per 10 minuti, ad una velocità di 10 °C al minuto, utilizzando l'elio come gas carrier con un flusso costante di 1 ml/min.

Gli spettri sono stati ottenuti sia in modalità TIC che in modalità SIM monitorando 3 ioni caratteristici della quercetina e 3 ioni caratteristici della miricetina, utilizzando un'energia di ionizzazione di 70 eV con una sorgente ionica a 280 °C e una pressione di 10^{-5} torr.

4.2 Gomma naturale

Per l'estrazione della gomma naturale a partire dal lattice di *E. characias* sono stati messi a punto quattro metodi utilizzando acetone, acido acetico, TCA e Triton® X-100.

La gomma estratta è stata poi purificata utilizzando cicloesano ed etanolo; la gomma estratta con l'acetone è stata purificata, in alternativa, utilizzando benzene.

Della gomma è stata determinata la percentuale in gel e in resina e in seguito all'utilizzo di diverse tecniche analitiche come NMR, FTIR e GPC è stato possibile caratterizzare rispettivamente la composizione polimerica e il peso molecolare della gomma.

4.2.1 Estrazione della gomma

Per l'estrazione della gomma naturale il lattice è stato raccolto recidendo le porzioni apicali delle piante di *E. characias* e immediatamente utilizzato per evitare il processo di coagulazione.

Una aliquota (circa 1 ml), viene posta in una microprovetta preventivamente pesata, congelata e successivamente liofilizzata. La microprovetta contenente il materiale liofilizzato viene poi pesata per stabilire il peso secco di 1 ml di lattice e valutare il contenuto d'acqua.

Il lattice viene suddiviso in quattro aliquote di 100 ml da sottoporre a quattro diversi trattamenti mediante aggiunta rispettivamente di:

- 100 ml di acetone
- 5 ml di acido acetico
- 10 ml di acido tricloroacetico (TCA)
- 1 ml di Triton[®] X-100

Ciascuna delle quattro miscele viene centrifugata a 12.000 rpm per 30 minuti in provetta in vetro preventivamente pesata. Il trattamento con acetone viene effettuato in doppio (campioni A e B). Il precipitato che contiene la gomma, viene pesato e sottoposto ad un ulteriore trattamento di purificazione con due diversi metodi: il campione "A" viene purificato dissolvendo il precipitato in benzene e centrifugando a 12.000 rpm per 30 minuti. La frazione solubile in benzene (il surnatante) contiene la gomma; il solvente viene fatto evaporare sotto vuoto e il materiale essiccato viene pesato. La frazione insolubile in benzene (il precipitato) viene fatta essiccare sotto vuoto e pesata; tale frazione rappresenta la quota di contaminanti dell'estratto di gomma iniziale. Il campione "B" invece viene purificato con

cicloesano/etanolo, la stessa procedura a cui saranno sottoposti anche i campioni ottenuti con le altre procedure di estrazione.

Per quanto riguarda gli altri tre trattamenti, acido acetico, TCA e Triton, dopo centrifugazione si ottengono dei coaguli che vengono lavati più volte (tre cicli di lavaggio) con acqua deionizzata e poi essiccati sotto vuoto a 45 °C. Dopo aver pesato il materiale essiccato, lo si sottopone al trattamento di purificazione con cicloesano/etanolo. Si dissolvono i campioni essiccati in cicloesano, mantenendoli in agitazione per 12 ore a 25 °C. Si centrifuga quindi a 12.000 rpm per 30 minuti, ottenendo un precipitato (che contiene le contaminanti della gomma grezza) che viene poi essiccato e pesato, e una frazione solubile contenente la gomma, che viene recuperata mediante trattamento con etanolo allo scopo di far precipitare la gomma, essicarla e pesarla.

Questo trattamento è stato ripetuto 5 volte e i precipitati così ottenuti sono stati essiccati sottovuoto ad una temperatura di 45 °C e successivamente pesati per poter determinare la percentuale di gomma.

Della gomma estratta con i metodi descritti in precedenza è stato poi determinato il contenuto in gel e il contenuto in resina. La quantità di gomma, gel, resina e contaminanti nel lattice sono stati determinati calcolando la media dei valori ottenuti da 5 differenti misurazioni.

4.2.2 Determinazione del contenuto in gel della gomma

Per la determinazione del contenuto in gel, 0.2–0.3 grammi di gomma sono stati immersi in un eccesso di toluene per 24 ore, le soluzioni vengono filtrate utilizzando dei filtri in nylon da 120 µm (Millipore). Il contenuto in gel è stato determinato pesando il materiale rimanente nei filtri essiccati, considerando il peso totale della gomma estratta.

4.2.3 Determinazione del contenuto in resina della gomma

Per la determinazione del contenuto in resina ad 1 ml di lattice vengono aggiunti 2 ml di acetone. La miscela si centrifuga a 12000 rpm per 30

minuti. L'estratto così ottenuto viene trasferito in provette pre-pesate, e viene essiccato sottovuoto a 65 °C.

Il contenuto in resina è stato determinato pesando il residuo secco così ottenuto, considerando il peso totale del lattice di partenza. Il contenuto in resina è stato determinato anche spettrofotometricamente. Un'aliquota della frazione solubile in acetone è stata trattata con acetonitrile (1:10), la miscela è stata evaporata a 65 °C sottovuoto. Il trattamento viene ripetuto tre volte, il residuo liquido ottenuto viene portato a 1 ml con acetonitrile e analizzato spettrofotometricamente per determinare il massimo di assorbimento e il coefficiente d'estinzione molare della resina.

4.2.4 Analisi NMR

La determinazione della struttura polimerica della gomma di *E. characias* è stata ottenuta mediante NMR, una tecnica spettroscopica utilizzata per lo studio di sistemi molecolari semplici e/o complessi nei diversi stati di organizzazione fisica. È stata applicata per la caratterizzazione della composizione chimica, per l'analisi della struttura isomerica delle unità dieniche delle gomme naturali e, dai numerosi articoli già pubblicati sulla struttura di queste gomme, si evince che i nuclei maggiormente utilizzati per lo studio strutturale attraverso l'analisi NMR sono ^1H e ^{13}C (Ohya et al, 1998).

Per effettuare l'analisi NMR la gomma estratta è stata solubilizzata in 0.7 ml di C_6D_6 . Lo spettro ^1H NMR è stato registrato ad una frequenza di 499.843 MHz, a 40 °C, con tempo di accumulo di 2 secondi, registrando i *chemical shifts*, (riportati in parti per milione), relativamente al picco segnale a 7.17 ppm del C_6D_6 .

Lo spettro ^{13}C NMR è stato invece registrato ad una frequenza di 125.681 MHz a 40 °C con tempo di ripetizione di 3 secondi, registrando i *chemical shifts*, (riportati in parti per milione) relativamente al picco segnale a 128 ppm del C_6D_6 . Lo strumento utilizzato è un Inova NB Varian Instrument (Varian Scientific Instruments).

4.2.5 Analisi FT-IR

Lo spettro FT-IR della gomma estratta dal lattice di *E. characias* è stato registrato nella regione tra 400 e 4000 cm^{-1} usando uno spettrofotometro Bruker Vector 22 (Bruker Corporation). Il campione è stato solubilizzato in benzene e depositato su un disco di KBr sotto forma di film sottile.

4.2.6 Analisi GPC

Per determinare il peso molecolare e la distribuzione dei pesi molecolari della gomma di *E. characias* è stata utilizzata la cromatografia di permeazione su gel.

Le analisi HPLC sono state ottenute dalla Polymer Standard Service (PSS) GmbH (Mainz, Germany) usando tre colonne in serie (ID 8 mm X 300 mm), impaccate con copolimeri di stirene-divinil-benzene (5 mm; 10^2 ; 10^3 ; 10^5 Å) utilizzando come eluente il tetraidrofurano (THF).

Il cromatogramma è stato registrato a 23 °C, monitorato con un rilevatore di indice di rifrazione (RI). Il campione (3 g/L) è stato dissolto in THF, per 12 ore a temperatura ambiente. La soluzione così ottenuta è stata filtrata e 50 μl di campione sono stati iniettati mediante un autocampionatore.

È stata preparata una curva di calibrazione utilizzando dei poliisopreni standard con peso molecolare compreso tra 1 e 1000 kDa.

4.3 Caratterizzazione molecolare del gene della *cis*-preniltransferasi

La caratterizzazione molecolare del gene della *cis*-preniltransferasi è stata effettuata grazie all'utilizzo di diverse metodiche di biologia molecolare.

Grazie alla strategia CODEHOP sono stati progettati primer parzialmente degenerati che ci hanno permesso di sequenziare la porzione interna del gene.

A partire dagli apici germinativi di *E. characias* è stato estratto l'RNA totale utilizzando un kit commerciale che sfrutta l'utilizzo di colonnine in silice ad alto potere adsorbente per l'RNA.

L'RNA totale così estratto è stato utilizzato per la reazione di retrotrascrizione (RT-PCR) che ci ha permesso di sintetizzare il cDNA.

Il cDNA di nuova sintesi insieme ai primer parzialmente degenerati e una DNA polimerasi sono stati utilizzati per effettuare diversi esperimenti di PCR. In seguito ad una serie di esperimenti preliminari abbiamo ottenuto le bande di interesse, identificate grazie all'utilizzo dell'elettroforesi su gel di poliacrilammide. Le PCR contenenti le bande d'interesse sono state ulteriormente amplificate e purificate da gel d'agaroso. Il DNA purificato è stato in seguito utilizzato per la preparazione dei campioni da sequenziare. Il sequenziamento è stato effettuato da un laboratorio esterno della ditta BMR genomics.

Una volta sequenziata la porzione interna del gene è stato possibile progettare primer specifici che sono stati utilizzati nella strategia 5', 3' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) che ci ha permesso di identificare le estremità del gene. Anche in questo caso a partire dall'RNA totale è stato sintetizzato il cDNA utilizzando le metodiche 5' RACE e 3' RACE.

Una volta sintetizzato il cDNA questo è stato utilizzato per effettuare gli esperimenti di PCR insieme ai primer specifici e gli anchor primer. Una volta ottenuta l'intera sequenza, questa è stata inserita nel database Blast NCBI per effettuare la classificazione della proteina.

4.3.1 Estrazione dell'RNA

Gli apici di *E. characias* vengono mantenuti a -80 °C prima di essere utilizzati. Per effettuare l'estrazione dell'RNA totale è stato utilizzato un kit fornito dalla ditta Ambion (RNAqueous[®] Total RNA isolation kit).

L'RNA estratto dall'*E. characias* ha mostrato un buon grado di purezza con un valore di circa 2.

4.3.2 Caratterizzazione molecolare della porzione interna del gene

Per effettuare la caratterizzazione molecolare della porzione interna del gene sono stati utilizzati primer parzialmente degenerati ottenuti utilizzando la strategia CODEHOP.

