

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CAGLIARI
FACOLTA' DI FARMACIA
DIPARTIMENTO FARMACO-CHIMICO-TECNOLOGICO



Dottorato di Ricerca

XIX Ciclo

‘Tecnologia e legislazione del farmaco e delle molecole bioattive’

Settore Scientifico Disciplinare: CHIM/08

Estrazioni di sostanze naturali da piante della flora sarda:

Struttura e applicazioni

*Chemorecezione gustativa: sintesi e relazioni attività-struttura di
molecole attive sul sapore*

Dottoranda : M.Bonaria Carrea

Relatore : Prof. Gianfranco Seu

Anno Accademico: 2003-2006

PREFAZIONE

La ricerca biomedica nel corso degli anni si è impegnata nella scoperta di nuovi farmaci al fine di avere dei composti con meccanismi di azione il più possibile selettivi e in grado di esplicare la loro azione biologica con minor numero di effetti collaterali.

Oltre il 40% dei farmaci di uso corrente sono composti naturali o sostanze ispirate o derivate da composti naturali, e la complessità strutturale e la ricchezza di gruppi funzionali dei composti naturali sono ideali per la modulazione della loro attività.

Queste considerazioni spiegano come la fitochimica, strettamente correlata alla fitoterapia, sia una fonte di conoscenze utili nella ricerca di nuovi farmaci.

La flora mediterranea è considerata il terzo focolaio di biodiversità vegetale al mondo dopo l'Amazzonia e il Sud-Est asiatico, tuttavia ancora poche piante di quest'area sono state studiate dal punto di vista chimico e farmacologico.

Questa tesi di dottorato è incentrata sullo studio di alcune piante della Sardegna al fine di individuare nuovi composti attivi. In particolare è stata avviata un'indagine sullo studio della chemorecezione gustativa, che comprende lo studio di composti organici attivi sul gusto (sia naturali che di sintesi) di interesse per l'industria farmaceutica e alimentare, e la delucidazione dei meccanismi di chemorecezione dei sapori .

Alla parte più propriamente sperimentale è stata premessa una rassegna sui meccanismi del gusto dell'amaro.

INDICE

1 – INTRODUZIONE

2 - PIANTE ALIMENTARI E SALUTE

2.1 - L'amaro

2.2.1 - La chemorecezione gustativa.

2.2.2 - Il sistema recettoriale del gusto.

2.2.3 - Trasduzione degli stimoli gustativi amari.

2.2.4 - La varietà strutturale dei composti amari

3- I TERPENI

3.1- Biosintesi dei terpeni

4 - DEFINIZIONE E SCOPO DEL LAVORO

4.1 - La pianta del carciofo

4.1.1- Utilizzo e proprietà

5 - PARTE SPERIMENTALE

5.1 - Estrazione e cromatografia

5.1.1 - Descrizione del metodo di estrazione

5.1.2 - Eliminazione della clorofilla

5.1.3 - Eliminazione della fase acquosa dalla soluzione

5.1.4 - Cromatografia su gel di silice

5.1.5 - Colonna per la separazione dell'estratto

5.1.6 - Andamento della colonna per la separazione dell'estratto

5.2 - Caratterizzazione di un recettore gustativo per i lattoni
sesquiterpenici

6 - RISULTATI E DISCUSSIONE

6.1 - Descrizione della metodica di ottenimento della Grosseimina

6.1.1 - Un esempio di estrazione

6.2 - Modificazioni strutturali

6.2.1 - Modificazioni della funzione ossigenata in 8

6.2.2 - Modificazioni della funzione carbonilica in 3

6.2.3 - Modificazioni del gruppo lattonico

6.2.4 - Modificazioni del gruppo metilenico in 14

6.3 - Risultati dei saggi biologici

7 - TABELLE

8 - BIBLIOGRAFIA

9 - CONCLUSIONI

10 - RINGRAZIAMENTI

1-INTRODUZIONE

Tra i meccanismi biologici, il gusto è uno dei più immediati nella sua percezione. Insieme all'olfatto, il gusto è stato sviluppato dalla Natura per giocare un ruolo primario nella regolazione dell'introduzione del cibo per una corretta nutrizione. E' ora noto che la percezione del gusto inizia quando una molecola attiva sul gusto interagisce con un recettore proteico specializzato sulle papille gustative, che agisce come un'antenna che scandaglia l'ambiente chimico circostante.