Per la strategia CODEHOP sono state selezionate ed allineate le sequenze rappresentate nella figura 41 seguente.

```
>[Hevea brasiliensis]
MELYNGERPSVFRLLGKYMRKGLYGILTQGP IPTHLAFILDGNRRFAKHKHLEPEGGHKAGFLALLNVLT
YCYELGVKYATIYAFSIDNFRRKPEHVQYVMDLMEKIEGMIMEESI INAYDICVRFVGNLKLSEPVKT
AADQIMRATANNSKCVLLLAVCYTSTDEIVHAVEESELNSNEVCNNQEELEANATGSSTVIQTENMESY
SGIKLVLEKNTYINPYDPVLRASGETRLSNYLLWQTTNCILYSPYALWPEIGLRHVVWVSINVFQRHYS
YLEKHKEYLK
>[Populus trichocarpa]
MDKHRGSRSLSELFGSLGSFFRKCFCILSMGPIPNHFAFIMDGNRRYAKKKELEEGAGHRAGFSVLMMSML
KYCYELGVTVTYIYAFSIEFNFRKPEVQNLMDLILEKIEGLLKEESLVNKYGIRVYFIGNLKLLSKPVR
VAAEKVMKATANNTKCVLLICIAYTSCDEIVQAVHESCKNKWEEIQPCNSHKSFSGRVEEKLVDLSILK
VVDIESHMYSVAPNPDIVIRSSGETRLSNFLLWQTSNCLLYSPNALWPDMLRHLVWVAVLDFQRNHSYF
EKKKKQF
>[Vitis vinifera]
MEKRGSGGSQIFENLGTFLRKCFISVLSVGP IPNHIAFIMDGNRRFAKKNLIEGAGHKVGYLALMSML
RYSYELGVKYVTIYAFSIEFNFRKPEEVQSVMDLMQEKIEQLINEESILNHFGVRVHFIGNLKLSSAPVR
LAAERAMLVTACNSKAVLSICVAYTSTNEIMHAVEESCCKWDEIRELKASGVDCGLTKLEGYKGEAQD
LINLTDIEKHLYMAVAPDPDILIRTSGETRLSNFLLWQSQCYLSPSVLWPEIGFWHLLWAVLNFQRNH
FYLEKKKKQL
>[Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]
MAELPGQIRRMSSGGISQLIEQIYGFSSRCLFRVISMGP I PSHLAFIMDGNRRYAKKHSLEDGSGHQAGFS
ALMSMLQYCYELGIKYVTIYAFSIDNFRRKPEEVQSLMDLMEKIKSLEKESIVHQYGIRVYFIGNLAL
LNDQVRAAAEKVMKATAKNSRVLLICIAYNSTDEIVQAVKSCINTSDNIEASGNKHEDRSDIEGTD
MENQEKRIQLVDIEENMRMSVAPDPDILVRSGETRLSNFLLWQTGNTQLFSPAALWPEIGLKHLLWAVL
NFQRNHSYLEKRRKQL
>[Periploca sepium]
MEKRSQTSILENLGRFCRACIVSIVSVGP I PVHIAFIMDGNRRYAKKNLLEGTGHRFGYLALINMLKC
CYELGIKYVTIYAFSIDNFRKPEEVESTMKLIQEKIEELIKEESLLNIYGVVYFLGNLKLKNSVRLT
AERAMAATAGNSKAVLSICVGYTSTDEIVHAVQECCERKWEIRELDSSGAGYGLISIGTNEESKGENIV
GVADIEKHMYAAVVPDPIIIRTSGETRLSNFLLWQSADSLYSPSILWPEIGFRHLVWVAVLDFQRNFHY
LKKKGKESSEVSWKSIPIRILKYCLFWMVGLILFQFHLSLQKNVEIVW
```

Figura 41. Sequenze amminoacidiche selezionate dal database NCBI utilizzate per la progettazione dei primer parzialmente degenerati.

La strategia CODEHOP ci ha permesso di progettare i seguenti primer:

<u>PRIMER</u>	<u>Sequenza nucleotidica</u>	<u>Regione proteica</u>
Forward 1	5'-CCCAACCACATCGCCtyathatgga-3'	PNHIAFIMD
Forward 2	5'-GACCATCTACGCCTTCTCCathganaaytt-3'	TIYAFSIDNF
Reverse 1	5'-AGCAGGAAGTTGGACAGCckngtytcnc-3'	GETRLSNFLL

Questi primer sono stati utilizzati in seguito per gli esperimenti di PCR nelle seguenti combinazioni (Figura 42):

Forward 1	5'-CCCAACCACATCGCCtyathatgga-3'
Reverse 1	5'-AGCAGGAAGTTGGACAGCckngtytcnc-3'
Forward 2	5'-GACCATCTACGCCTTCTCCathganaaytt-3'
Reverse 1	5'-AGCAGGAAGTTGGACAGCckngtytcnc-3'

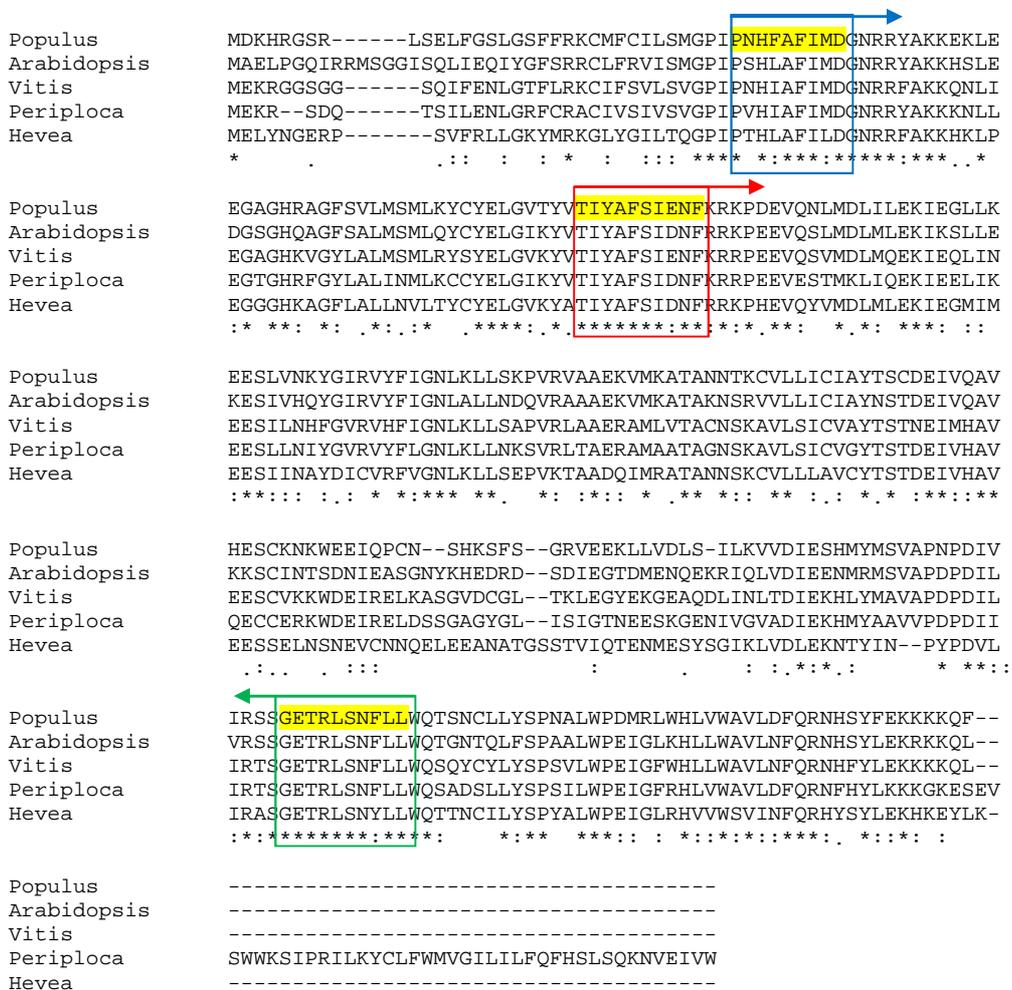


Figura 42. Sequenze amminoacidiche di cinque *cis*-preniltransferasi allineate tramite il programma ClustaW. I box colorati evidenziano i primer progettati tramite strategia CODEHOP utilizzati per la caratterizzazione della porzione interna del gene. In blu il forward 1, in rosso il primer forward 2, e in verde il primer reverse 1.

L'RNA totale estratto dagli apici di *E. characias* è stato utilizzato per la reazione di RT-PCR.

Per la sintesi del cDNA è stato utilizzato un kit fornito dalla ditta Sigma Aldrich (eAMV™ RT).

È stata effettuata una prima reazione di PCR utilizzando una miscela di reazione contenente:

- H₂O
- Buffer 10 X (Tris-HCl 100 mM pH 8.3, KCl 500 mM)
- MgCl₂ (15 mM)
- dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- **primer forward 1** (12.5 μM)
- **primer reverse 1** (12.5 μM)
- cDNA
- Taq DNA polimerasi (2.5 unità)

La miscela è stata incubata 5 minuti a 95 °C per iniziare il processo di denaturazione, dopo questa fase preliminare sono iniziati i cicli veri e propri della PCR. Ad ogni ciclo la miscela di reazione è stata incubata a 95 °C per 30 secondi, a 50 °C per 1 minuto, a 72 °C per 1 minuto, per un totale di 35 cicli consecutivi, al termine dei quali la miscela è stata ulteriormente incubata 10 minuti a 72 °C per favorire la *final elongation* delle sequenze di interesse.

Il prodotto di PCR ottenuto è stato utilizzato per la *nested PCR* utilizzando una miscela di reazione contenente:

- H₂O
- Buffer 10 X
- MgCl₂ (15 mM)
- dNTP
- **primer forward 2** (12.5 μM)
- **primer reverse 1** (12.5 μM)
- PCR

Dalla miscela di reazione contenente il primer forward 2 la banda attesa è di circa 456 paia di basi.

Siamo così riusciti a sequenziare parte della porzione interna del gene, a partire dal quale è stato poi possibile progettare il *primer* specifico reverse2 (5'-AGTATAAGCAACACAAATCAAAAGCAC-3') utilizzato per la PCR nested, che ci ha permesso di completare la sequenza interna del gene effettuando una reazione di PCR con la seguente miscela di reazione contenente:

- H₂O
- Buffer 10 X
- MgCl₂ (15 mM)
- dNTP
- **primer forward 1** (12.5 μM)
- **primer reverse 2** (12.5 μM)
- cDNA
- Taq DNA polimerasi (2.5 unità)

Le bande ottenute sono state amplificate e purificate. Il DNA purificato è stato poi utilizzato per la preparazione di campioni che dopo essere stati essiccati a temperatura ambiente vengono spediti alla BMR genomics per il sequenziamento.

Abbiamo così ottenuto la porzione interna del gene (Figura 43) da cui è stato possibile progettare i primer specifici da utilizzare per la strategia 5' 3' RACE.

```

gccttagcattgacaatttgaaaagatcgcccgaagaggttaagcttataaattgatttg
A F S I D N L K R S P E E V K L I I D L

atgatggagaagttggatggcttcagcaaggaagacatatagtgaaatgagatgggata
M M E K L D G F S K E D I L V N E Y G I

agagtgcattgtaaataggtaatttgaaactactaagtgaaggagtcgagttgcggccgaa
R V H V I G N L K L L S E G V R V A A E

aacgctatgaaagctacagcgaaaaataataaatgtgtgcttttgatttggttgcctat
N A M K A T A K N N K C V L L I C V A Y

acttctcgtgatgaaatgaggcatgccgttgaagaatggtgtagagaaaaatggagtg
T S R D E M R H A V E E C C R E K M E C

gaagaattgaagtgtggaattcaaatggcggatgtagagaaaaatagtatatgaaggta
E E L K C G I Q M A D V E K N M Y M K V

gcaccggatcccgatgtg
A P D P D V

```

Figura 43. Porzione interna del gene della *cis*-preniltransferasi. Con le frecce vengono evidenziati utilizzati per la strategia 5',3'RACE.

4.3.3 Caratterizzazione molecolare delle estremità del gene

Per individuare la sequenza delle estremità 5' e 3' del gene della *cis*-preniltransferasi è stato utilizzato un kit fornito dalla ditta Roche (5',3'RACE 2nd generation). Sono stati utilizzati i seguenti reagenti:

- cDNA synthesis buffer 5X
- Transcriptor Reverse Transcriptase
- Deoxynucleotide mix
- dATP
- Reaction Buffer 10 X
- Terminal Transferase (recombinant)

Per la metodica 5'RACE sono stati utilizzati un dT anchor primer e tre primer specifici antisenso (reverse1, reverse2 e reverse3), mentre per la metodica 3' RACE sono stati utilizzati un oligodT anchor primer, un anchor primer e due primer senso (forward1, forward2).

Reverse 1	5'-CAACTTCTCCATCATCAAATCAATTAT-3'
Reverse 2	5'-ACTTAGTAGTTTCAAATTACCTATTAC-3'
Reverse 3	5'-TCTTTTCAAATTGTCAATGCTAAAGGC-3'
Forward 1	5'-GTGCTTTTGTGTTGCTTATACT-3'
Forward 2	5'-TCCGGGGAGACAAGACTGAGTAATTTC-3'

Per la sintesi del cDNA è stato utilizzato il primer reverse1 che si ibrida annidandosi alla regione centrale, a circa 300 pb di distanza dall'estremità 5'dell' mRNA. Per la sintesi del cDNA è stata utilizzata un miscela di reazione contenente:

- H₂O sterile
- cDNA synthesis buffer
- dNTP
- **Reverse 1** (12.5 µM)
- Inibitore RNasi
- RNA purificato (1.376 µg)
- Reverse transcriptase

Questa miscela è stata incubata per un'ora a 55 °C e per 5 minuti a 80 °C. Il cDNA così ottenuto è stato purificato utilizzando un kit commerciale della Roche (*High Pure PCR Product*) che sfrutta l'utilizzo di colonnine in polipropilene ad alta affinità per il DNA

Il cDNA purificato è stato poi utilizzato per la reazione di XLPCR. La miscela di reazione conteneva:

- H₂O sterile
- Buffer 10X
- dNTP
- **Reverse 2** (12.5 µM)
- **dT Anchor primer** (37.5 µM)
- cDNA
- Taq polimerasi

Il prodotto della XLPCR è stato utilizzato per la reazione di nested PCR la cui miscela conteneva:

- Buffer 10X
- dNTP
- **Reverse 3** (12.5 μ M)
- **dT Anchor primer** (37.5 μ M)
- Prodotto XLPCR
- Taq polimerasi
- H₂O sterile

La banda attesa è di circa 300 paia di basi, senza considerare le porzioni di sequenza corrispondente alla coda di poliA.

Le bande di interesse sono state ottenute utilizzando un programma che consiste in una fase di denaturazione preliminare a 95 °C per 5 minuti, seguita da 35 cicli veri e propri di PCR che consistono in: un'ulteriore fase di denaturazione a 95 °C per 30 secondi, una fase di annealing di 1 minuto a 50 °C, e una fase di allungamento di 1 minuto a 72 °C. I cicli di PCR sono poi seguiti da una *final incubation* di 10 minuti a 72 °C.

Grazie al sequenziamento delle bande di interesse è stato possibile ottenere la sequenza corrispondente all'estremità 5' del gene.

Per la sintesi del cDNA dell'estremità 3' è stata sfruttata la presenza della coda di poliA fisiologica dell'mRNA, per la sua sintesi però è stato utilizzato un dT anchor primer al posto di un semplice oligo dT.

È stata preparata una miscela di reazione contenente:

- H₂O
- cDna synthesis buffer
- dNTP
- **dT Anchor primer**
- Inibitore delle RNAsi
- RNA purificato (1.376 μ g)
- AMV reverse transcriptase

Questa miscela è stata incubata per un'ora a 55 °C e per 5 minuti a 85 °C. Il cDNA così ottenuto è stato utilizzato per la reazione di PCR. La miscela di reazione conteneva:

- H₂O sterile
- Buffer 10X
- dNTP
- **Forward 1** (12.5 μM)
- **Anchor primer** (12.5 μM)
- Prodotto XLPCR
- Taq polimerasi

Le bande di interesse sono state ottenute utilizzando un programma che consiste in una fase a 95 °C per 5 minuti, seguita da 35 cicli di PCR che consistono in: un'ulteriore fase di denaturazione a 95 °C per 30 secondi, una fase di annealing di 1 minuto a 50 °C, e una fase di allungamento di 1 minuto a 72 °C. I cicli di PCR sono poi seguiti da una *final incubation* di 10 minuti a 72 °C.

Il prodotto di PCR così ottenuto è stato utilizzato per la nested PCR per cui è stata utilizzata una miscela contenente:

- H₂O sterile
- Buffer 10X
- dNTP
- **Forward 2** (12.5 μM)
- **Anchor primer** (12.5 μM)
- Prodotto XLPCR
- Taq polimerasi

Il programma di PCR prevedeva una fase a 95 °C per 5 minuti, seguita da 35 cicli di PCR che consistono in: un'ulteriore fase di denaturazione a 95 °C per 30 secondi, una fase di annealing di 30 secondi a 68 °C, e una fase di

allungamento di 1 minuto a 72 °C. I cicli di PCR sono poi seguiti da una *final incubation* di 10 minuti a 72 °C.

Sono stati necessari diversi esperimenti di nested PCR, infatti le condizioni sperimentali sono state modificate fino ad ottenere la banda di interesse che è stata in seguito purificata e sequenziata.

4.3.4 Purificazione dell'amplificato di DNA e sequenziamento

Le bande di interesse corrispondenti sia alla porzione interna che alle estremità del gene sono state ulteriormente amplificate e purificate da gel in agaroso.

Prima di tutto è stato preparato un gel d'agaroso al 2.5% in TRIS HCl EDTA 1 X.

I prodotti di PCR sono stati riuniti, a questi è stata aggiunta una quantità di blu di bromofenolo pari a 1/5 del volume totale, ed è stata impostata una corsa elettroforetica a 120 V per 50 minuti. Terminata la corsa elettroforetica le bande sono state escisse con un bisturi sterile e sono state purificate utilizzando un kit commerciale fornito dalla ditta Sigma Aldrich (GenElute™ Gel Extraction Kit) che sfrutta l'utilizzo di colonnine ad affinità per il DNA.

Sono state effettuate una prima ed una seconda eluizione aggiungendo rispettivamente 50 e 30 µl di buffer, abbiamo lasciato incubare a temperatura ambiente per un minuto, ed in seguito all'incubazione la colonnina è stata centrifugata a 13000 rpm per un minuto.

Per verificare l'esito della purificazione viene effettuato un controllo elettroforetico in agaroso sia della prima che della seconda eluizione.

Il DNA purificato da gel d'agaroso è stato poi utilizzato per la preparazione dei campioni da inviare al sequenziamento.

5. RISULTATI

5.1 Antiossidanti e composti inibitori dell'attività acetilcolinesterasica

L'attività di un estratto, miscela di più composti, può essere causata dalla presenza di molecole di varia natura chimica che individualmente o sinergicamente esercitano il loro effetto. Con metodi di estrazione diversi si possono ottenere miscele di diversa composizione e quindi attività biologiche di diversa entità.

Metanolo, etanolo e la miscela etere di petrolio/metanolo rientrano tra i più comuni solventi utilizzati nei processi di estrazione, mentre l'utilizzo di acido tricloroacetico è insolito in questi processi. Per il materiale di partenza utilizzato in questo studio, il lattice, (liquido denso, bianco, appiccicoso), il trattamento con TCA si è rivelato il miglior metodo da cui ottenere una soluzione limpida, stabile, immediatamente utilizzabile per la ricerca delle attività biologiche.

Negli estratti preparati a partire dal lattice di *E. characias* è stato valutato il contenuto di *radical scavenger*, di polifenoli, flavonoidi e la capacità inibitoria dell'attività enzimatica della AChE.

Nella figura 44A è riportato l'istogramma relativo alla determinazione dei radical scavenger con i due metodi, ABTS e DPPH. Con il metodo del DPPH in tutti e quattro gli estratti è stato rilevato un minore potere antiossidante rispetto al metodo dell'ABTS. Tale differenza è più marcata per gli estratti in metanolo e in TCA. Dal punto di vista chimico il DPPH risulta quindi meno affidabile nella misurazione dell'attività antiradicalica.

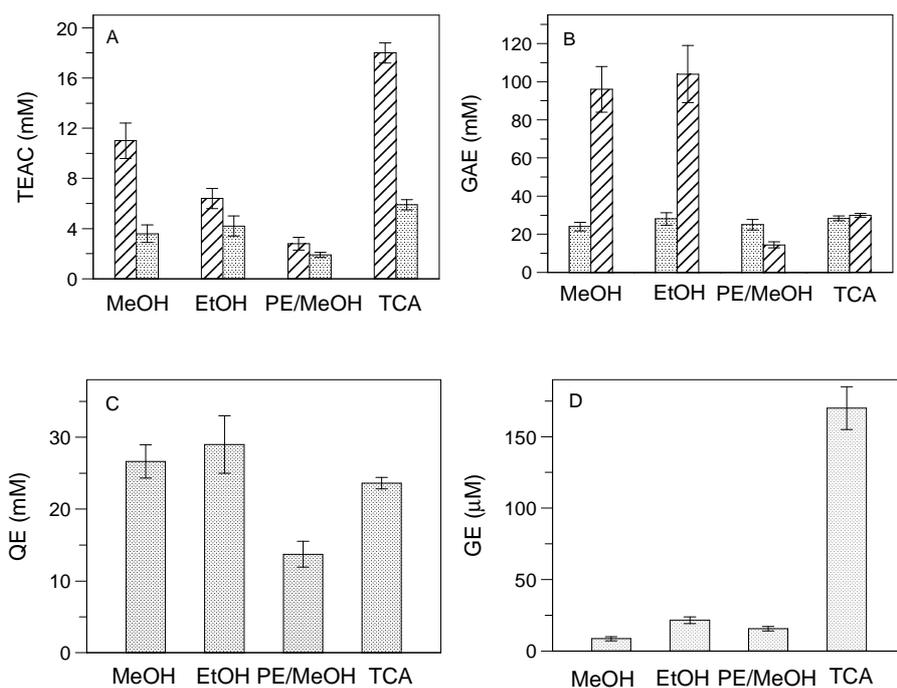
Per entrambi i metodi l'estratto in TCA presenta una maggiore attività antiossidante rispetto agli estratti ottenuti con gli altri tre metodi. Inoltre, analizzando i risultati ottenuti, è emerso che l'attività antiossidante dell'estratto in PE/MeOH aumenta nelle prime tre ore di incubazione, per poi diminuire all'aumentare del tempo d'incubazione, mentre l'attività antiossidante massima degli estratti MeOH e EtOH si ottiene dopo circa 10-12 ore di incubazione.