I composti dolci, amari e umami sviluppano le loro proprietà gustative mediante l'interazione con da proteine a sette eliche transmembrana accoppiate a proteine G (GPCRs) che agiscono come messaggeri interni. Un altro meccanismo comune è stato identificato per le due famiglie di composti piccanti e rinfrescanti, che danno fenomeni di chemestesi, definita anche "sensibilità trigeminale" e mediata dalla interazione con canali ionici del tipo TRP.

Capire il meccanismo della percezione del gusto ha importanti conseguenze. L'industria alimentare è sempre alla ricerca di nuovi additivi come dolcificanti intensivi, sostituti del sale o dell'alcol.

L'industria farmaceutica ha un grosso interesse verso i composti sapidi, usati per migliorare la palatabilità di formulati da assumere per via orale, specialmente pediatrici, e molti composti sapidi hanno anche applicazioni nel campo della cosmesi, dove i meccanismi chemestetici sono stati studiati nel contesto della nocicezione (all'interno del mondo scientifico viene utilizzato il termine "nocicezione" per definire gli eventi chimici,

bioelettrici e fisici che si producono nel sistema nervoso, dalla periferia alla corteccia, conseguentemente ad una stimolazione nocicettiva)

Storicamente, la ricerca nella chimica del gusto è avanzata su binari separati e con diversi gradi di approfondimento: i composti dolci e amari sono stati studiati soprattutto in relazione agli alimenti; i composti piccanti per la loro importanza nella nocicezione, la ricerca sull'effetto rinfrescante ha riguardato quasi solo il mentolo e pochi suoi derivati; e solo di recente ci si è interessati al sapore umami, diffuso soprattutto nella cucina asiatica, ma oggi di grande interesse per il problema della sostituzione del glutammato nei cibi.

Con questo programma di ricerca noi abbiamo voluto stabilire una collaborazione tra vari gruppi in grado di utilizzare gli strumenti della chimica organica per contribuire a raggiungere due obiettivi: la sintesi di nuovi composti organici attivi sul gusto (sia naturali che di sintesi) di interesse per l'industria farmaceutica e alimentare, e la delucidazione dei meccanismi di chemorecezione del sapore amaro e *umami* e della *chemestesi dei composti pungenti e amaricanti*.

In una prima fase sono stati isolati o sintetizzati gli appropriati leads per ogni classe di composti e sono stati preparati, come si vedrà, degli analoghi, così da ottenere dei set di composti con modificazioni sistematiche a livello di struttura primaria, conformazione e stereochimica. Questi composti sono stati sottoposti a saggi con recettori per la stima dell'attività biologica. I dati ottenuti andranno a costituire una banca dati che permetterà di ottenere correlazioni attività-struttura per ogni classe.

Il sito di binding dei GPCRs e le loro interazioni con i ligandi saranno studiati con le metodologie disponibili e utilizzando anche i dati della recente letteratura.

I risultati della ricerca ottenuti sono di grande utilità nella predizione dell'attività di nuove molecole e per la progettazione di nuovi composti da preparare per sintesi.

2 – PIANTE ALIMENTARI E SALUTE

Il fatto che gli alimenti possano contenere composti utilizzabili come farmaci non è nuovo, come dimostrato dal successo delle vitamine. L'ottenimento di composti a marcata azione biologica da piante alimentari sembra a prima vista un paradosso, dato che le piante alimentari sono state selezionate nel corso dell'evoluzione proprio per la loro assenza di azioni farmacologiche evidenziabili in modo macroscopico. A questa selezione corrisponde in generale un basso contenuto di metaboliti secondari, almeno nella parte edibile. L'epidemiologia è tuttavia una scienza moderna e le piante alimentari possono contenere composti i cui effetti, benefici o dannosi, sono chiaramente evidenziabili solo in un contesto epidemiologico.