La figura 44B mostra l'istogramma relativo al contenuto totale di polifenoli determinato con i due metodi, con il reattivo di Folin-Ciocalteu sono state osservate delle minime differenze nel contenuto totale in polifenoli dei quattro estratti. Mentre, utilizzando il metodo enzimatico, il contenuto totale di polifenoli osservato negli estratti in MeOH ed EtOH è risultato quattro volte più alto rispetto al contenuto rilevato con il metodo del Folin-Ciocalteu. Inoltre, con il metodo enzimatico gli estratti in MeOH e EtOH hanno mostrato un contenuto totale di polifenoli rispettivamente 7 e 3 volte maggiore rispetto agli altri estratti in PE/MeOH e TCA. Il contenuto in polifenoli saggiato nell'estratto in PE/MeOH con il metodo enzimatico si è rivelato invece due volte più basso rispetto al contenuto di polifenoli saggiato con il metodo del Folin-Ciocalteu. Per quanto riguarda il contenuto in polifenoli dell'estratto in TCA, non ci sono differenze significative tra i due metodi.

Il contenuto totale di flavonoidi è riportato nella figura 44C. L'estratto in PE/MeOH ha mostrato un contenuto di flavonoidi totale più basso rispetto agli altri tre estratti per i quali i valori ottenuti sono tra loro abbastanza simili.

Tutti gli estratti di *E. characias* hanno mostrato un'attività inibitoria nei confronti dell'enzima AChE.

Nella figura 44D si evidenzia che l'estratto in TCA, confrontato con gli altri tre metodi di estrazione, permette di ottenere il maggiore effetto inibitorio sull'enzima (circa 10 volte maggiore).



Quadro A: Radical scavenging. Metodo dell'ABTS (▨) e del DPPH (▩).
 Quadro B: Polifenoli totali. Metodo del Folin-Ciocalteu (▩) e metodo enzimatico (▨).
 Quadro C: Flavonoidi totali. Metodo del nitrato di alluminio
 Quadro D: Inibitori delle AChE. Saggio di Ellman

Figura 44. Scavenging radicalico, polifenoli, flavonoidi e composti inibitori delle acetilcolinesterasi nei quattro diversi estratti da lattice di *E. characias*.

I risultati dei saggi effettuati sui quattro estratti del lattice di *E. characias* sono riepilogati nella Tabella 2.

Extraction method	Free radical-scavenging compounds		Polyphenols		Flavonoids	AChE inhibitors
	ABTS	DPPH	Folin-Ciocalteu	HRP		
MeOH	11 ± 1.4	3.6 ± 0.7	24 ± 2.3	96 ± 12	26.63 ± 2.3	8.6 ± 1.4
EtOH	6.4 ± 0.8	4.2 ± 0.8	28 ± 3.2	104 ± 15	29 ± 4	21.5 ± 2.3
PE/MeOH	2.8 ± 0.5	1.9 ± 0.2	25 ± 2.8	14.4 ± 1.6	13.7 ± 1.8	15.6 ± 1.6
TCA	18 ± 0.8	5.9 ± 0.4	28.3 ± 1.2	30 ± 1	23.6 ± 0.8	170 ± 15

Tabella 2. Contenuto in antiossidanti ed inibitori delle AChE in estratti del lattice di *E. characias*. Lo scavenging radicalico è espresso come capacità antiossidante di equivalenti di Trolox (TEAC; mM); il contenuto totale di polifenoli è espresso come equivalenti di acido gallico (GAE; mM); il contenuto totale di flavonoidi è espresso in equivalenti di quercetina (QE, mM); il contenuto totale di inibitori delle AChE espresso in equivalenti di galantamina (GE, µM).

Tenendo in considerazione la stabilità dell'estratto in TCA, la possibilità di ottenerlo evitando periodi incubazione più o meno lunghi, la ridotta interferenza con i saggi utilizzati, e i risultati in termini di contenuto di *radical scavenger* e di inibitori dell'AChE, abbiamo ritenuto opportuno proseguire lo studio con questo estratto che è stato sottoposto quindi all'analisi GC-MS.

La Figura 45 mostra il profilo cromatografico dell'estratto in TCA dopo derivatizzazione con TBDMS. Nel cromatogramma si evidenziano diversi picchi tra cui, mediante confronto con il profilo cromatografico di molecole standard, nove sono stati assegnati a differenti composti fenolici: acido benzoico, acido cinnamico, 4-idrossibenzilalcol, tirosolo, acido vanillico, acido *p*-cumarico, acido ferulico, acido sinapico e acido caffeico.

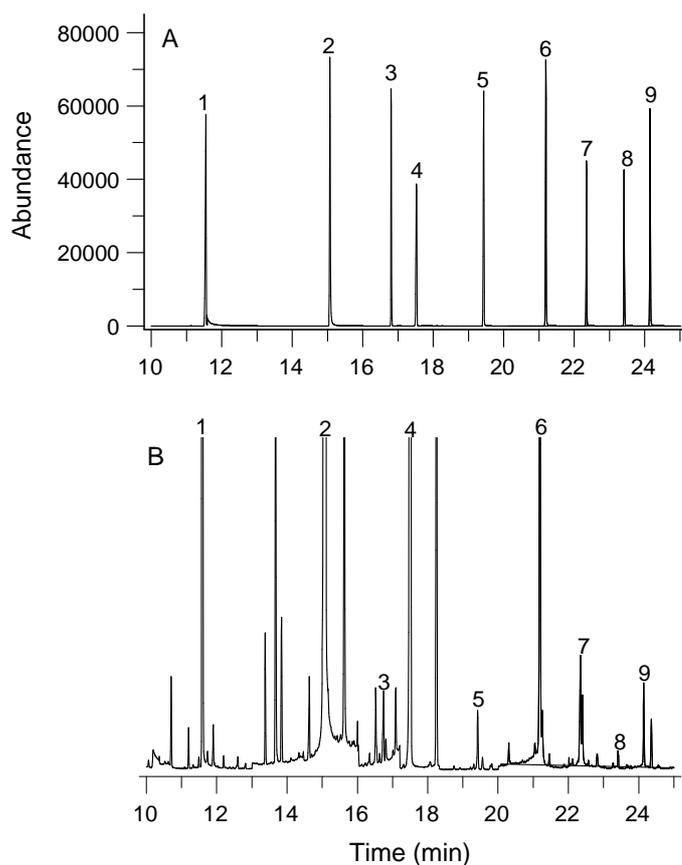


Figura 45. Quadro A: Cromatogramma GC/MS dei derivati TBDMS di nove diversi composti fenolici usati come standard: 1. Acido benzoico; 2. Acido cinnamico; 3. 4-idrossibenzil-alcol; 4. tirosolo; 5. acido vanillico; 6. Acido-*p*-cumarico; 7. acido ferulico; 8. acido sinapico; 9. acido caffeico. Quadro B: Cromatogramma GC/MS dell'estratto in TCA del lattice di *E. characias*.

L'estratto in TCA sottoposto a derivatizzazione con TMS ha mostrato un profilo cromatografico (Figura 46) in cui si identificano, sulla base del cromatogramma standard, due composti flavonoidi come miricetina e quercetina.

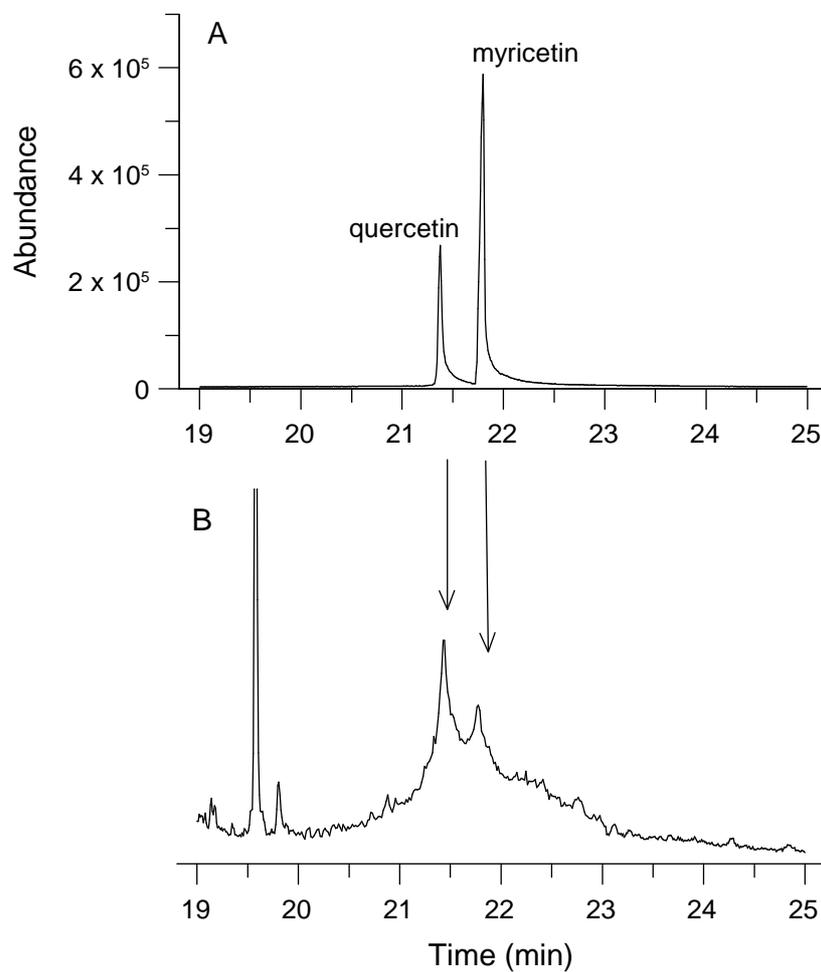


Figura 46. Quadro A: Cromatogramma GC/MS dei derivati TMSi di due composti flavonoidi usati come standard: 1. Quercetina; 2. Miricetina. Quadro B: Cromatogramma GC/MS dell'estratto in TCA del lattice di *E. characias*.

Nella Tabella 3 sono riportati i dati della caratterizzazione tramite EI-MS dei composti identificati.

COMPOUND	Retention time (min)	TBDMS groups ^a	M ⁺	Fragment ions ^{b,c}
benzoic acid	11.53	1	236(0)	221(4), 179 (100), 77(29), 135 (26), 105(40)
cinnamic acid	15.06	1	262(0)	205 (100), 161(28), 145(9), 131 (37), 103(31), 75(22)
4-hydroxybenzyl-alcohol	16.80	2	352(2)	295 (32), 221 (100), 179(9), 147(9), 73(29)
Tyrosol	17.51	2	366(0)	309 (100), 235(37), 219 (55), 193(16), 177(6), 126(8)
vanillic acid	19.42	2	396(0)	339 (100), 295(12), 267 (39), 265(11), 223(10), 193(12), 126(12), 73(18)
p-coumaric acid	21.19	2	392(1)	377(2), 335 (100), 291(13), 261 (26), 73(33), 57(5)
ferulic acid	22.35	2	422(1)	407(4), 365 (100), 293 (53), 249(7), 219(16), 191(7), 146(14), 73(23)
sinapic acid	23.42	2	452(1)	437(4), 395 (100), 323 (64), 279(6), 249(18), 218(5), 161(20), 73(23)
caffeic acid	24.14	3	522(2)	507(4), 465 (100), 293(7), 249(5), 219 (22), 191(7), 73(87)
		TMSi groups		
Quercetin	21.38	5	662(0)	647 (16), 575 (100), 545(1), 517(1), 487 (16), 415(4), 73(51)
Myricetin	21.79	6	750(0)	735 (4), 663 (100), 647(5), 575 (22), 503(3), 73(50)

Tabella 3. Dati acquisiti tramite spettrometria di massa per i derivati TBDMS e TMSi di composti fenolici e acidi benzoici individuati nell'estratto in TCA del lattice di *E. characias*.

Inoltre, mediante confronto con il database NIST, nell'estratto in TCA del lattice di *E. characias*, sono stati identificati diversi composti che comprendono acido 2-idrossipropanoico, acido 2,3-diidrossipropanoico, acido 3-idrossipropanoico, acido 2-idrossi-3-metilbutanoico, acido 4-idrossibutanoico, acido 2-idrossiesanoico, acido 3-fenilpropanoico, acido 3-idrossi-3-fenilpropanoico.

L'analisi GC-MS ha quindi confermato la presenza nell'estratto in TCA di composti noti come molecole antiossidanti (composti 2-9), due noti flavonoidi, tutti i composti identificati mediante NIST, molecole precursori degli inibitori della AChE (composti 2, 6, 8, 9) e un effettivo inibitore della AChE (composto 7).

5.2 Gomma naturale.

Il lattice di *E. characias* contiene una gomma naturale che è stata estratta utilizzando quattro procedure differenti. La gomma grezza ottenuta è stata poi purificata utilizzando cicloesano/etanolo, oppure, limitatamente al trattamento con acetone, utilizzando il benzene.

La gomma ottenuta con le diverse procedure è stata sottoposta ad analisi NMR per verificare la struttura polimerica e per valutare la presenza di

eventuali contaminanti presenti nei diversi campioni. Da questa analisi è stato possibile individuare il metodo di estrazione ottimale per ottenere una gomma naturale con una buona resa, un basso contenuto di contaminanti, e con un buon grado di purezza.

La Figura 55 riporta la resa in gomma espressa in percentuale ottenuta con acetone, acido acetico, TCA e Triton® X-100. Il metodo che ha mostrato una maggiore resa percentuale in gomma e un buon grado di purezza è il metodo estrattivo in acido acetico (14.3%) seguito dal trattamento in cicloesano/etanolo, mentre gli altri metodi hanno mostrato una resa in gomma compresa tra il 7 e il 13%.

La resa in gomma che si ottiene dall'*Hevea brasiliensis* è 30-35 %; la resa migliore da noi ottenuta è quindi decisamente inferiore, mentre è della stessa entità di quella ottenuta da altre piante sia del genere *Ficus* che del genere *Euphorbia*.

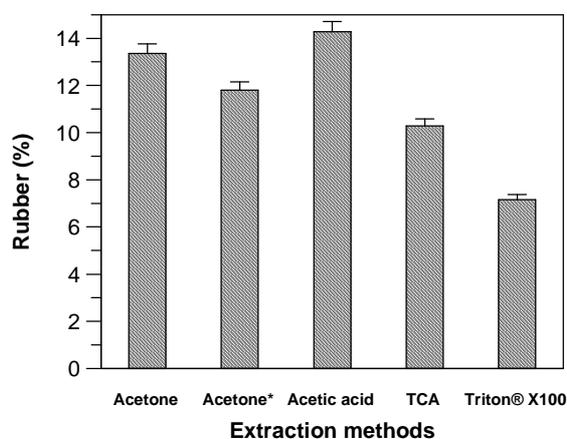


Figura 47. Resa della gomma ottenuta dal lattice di *E. characias* in seguito con le diverse procedure estrattive viste estrazione seguita dalla purificazione in cicloesano/etanolo. Il campione indicato con Acetone* è stato purificato con benzene. I valori sono espressi come percentuale w/v in riferimento ai 100 mL di lattice di partenza.

In base alle preliminari analisi NMR e alla resa, si seleziona la gomma estratta in acido acetico per procedere alla successiva caratterizzazione.

È stato determinato il contenuto in gel che è il 2.5%. La percentuale in resina, ottenuta con il metodo gravimetrico, è il 9.1%; il contenuto in resina

è stato valutato anche spettrofotometricamente. La soluzione di resina in acetonitrile ha uno spettro UV con massimo di assorbimento a 261 nm e un coefficiente di estinzione molare di $3.9 \text{ cm}^{-1} (\text{mg/ml})$. La relazione fra l'assorbanza a 261 nm e la quantità di resina, determinata con il peso della frazione solubile in acetone, è lineare.

La seguente tabella 4 riporta il contenuto in percentuale di acqua resina, gomma, gel e di contaminanti (Tabella 4).

Components	%
Water	72
Rubber ^a	14.3
Gel ^b	2.5
Resin	9.1
Contaminants	6.7

Tabella 4. Percentuali di acqua, gomma, gel, resina e contaminanti nel lattice di *E. characias*. I valori sono espressi come percentuale p/v. (a) Gomma estratta con acido acetico trattata in seguito con cicloesano/etanolo. (b) Percentuale in gel calcolata sul peso totale della gomma estratta.

Per determinare la struttura polimerica della gomma è stata utilizzata l'analisi NMR. Dallo spettro ^1H NMR dell'estratto di gomma in C_6D_6 sono stati rilevati tre picchi principali a 5.31, 2.17 e 1.73 ppm che sono stati attribuiti rispettivamente ai protoni olefinici, metilenici e metilici del *cis*-1,4-poliisoprene. Un altro picco a 4.05 ppm potrebbe essere attribuibile al gruppo metilenico terminale. Il gruppo terminale potrebbe essere un gruppo CH_2OH o un gruppo CH_2OP , lo spettro ^1H NMR però non permette di distinguerli.

Nello spettro ^1H NMR non è stata osservata alcuna risonanza a 4.72 ppm, attribuibile alla presenza di un gruppo estere terminale. Sono stati rilevati diverse risonanze tra 1.65 e 1.56 ppm attribuibili alla configurazione ω -terminale dei gruppi dimetilallilici (1.58 ppm), ai metilprotoni di un'unità *trans*-isoprene ω -*trans*-*trans* (1.62 ppm), e a una sequenza *trans*-*trans*-*cis* (1.64 ppm) (Figura 48).

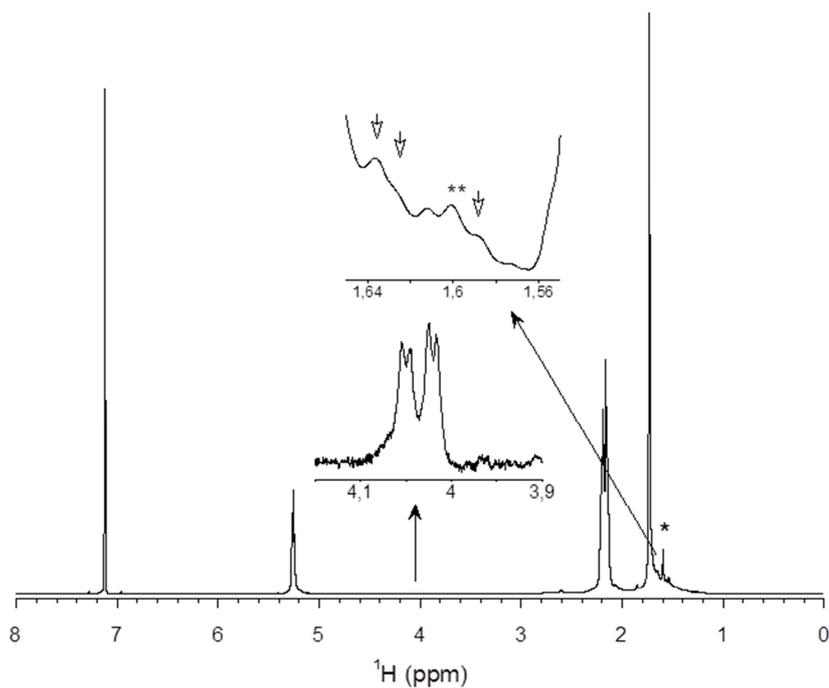


Figura 48: Spettro ^1H NMR della gomma estratta dal lattice di *E. characias* in C_6D_6 . Lo spettro mostra il segnale residuo del cicloesano a 1.43 ppm usato durante la purificazione. Le frecce indicano l'espansione delle regioni 3.9-4.2 e 1.56-1.66 ppm.

Lo spettro ^{13}C NMR mostra picchi caratteristici a 135.2, 125.1, 32.2, 26.4 e 23.4 ppm corrispondenti a due gruppi etilenici, due gruppi metilenici e al carbonio metilico del *cis*-1,4-poliisoprene. Ha mostrato inoltre la presenza di una risonanza caratteristica del C-1 metilenico dell'unità *trans*-isoprene a 40.27, e una risonanza a 59.41 ppm. Considerando quest'ultima risonanza e confrontandola con quella osservata nello spettro ^1H NMR si può affermare che l' α -terminale della gomma di *E. characias* è rappresentato da un gruppo idrossile CH_2OH , infatti la risonanza caratteristica dei gruppi CH_2OP a 64.54 ppm non è stata osservata (Figura 49).

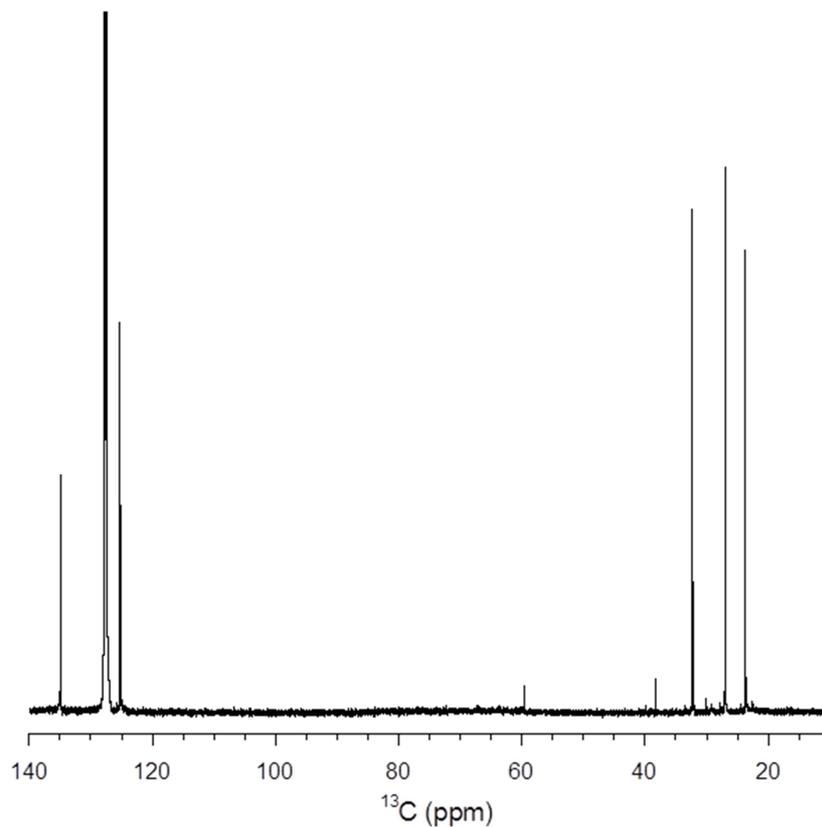


Figura 49: Spettro ^{13}C NMR della gomma estratta dal lattice di *E. characias* in C_6D_6 .