Un caso clamoroso è stato quello della farina di palmira, che si ottiene da una palma tropicale, il *Borassus flabelifer*. Ricercatori della Novartis riferirono mesi fa dell'isolamento da questa farina di un triterpene dammaranico a potente azione immunosoppressiva, addirittura un migliaio di volte più potente della ciclosporina in alcuni saggi farmacologici. La presenza di quantità minime di questo composto nella farina di palmira è stata correlata alla maggiore incidenza di tumori nelle popolazioni che ne fanno largo uso.

Per restare in un ambiente a noi più familiare, il *Penicillium camemberti*, usato per il noto formaggio, è un buon produttore del macrolide *brefeldina A*, un inibitore del trasporto intracellulare delle proteine e della loro secrezione che sembrerebbe avere interessanti applicazioni nel campo dei trapianti d'organo.

2.1 - L'amaro

I composti amari presentano una varietà di strutture chimiche superiore rispetto alle altre classi di composti in grado di stimolare il senso del gusto. Per riuscire a razionalizzare la mancanza di specifici siti farmacofori o di elementi strutturali diagnostici, è stato ipotizzato che la percezione dell'amaro implichi l'attivazione di più siti recettoriali distinti, e possa avvenire con meccanismi diversi.

La percezione del gusto amaro può suscitare una reazione di repulsione già nella prima infanzia, a dimostrazione della presenza congenita nell'uomo della capacità di percepire questa sensazione.

L'amaro ha rilevanza in numerosi contesti ed un esempio importante è costituito dall'amarezza di molti principi attivi farmaceutici (API). Questa osservazione ha promosso ricerche sistematiche per la messa a punto di strategie di mascheramento dell'amaro, specialmente per quanto riguarda i farmaci di uso pediatrico. In campo alimentare, l'impiego di dolcificanti sintetici è spesso limitato dal loro retrogusto amaro, mentre conservanti, caffeina ed alcuni succhi di agrumi possiedono un sapore amaro intrinseco. Composti amari possono anche svilupparsi durante processi di lavorazione o di conservazione di derrate alimentari, come avviene ad esempio per i formaggi. Nonostante la grande rilevanza dell'amaro, gli studi condotti, sia in contesto farmaceutico che alimentare, non hanno finora portato a linee guida generali per prevedere le proprietà amare di un composto, né a correlazioni struttura-attività di carattere generale. Questa mancata riconduzione a livello molecolare rende molto difficile la scoperta di inibitori specifici dell'amaro e non sono infatti noti composti con questa proprietà.

L'inibizione dell'amaro può essere ottenuta per addizione di zuccheri, in

modo tale da bilanciare le due sensazioni contrastanti. Strategie "bilancianti" di questo tipo sono state utilizzate per la neutralizzazione di note aromatiche poco piacevoli (inorganiche, di soia, metalliche, di bruciato), ma, nel caso dell'amaro, esiste una importante limitazione dovuta all'ovvio aumento dell'apporto calorico associato all'assunzione di dosi elevate di zucchero.

Composti in grado di bloccare o di complessare (ciclodestrine, chitosani) i composti amari, impedendo il loro legame a recettori specifici, sono difficili da progettare ed il problema è ulteriormente complicato dall'elevata selettività dell'azione richiesta, in quanto, almeno in un contesto alimentare, deve essere evitata l'interferenza con altre note aromatiche e/o gustative.

E' importante notare, inoltre, come l'amaro sia anche una nota ricercata e positiva per alcuni prodotti voluttuari (vermuth, liquori e bevande alcoliche aromatizzate) ed in numerosi preparati farmaceutici usati come digestivi.

Tutte queste osservazioni pongono l'amaro in un contesto molto ampio, caratterizzato da implicazioni non solo negative ma talvolta anche positive, sia nel campo farmaceutico che in quello nutrizionale.

Gli isoprenoidi costituiscono una delle maggiori fonti di composti amari non alcaloidei ed alcuni di essi sono utilizzati sotto forma di estratti grezzi di piante per la produzione di bevande alcoliche (vermuth, liquori). Inoltre, il diterpenoide *sclareolide* è anche uno dei pochi composti a basso peso molecolare in grado di inibire alcune note amare. Le relazioni struttura/attività dei composti isoprenoidici sono tuttavia poco conosciute, come pure le basi molecolari dell'inibizione dell'amaro da parte dello *sclareolide*.