Tramite analisi FT-IR sono state identificate delle bande caratteristiche del *cis*-1,4-poliisoprene a 1664 e 835 cm^{-1} corrispondenti rispettivamente al legame C=C e al legame C-H, è stato quindi possibile confermare la struttura polimerica precedentemente identificata tramite analisi NMR.

Una volta caratterizzata la struttura polimerica, un campione di gomma è stato analizzato tramite GPC per determinare i pesi molecolari. La gomma di *E. characias* mostra una distribuzione dei pesi molecolari unimodale. È stato osservato un peso molecolare medio (M_n) di 31.500 e una massa molecolare media (M_w) pari a 93.000 con indice di dispersione M_w/M_n di 2.9 (Figura 50).

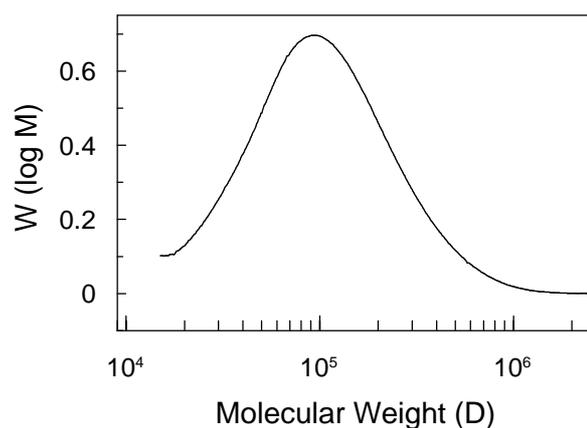


Figura 50: Distribuzione del peso molecolare della gomma naturale estratta dal lattice di *E. characias*.

La gomma estratta dal lattice dell'*E. characias* può essere quindi inclusa tra quelle a basso peso molecolare come quella ottenuta da diverse altre piante. Sebbene l'interesse in campo industriale sia rivolto alle gomme ad alto peso molecolare, è stato riportato l'utilizzo di quelle a basso peso molecolare per ottenere analoghi a bassa viscosità di gomma naturale epossidizzata o per ottenere altri derivati polimerici. Nella tabella5 sono riportate la resa in percentuale e il peso molecolare della gomma estratta da alcune piante per confronto con quella estratta dall'*E. characias*.

Fonte	Resa (%)	Mw
<i>Hevea brasiliensis</i>	30-35	1.680.000
<i>Parthenium argentatum</i>	4-8	1.333.000
<i>Ficus benghalesis</i>	17	1.500.000
<i>Taraxacum koksaghyz</i>	21	2.250.000
<i>Ficus carica</i>	4	190.000
<i>Euphorbia lactiflua</i>	12-20	80.000
<i>E. characias</i>	14.3	93.000

Tabella 5: Resa in gomma e peso molecolare di diverse piante che producono lattice a confronto.

5.3 *Cis*-prenil transferasi

Una volta caratterizzata la struttura polimerica della gomma naturale estratta dal lattice di *E. characias*, lo studio si è rivolto alla caratterizzazione molecolare del gene della *cis*-prenil transferasi, l'enzima principale coinvolto nella sintesi della gomma.

La strategia CODEHOP ci ha permesso di progettare primer parzialmente degenerati che sono stati utilizzati per identificare la porzione interna del gene. Una volta sequenziata la porzione interna del gene sono stati progettati *primer* specifici utilizzati per mettere in atto la strategia 5', 3'RACE utilizzata per identificare le estremità 5' e 3' del gene.

Il cDNA della *cis*-prenyltransferase di *E. characias* contiene un ORF (open reading frame) di 813 paia di basi che si estende dal codone ATG in posizione 28-30 al codone di termine TAG in posizione 840, che codifica per una proteina di 270 amminoacidi (GenBank JX564541) (Figura 51).

L'intera sequenza è stata inserita nel database Blast NCBI per effettuare la sua classificazione. La proteina ha mostrato alta omologia con le proteine appartenenti alla classe proteica delle transferasi, e alla sottoclasse delle *cis*-prenil transferasi.

Dopo aver classificato la proteina sono state ricercate le regioni altamente conservate caratteristiche delle *cis*-prenil transferasi effettuando un allineamento tra la sequenza della *cis*-preniltransferasi estratta da *E. characias* e altre *cis*-preniltransferasi note. Nella nostra sequenza sono state individuate tali regioni implicate sia nel legame con il substrato sia nell'attività catalitica.

```

1      ttcttga tctccatttgtaatctgatcatgtttcaagcacaaagtga taggacaagc aag
          M F Q A Q S D R T S K 11
61     gtgcaat atggaaactctctatac tttttaaaagcatgtgtatttcaaatattatcca aa
          V Q Y G T L Y T F L K A C V F Q I L S K 31
121    ggtcgga ttc caaatcatctcgccttcataatggatggaaatagaaggtacgcaaaaag
          G P I P N H L A F I M D G N R R Y A K K 51
181    atgaact tatcaccgggtgaaggctacagagcgggctcttcagctcttatgaacatactt
          M N L S P G E G Y R A G S S A L M N I L 71
241    aaatattgttggaaactcggcgtaaaatacataactatctacgccttagcattgacaa t
          K Y C W E L G V K Y I T I Y A F S I D N 91
301    ttgaaaag atcgcccgaagaggttaagcttataattgatttgatgatggagaagtggat
          L K R S P E E V K L I I D L M M E K L D 111
361    ggccttcagcaaggaagacatattagtgaatgagtatgggataagagtgca tgtaa taggt
          G F S K E D I L V N E Y G I R V H V I G 131
421    aatttga aactacta agtgaaggagtcggagttgcggccgaaacgc tatgaaagctaca
          N L K L L S E G V R V A A E N A M K A T 151
481    gcgaaaataataaaatgtgtgcttttgatttgtgttgcttatacttctcgtgatgaaatg
          A K N N K C V L L I C V A Y T S R D E M 171
541    aggcatg ccg ttgaa gaatgttg tagagaaaaaatggagtgtgaaga attga agtgtgga
          R H A V E E C C R E K M E C E E L K C G 191
601    attcaaa tggcggatgtagagaaaaatgtatataatgaaggtagcacc gga tcccgatgtg
          I Q M A D V E K N M Y M K V A P D P D V 211
661    gtgat tccggacttccggggagac aagactgagtaatttcttgctttggcagggcgagttat
          V I R T S G E T R L S N F L L W Q A S Y 231
721    agtgtgt tgtatgctccggctac gctttggccggagattgggtctgtgggagtggtgtct
          S V L Y A P A T L W P E I G L W E L V S 251
781    agtgttt taaagttc caacgacattattcttacttagataagaaaaagatac agc tatag
          S V L K F Q R H Y S Y L D K K K I Q L End 270

```

Figura 51. Sequenza nucleotidica e amminoacidica della cis-preniltransferasi estratta dagli apici di *E. characias* (GenBank JX564541).

Considerando le cinque regioni conservate (I-V), è emerso un più alto grado di omologia di sequenze con le altre *cis*-prenil transferasi (Figura 52).

In accordo con il modello strutturale proposto da Takahashi e Koyama (2006), i residui di arginina R46, R47, R214, R220, potrebbero essere implicate nell'interazione con il difosfato carico negativamente del substrato. R46 and R47, presenti nella regione conservata I, legherebbero l'iniziatore farnesilpirofosfato (FPP), mentre l'isopentenilpirofosfato (IPP) può interagire con le cariche positive dei residui R214 e R220, localizzati nella regione conservata V.

6. CONCLUSIONI

Dai risultati ottenuti è emerso che il lattice di *E. characias* presenta al suo interno composti antiradicalici, polifenoli, flavonoidi e composti inibitori dell'attività acetilcolinesterasica.

Tali risultati hanno aggiunto ulteriori informazione sul ruolo del lattice all'interno della pianta, permettendoci di collocare i composti antiossidanti, insieme ad alcune proteine già identificate nel lattice, tra le sostanze coinvolte nei meccanismi di difesa della pianta.

Dall'analisi GC-MS sull'estratto in TCA è stata confermata la presenza di diversi composti antiossidanti, come due flavonoidi noti come la quercetina e la miricetina, diversi precursori di composti inibitori delle AChE come l'acido cinnamico, acido *p*-cumarico, acido sinapico e acido caffeico, e un vero inibitore delle AChE, l'acido ferulico.

Considerando i risultati ottenuti possiamo quindi affermare che il trattamento del lattice con TCA si è rivelato il metodo più efficace, più veloce, immediato e facilmente riproducibile rispetto agli altri tre metodi utilizzati (MeOH, EtOH, PE/MeOH) che richiedono dalle 3 alle 12 ore di incubazione.

Inoltre la contemporanea presenza al suo interno di composti antiradicalici e di composti inibitori delle AChE, in combinazione con la presenza di composti fenolici fanno sì che tale estratto possa avere promettenti applicazioni pratiche nel campo farmacologico.

Dal lattice di *E. characias* è stata estratta, purificata e caratterizzare una gomma naturale a basso peso molecolare con una distribuzione dei pesi molecolari unimodale e una massa molecolare media di 93.000. Sulla base della spettroscopia ¹H NMR, ¹³C NMR e FT-IR, la gomma estratta da *E. characias* ha la struttura polimerica caratteristica del *cis*-1,4-poliisoprene.

È noto che piante di specie diverse producono gomme naturali con diverse dimensioni molecolari. Il peso molecolare è una caratteristica fondamentale della gomma da cui dipende la qualità del polimero. La gomma a basso peso molecolare, come la gomma da noi caratterizzata, risulta inutilizzabile per applicazioni ad alta prestazione ma trova comunque delle applicazioni

commerciali, può infatti essere utilizzata per la sintesi di derivati sintetici della gomma naturale.

Anche la resa percentuale rappresenta un dato importante per la valutazione della gomma naturale. La resa in gomma dell' *E. characias* risulta molto più bassa rispetto a quella dell' *Hevea brasiliensis*, risulta però simile alla resa ottenuta da altre piante che contengono tra il 6 e il 12% di gomma, e circa venti volte superiore rispetto alla resa dall'estrazione della pianta *Artocarpus heterophyllus* (jackfruit) che presenta una percentuale di gomma tra lo 0.4 e lo 0.7 %.

La gomma viene sintetizzata, all'interno di particelle microscopiche presenti nel lattice, da un insieme di proteine. L'enzima implicato nel processo di allungamento del polimero è la *cis*-preniltransferasi.

È stato ottenuto e sequenziato il cDNA della *cis*-preniltransferase di *E. characias* che presenta una sequenza nucleotidica di 813 paia di basi e una sequenza amminoacidica di 270 amminoacidi.

La sequenza da noi ottenuta ha mostrato alta omologia con le proteine che fanno parte della classe delle transferasi, sottoclasse *cis*-preniltransferasi (EC 2.5.1.20) e presenta tutte le cinque regioni altamente conservate, importanti per l'attività catalitica dell'enzima, presenti in questa classe di enzimi.

Il lattice di *E. characias* rappresenta quindi una fonte naturale di composti bioattivi che potrebbero avere applicazioni in campo farmacologico, e polimeri naturali a basso peso molecolare che potrebbero avere applicazioni commerciali per la sintesi di derivati della gomma naturale.

Con questo studio abbiamo quindi aggiunto ulteriori dati sul lattice, un prodotto della pianta dalla composizione notevolmente eterogenea, con la finalità di ampliare le conoscenze sul suo ruolo fisiologico e sulle caratteristiche della pianta *Euhorbia characias*.

Bibliografia

- Appendino G, Belloro E, Tron GC, Jakupovic J and Ballero M. (2000). Polycyclic diterpenoids from *E. characias*. *Fitoterapia*. 71: 134-142.
- Asawatreratanakul K, Zhang YW, Wititsuwannakul D, Wititsuwannakul R, Takahashi S, Rattanapittayaporn A, Koyama T. (2003) Molecular cloning, expression and characterization of cDNA encoding cis-prenyltransferases from *Hevea brasiliensis*. A key factor participating in natural rubber biosynthesis. *Eur J Biochem*. 270(23):4671-80.
- Barbieri L, Falasca A, Franceschi C, Licastro F, Rossi CA, Stirpe F. (1983). Purification and properties of two lectins from the latex of the euphorbiaceous plants *Hura crepitans* L. (sand-box tree) and *E. characias* L. (Mediterranean spurge). *Biochem J*. 215(3):433-439.
- Barla A, Öztürk M S, Kültür and Öksüz S. (2007). Screening of antioxidant activity of three *Euphorbia* species from Turkey. *Fitoterapia*. 78: 423-425
- Bauer G, Gorb SN, Klein MC, Nellesen A, von Tapavicza M, Speck T. (2014). Comparative study on plant latex particles and latex coagulation in *Ficus benjamina*, *Campanula glomerata* and three *Euphorbia* species. *PLoS One*. 9(11).
- Bratt K, Sunnerheim K, Bryngelsson S, Fagerlund A, Engman L, Andersson RE, Dimberg LH. (2003). Avenanthramides in oats (*Avena sativa* L.) and structure-antioxidant activity relationships. *J. Agric. Food Chem*. 51:594-600.
- Bruni R, Muzzoli M, Ballero M., Loi MC, Fantin G., Poli F and Sacchetti G. (2004). Tocopherols, fatty acids and sterols in seeds of four Sardinian wild *Euphorbia* species. *Fitoterapia*. 75: 50–61.
- Buranov AU, Elmuradov B. (2010). Extraction and characterization of latex and natural rubber from rubber-bearing plants. *J Agric Food Chem*. 58: 734–743.
- Bushman BS, Scholte AA, Cornish K, Scott DJ, Brichta JL, Vederas JC, Ochoa O, Micheltore RW, Shintami DK, Knapp SJ. (2006). Identification and comparison of natural rubber from two *Lactuca* species. *Phytochemistry*. 67: 2590–2596.
- Castañeda Arriaga R, Alvarez-Idaboy JR. (2014). Lipoic acid and dihydrolipoic acid. A comprehensive theoretical study of their antioxidant activity supported by available experimental kinetic data. *J Chem Inf Model*. 54(6): 1642-52.
- Cateni F, Zilic J, Altieri T, Zacchigna M, Procida G, Gaggeri R, Rossi D, Collina S. (2014). Lipid metabolites with free-radical scavenging activity from *Euphorbia helioscopia* L. *Chem Phys Lipids*. 181:90-8.
- Chakravartula SV, Guttarla N. (2007). Identification and characterization of phenolic compounds in castor seed. *Nat Prod Res*. 21(12):1073-7.
- Chandrasekara A, Shahidi F. (2010). Content of insoluble bound phenolics in millets and their contribution to antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem*. 58: 6706-6714.

- Chougale AD, Bhosale PM, Jadhav UU and Padul MV. (2011). Antibacterial and antioxidant activity of plant latex. *J. Pharm. Res.* 4: 406-407.
- Cornish K, Chapman MH, Nakayama FS, Vinyard SH, Whiteand LC. (1999). Latex quantification in guayule shrub and homogenate. *Ind Crop Prod.* 10: 121–136.
- Cornish, K (2001). Biochemistry of natural rubber, a vital raw material, emphasizing biosynthetic rate, molecular weight and compartmentalization, in evolutionarily divergent plant species. *Nat Prod Rep.* 18: 182–189.
- Cornish, K. (2001). Similarities and differences in rubber biochemistry among plant species. *Phytochemistry.* 57: 1123–1134.
- Cotgreave LA, Moldeus P, Orrenius S. (1988). Host biochemical defence mechanism against prooxidants. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 28, 189-212.
- Davis CB, Markey CE, Busch MA, Busch KW. (2007). Determination of capsaicinoids in habanero peppers by chemometric analysis of UV spectral data. *J. Agric. Food Chem.* 55:5925-5933.
- Duthie GG, Brown KM. (1994). Reducing the risk of cardiovascular disease. In *Functional Foods: Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals.* Goldberg, I., Ed.; Chapman & Hall: New York, NY, USA,; pp. 19-38.
- Fallarero A, Oinonen P, Gupta S, Blom P, Galkin A, Mohan CG, Vuorela PM. (2008). Inhibition of acetylcholinesterase by coumarins: The case of coumarin 106. *Pharmacological Research* 58 215–221.
- Félix-Silva J, Souza T, Camara RB, Cabral B, Silva-Júnior AA, Rebecchi IM, Zucolotto SM, Rocha HA, Fernandes-Pedrosa Mde F. (2014). In vitro anticoagulant and antioxidant activities of *Jatropha gossypifolia* L. (*Euphorbiaceae*) leaves aiming therapeutical applications. *BMC Complement Altern Med.* doi: 10.1186/1472-6882-14-405.
- Fujihashi M, Zhang YW, Higuchi Y, Li X-Y, Koyama T & Miki K.(2001). Crystal structure of cis-prenyl chain elongating enzyme, undecaprenyl diphosphate synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 4337–4342.
- Fujikura K, Zhang YW, Fujihashi M, Miki K, Koyama T. (2003). Mutational analysis of allylic substrate binding site of *Micrococcus luteus* B-P 26 undecaprenyl diphosphate synthase. *Biochemistry.* 42(14):4035-41.
- Fujikura K, Zhang YW, Yoshizaki H, Nishino T, Koyama T. (2000). Significance of Asn-77 and Trp-78 in the catalytic function of undecaprenyl diphosphate synthase of *Micrococcus luteus* B-P 26. *J Biochem.* 128(6):917-22.
- Garazd MM, Garazd, YL, Khilya VP. (2003). Neoflavones. 1. Natural distribution and spectral and biological properties. *Chem. Nat. Comp.*, 39, 54-121.
- Giordani R, Trebaux J, Masi M, Regli P. (2001). Enhanced antifungal activity of ketoconazole by *E. characias* latex against *Candida albicans*. *J Ethnopharmacol.* 78(1):1-5.

- Gnecco S, Pooley A, Lefimil C, Pino C, Valenzuela L. (1997) Chlorination of low-molecular weight *Euphorbia lactiflua* natural rubber *Polym Bull.* 39, 605–612.
- Grayer RJ, Veitch NC. Flavanones and dihydroflavonols. In *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. Anderson. OM, Markham KR. Eds.; CRC Press/Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA. pp. 918-1002.
- Gu J, Feng R, Wu Z, Guan S, Guo J, Cheng C, Xu P, Zhang J, Wang Y, Qu H, Man W, Yu W, Cui Y, Guan S, Guo D. (2013). A rapid and convenient method for preparative separation of three indissolvable polyphenols from *Euphorbia pekinensis* by the flexible application of solvent extraction combined with counter-current chromatography. *J Sep Sci.* 36(14):2366-72.
- Gupta A and Gupta R. (1997). A survey of plants for presence of cholinesterase activity. *Phytochemistry.* 46. (5): 827 831.
- Hagel JM, Yeung EC and Facchini PJ. (2008). Got milk? The secret life of laticifers. *Trends Plant Sci.* 13, 631-639.
- Helmboldt H and Heirseemann M. (2009). Synthetic studies toward jatrophone diterpenes from *E. characias*. Enantioselective synthesis of (–)-15-*O*-Acetyl-3-*O*-propionyl-17-norcharaciol. *J. Org. Chem.* 74, 1698-1708.
- Hillhouse B J, Ming DS, French CJ, and Towers GHN. (2004). Acetylcholine esterase inhibitors in *Rhodiola rosea*. *Pharmaceutical Biology.* 42(1):68–72.
- Howes MJ, Perry RNSL, and Houghton PJ. (2003). Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer’s disease and other cognitive disorders. *Phytotherapy Research.* 17(1):1–18.
- Ingkaninan K, Temkitthawon P, Chuenchom K, Yuyaem T, Thongnoi W. (2003). Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *J Ethnopharmacol.* 89(2-3):261-4.
- Ji HF and Zhang HY. (2008). Multipotent natural agents to combat Alzheimer’s disease. Functional spectrum and structural features. *Acta Pharmacologica Sinica.* 29(2):143–151.
- Kang DH, Ha SK. (2014). Uric Acid Puzzle: Dual Role as Anti-oxidant and Pro-oxidant. *Electrolyte Blood Press.* 12(1):1-6.
- Kang H, Kim YS, Chang GC. (2000). Characterization of natural rubber biosynthesis in *Ficus benghalensis*. *Plant Physiol Biochem.* 38: 979–987.
- Kang JH, Gonzales-Vigil E, Matsuba Y, Pichersky E, and Barry CS. (2014). Determination of Residues Responsible for Substrate and Product Specificity of *Solanum habrochaites* Short-Chain cis-Prenyltransferases. *Plant Physiol.* 164(1): 80–91.
- Kang, H, Hang M Y, Han K. (2000). Identification of natural rubber and characterization of rubber biosynthetic activity in fig tree. *Plant Physiol.* 123: 1133–1142.

- Karlsson E, Mbugua PM, Rodriguez-Ithurralde D (1984). Fasciculins, anticholinesterase toxins from the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps*. *J Physiol (Paris)*. 79(4):232-40.
- Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M.(1999). Quantitation of flavonoid constituents in citrus fruits. *J. Agric. Food Chem.* 47:3565-3571.
- Kekwick RGO. (2001). Latex and Laticifers. In *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Chichester. UK pp.1-6.
- Kharel Y & Koyama T (2003) Molecular analysis of cis-prenyl chain elongating enzymes. *Nat Prod Report* 20: 111-118
- Kharel Y, Takahashi S, Yamashita S and Koyama T. (2005). Manipulation of prenyl chain length determination mechanism of cis-prenyltransferases. *The FEBS Journal*.
- Kim KH, Tsao R, Yang R, Cui SW. (2006). Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chem.* 95:466-473.
- Lee SH, Sancheti SA, Bafna MR, Sancheti SS and Seo SY. (2011). Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of *Rhododendron yedoense* var. *Poukhanesense* bark. *J. Med. Plant. Res.* 5:248–254.
- Maláková J, Nobilis M, Svoboda Z, Lída M, Holcapek M, Kvetina J, Klimes J, Palicka V. (2007). High-performance liquid chromatographic method with UV photodiode-array, fluorescence and mass spectrometric detection for simultaneous determination of galantamine and its phase I metabolites in biological samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 853(1-2):265-74.
- Mansouri A., Embarek G, Kokkalou E, Kefalas P. (2005). Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chem.* 89:411–420.
- Maxwell SJR. (1995). Prospect for the use of antioxidant therapies. *Drugs.* 49: 345-361.
- Mazur WM, Duke JA, Wahala K, Rasku S, Adlercreutz H. (1998). Isoflavonoids and lignans in legumes: Nutritional and health aspects in Humans. *J. Nutr. Biochem.*9: 193-200.
- Medda R, Pintus F, Spanò D, Floris G. (2011). Bioseparation of Four Proteins from *E. characias* Latex: Amine Oxidase, Peroxidase, Nucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase, and Purple Acid Phosphatase. *Biochem Res Int.* 1-7.
- Mekkriengkrai D, Ute K, Swiezewska E, Chojnacki T, Tanaka Y, Sakdapipanic JT. (2004). Structural characterization of rubber from jackfruit and *Euphorbia* as a model of natural rubber. *Biomacromolecules.* 5: 2013–2019.
- Milner JA. (1994). Reducing the risk of cancer. In *Functional Foods: Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals*. Goldberg, I., Ed.; Chapman & Hall: New York, NY, USA: pp. 39-70.
- Moon JK and Shibamoto T.(2009). Antioxidant assays for plant and food components. *J. Agr. Food Chem.* 57:1655-1666.

- Moreno MIN., Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. (2000). Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J. Ethnopharmacol.* 71: 109–114.
- Moulin A, Teissère M, Bernard C, Piéroni G. (1994). Lipases of the euphorbiaceae family: purification of a lipase from *E. characias* latex and structure-function relationships with the B chain of ricin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 24, 11328-32.
- Mukherjee PK, Venkatesan K, Mainak Malb, Houghton PJ. (2007). Acetylcholinesterase inhibitors from plants *Phytomedicine* 14 289–300.
- Niki E. (2014). Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: in vitro and in vivo evidence. *Free Radic Biol Med.* 66: 3-12.
- Nugroho A, Rhim TJ, Choi MY, Choi JS, Kim YC, Kim MS, Park HJ. (2014). Simultaneous analysis and peroxynitrite-scavenging activity of galloylated flavonoid glycosides and ellagic acid in *Euphorbia supina*. *Arch Pharm Res.* 37(7):890-8.
- Ogura K & Koyama T.(1998). Enzymatic aspects of iso-prenoid chain elongation. *Chem Rev* 98. 1263-1276.
- Ohya N, Takizawa J; Kawahara S; Tanaka Y. (1998). Molecular-weight distribution of polyisoprene from *Lactarius volemus*", *Phytochemistry.* 48(5): 781-786.
- Onor ML, Trevisiol M, Aguglia E. (2007). Rivastigmine in the treatment of Alzheimer's disease: an update. *Clinical Interventions in Aging* . 2(1): 17–32.
- Palmer Taylor. (2006). Sostanze ad attività anticolinesterasica. *Le basi farmacologiche della terapia.. Goodman & Gillman.* Capitolo 8. XI edizione
- Palomino-Schätzlein M, Escrig PV, Boira H, Primo J, Pineda-Lucena A, Cabedo N. (2011). Evaluation of Non polar Metabolites in plant Extracts by ¹³C NMR Spectroscopy. *J.Agric.Food.Chem.* 59:11407-11416.
- Pearson CH, Cornish K, McMahan CM, Rath DJ, Whalen M. (2010). Agronomic and natural rubber characteristics of sunflower as a rubber-producing plant. *Ind Crop Prod.*31: 481–491.
- Pintus F, Medda R, Rinaldi AC, Spanò D and Floris G. (2010). *Euphorbia* latex biochemistry: Complex interactions in a complex environment. *Plant Biosystem.* 144: 381-391.
- Prior RL, Lazarus SA, Cao G, Muccitelli H, Hammerstone JF.(2001). Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 49:1270-1276.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.*26(9-10): 1231–1237.
- Rhee IK, van de Meent M, Ingkaninan K, Verpoorte R. (2001). Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel

thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *J. Chromatogr. A* 915: 217-233.

-Ruan HL, Zhou XF, Zhang YH, Pi HF, Wu JZ, Sun HD. (2007). Ferulic acid esters from *Euphorbia hylonoma*. *Fitoterapia. Jan.* 78(1):72-3.

-Salvucci ME, Coffelt TA, Cornish K. (2009). Improved methods for extraction and quantification of resin and rubber from guayule. *Ind Crop Prod.* 30: 9–16.

-Sato T, Kinoshita M, Yamamoto T, Ito M, Nishida T, Takeuchi M, Saitoh D, Seki S, Mukai Y. (2015). Treatment of irradiated mice with high-dose ascorbic Acid reduced lethality. *PLoS One.* 10(2):1-15.

-Sawasdee P, Sabphon C, Sitthiwongwanit D and Kokpol U. (2009). Anticholinesterase activity of 7-methoxyflavones isolated from *Kaempferia parviflora*. *Phytotherapy Research.* 23(12):1792-1794.

-Shahwar D, Rehman SU and Asam Raza M (2010) Acetylcholinesterase inhibition potential and antioxidant activities of ferulic acid isolated from *Impatiens bicolor* Linn. *Journal of Medicinal Plants Research.* 4(3):260-266.

-Shi QW, Su XH and Kiyota H. (2008). Chemical and Pharmacological Research of the Plants in Genus *Euphorbia*. *Chem. Rev.* 108: 4295-4327.

Si W, Gong J, Tsao R, Kalab M, Yang R, Yin Y. (2006). Bioassay-guided purification and identification of antimicrobial components in Chinese green tea extract. *J. Chromatogr. A.* 1125:204-210.

-Song Y, Jeong SW, Lee WS, Park S, Kim YH, Kim GS, Lee SJ, Jin JS, Kim CY, Lee JE, Ok SY, Bark KM, Shin SC. (2014). Determination of Polyphenol Components of Korean Prostrate Spurge (*Euphorbia supina*) by Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Overall Contribution to Antioxidant Activity. *J Anal Methods Chem.* doi: 10.1155/2014/418690

-Spanò D, Pintus F, Esposito F, Loche D, Floris G, Medda R. 2015. *E. characias* latex: micromorphology of rubber particles and rubber transferase activity. *Plant Physiol Biochem.* 87:26-34.

-Stevanato R, Fabris S, Momo F. (2004). New Enzymatic method for the determination of total phenolic content in tea and wine. *J. Agr. Food Chem.* 52: 6287–6293.

-Takahashi S & Koyama. (2006). Structure and Function of *cis*-prenyl chain elongating enzymes. *Chem. Rec.* 6(4):194-205.

-Tsao R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients.*2: 1231-1246.

-Tsao R, McCallum J. (2009). Chemistry of Flavonoids. In *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability.* de la Rosa, L.A., Alvarez-Parrilla E., Gonzalez-Aguilar G., Blackwell Publishing: Ames, IA, USA. Chapter 5, pp. 131-153.

-Tsao R, Yang R, Young JC, Zhu H. (2003). Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *J. Agric. Food Chem.* 51: 6347-6353.

- Tsumbu CN, Deby-Dupont G, Tits M, Angenot L, Frederich M, Kohnen S, Mouithys-Mickalad A, Serteyn D, Franck T. (2012). Polyphenol content and modulatory activities of some tropical dietary plant extracts on the oxidant activities of neutrophils and myeloperoxidase. *Int J Mol Sci.* 13(1):628-50.
- Valente C; Pedro M, Duarte A, Nascimento MSJ, Abreu PM, Ferreira MJU. (2004). Bioactive diterpenoids, a new jatrophone and two ent-abietanes, and other constituents from *Euphorbia pubescens*. *J. Nat. Prod.* 67: 902.
- Wagner S, Bublin M, Hafner C, Kopp T, Allwardt D, Seifert U, Arif SA, Scheiner O, Breiteneder H. (2007). Generation of allergen-enriched protein fractions of *Hevea brasiliensis* latex for in vitro and in vivo diagnosis. *Int Arch Allergy Immunol.* 143: 246–254.
- Wang H, Murphy PA. (1994). Isoflavone content in commercial soybean foods. *J. Agric. Food Chem.* 42: 1666-1673.
- Wang KC & Ohnuma S (2000) Isoprenyl diphosphate synthases. *Biochim Biophys Acta* 1529: 33-48.
- Yu F, Lu S, Yu F, Feng S, McGuire PM, Li R, Wang R. (2006). Protective effects of polysaccharide from *Euphorbia kansui* (*Euphorbiaceae*) on the swimming exercise-induced oxidative stress in mice. *Can J Physiol Pharmacol.* 84(10):1071-9.
- Yvette Fofie NB, Sanogo R, Coulibaly K, Kone-Bamba D (2015). Minerals salt composition and secondary metabolites of *Euphorbia hirta* Linn., an antihyperglycemic plant. *Pharmacognosy Res.* 7(1):7-13.
- Zhang WK, Yang GE, Li Q, Zhang XQ, Ye WC. (2006). Studies on chemical constituents of *Euphorbia sororia*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 31(20):1694-6.
- Zhang YP, Song CY, Yuan Y, Eber A, Rodriguez Y, Levitt RC, Takacs P, Yang Z, Goldberg R, Candiotti KA. (2013). Diabetic neuropathic pain development in type 2 diabetic mouse model and the prophylactic and therapeutic effects of coenzyme Q10. *Neurobiol Dis.* 58: 169-78
- Zhao B, Mochhala SM, Tham SY. (2004). Biologically active components of *Physostigma venenosum*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 812(1-2):183-92.
- Zhao F, Watanabe Y, Nozawa H, Daikonnya A, Kondo K., Kitanaka S. (2005). Prenylflavonoids and phloroglucinol derivatives from Hops (*Humulus lupulus*). *J. Nat. Prod.* 68: 43-49.

PUBBLICAZIONI

1) Pintus F, Spanò D, **Mascia C**, Macone A, Floris G and Medda R. (2013). Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of *E. characias* latex. *Records of natural products* 7(2):147-151

2) Spanò D, Pintus F, **Mascia C**, Scorciapino MA, Casu M, Floris G and Medda R. (2012). Extraction and characterization of a natural rubber from *E. characias* latex. *Biopolymers* 97(8):589-594.

3) Spano D, Pintus F, **Mascia C**, Macone A, Floris G, Medda R. Natural rubber and antioxidants in *E. characias* latex IUBMB&FEBS CONGRESS, Sevilla, September 4th-9th, 2012 (FEBS J. Vol. 279 Special Issue: SI Supp. 1 Page: 74)

SEQUENZE DEPOSITATE IN GenBank

JX564541 *E. characias cis-prenyltransferase mRNA, complete cds*

Spanò D., Marrosu E., **Mascia C.**, Medda R., Floris G. and Pintus F.

AFU61137 *cis-prenyltransferase [E. characias] (Protein)*

Spanò D., Marrosu E., **Mascia C.**, Medda R., Floris G. and Pintus F.

Ringraziamenti

Un ringraziamento speciale a Marco, a Gaia, alla mia famiglia e ai miei amici più cari che mi hanno sempre supportato nei momenti di sconforto e non hanno mai smesso di credere in me.

Questa esperienza per me è stata davvero importante, ricca di sfide e di soddisfazioni, e nonostante gli alti e i bassi, dovendo tornare indietro, non c'è nulla che non rifarei.

In questi tre anni ho imparato tante cose, ho imparato che nel lavoro come nella vita non sempre le cose vanno come tu vorresti che vadano, l'importante è credere in se stessi, andare avanti e lottare.

Tre anni fa non avrei mai detto di amare così tanto il mio lavoro, e con un pizzico di malinconia mi sento di dire che mi mancherà tantissimo.