Alcune verdure contengono quantità rilevanti di composti amari nelle loro parti non edibili. Un esempio importante è rappresentato da certe Compositae, tra le quali possiamo citare il *carciofo* (*Cynara scolymus* L.).

Le parti non edibili di questa pianta (le foglie ad esempio) sono scarti agricoli di facile reperibilità: sono un prodotto attualmente inutilizzato in quanto non eduli per l'uomo e troppo amare per essere usate dagli animali, e allo stesso tempo rappresentano una fonte economica e facilmente ottenibile di composti che presentano gusto amaro già alle basse dosi assunte con la dieta. Queste quantità, pur minime, sono attive dal punto di vista gustativo, e possono essere considerate fondamentalmente non tossiche. Rappresentano quindi una categoria di additivi amari biodegradabili e non tossici facilmente aggiungibili a prodotti industriali per scoraggiarne l'assunzione (si pensi ad esempio agli agenti anti-gelo, causa di decesso per numerosi bambini che, attirati dal gusto dolciastro per la presenza di etilenglicol, ingeriscono tali prodotti).

In questa tesi sono state appunto analizzate le foglie del carciofo, di una varietà tipica della Sardegna chiamata 'Spinoso sardo', ricche in lattoni sesquiterpenici, con l'avvio di uno studio delle proprietà amare dei componenti presenti.

2.2 - La chemorecezione gustativa.

Il senso del gusto permette ai mammiferi di valutare il cibo, discriminando i nutrienti dalle tossine; l'uomo è in grado di percepire cinque gusti base: dolce, acido, salato, amaro e umami. Si presume che ognuno dei gusti di base corrisponda ad una funzione distinta. Umami e dolce sono indicatori del contenuto calorico in quanto avvertono se un alimento sia ricco di proteine o carboidrati, inducendo una risposta positiva nel cervello. Il salato è invece un potente meccanismo sviluppatosi durante l'evoluzione da animali marini a terrestri per mantenere la concentrazione corporea di sodio che, specialmente negli erbivori, serve come scopritore di fonti di cibo ricche di ioni metallici. L'acido segnala i protoni, i quali diventano sgradevoli a concentrazioni alte, tipicamente negli alimenti immaturi o guasti. La percezione dell'amaro è più complessa rispetto agli altri gusti a motivo della maggiore sensibilità dei recettori e della loro varietà. L'amaro riveste un ruolo di campanello d'allarme, evidenziando la presenza di sostanze potenzialmente tossiche, e alcune sostanze amare svolgono una funzione di regolazione dell'appetito stimolando le secrezioni gustative.

2.2.1 - Il sistema recettoriale del gusto.



Le strutture primarie adibite al rilevamento dei segnali del gusto sono i bottoni gustativi, tipicamente costituiti da un centinaio di cellule e presenti su lingua, palato, faringe e laringe sia nell'uomo che in altri animali. I bottoni gustativi sono connessi con l'epitelio basale attraverso "tight junctions". Sono state identificati quattro tipologie morfologiche, chiamate coi numeri

romani (dal tipo I al tipo IV); non si tratta di una classificazione rigida poiché spesso queste cellule presentano caratteristiche appartenenti a più tipi. Il tipo IV è considerato il progenitore e si posiziona alla base dei bottoni. Gli altri tipi sono le vere e proprie cellule gustative (TRCs, Taste Receptor Cells) essendo a contatto con la cavità orale attraverso i loro microvilli apicali nelle cui depressioni si trovano i pori gustativi; solo nei pori gustativi vi è interazione tra sostanze sapide e il recettore del gusto. È importante tenere presente che i TRCs non sono neuroni, ma cellule epiteliali specializzate con una vita media di dieci giorni. È importante non confondere la classificazione in tipi con i cinque gusti. Alcuni studi mostrano come il tipo II e una sottoclasse del tipo III siano sensibili preferenzialmente nei riguardi di umami, dolce e amaro, ma non vi sono ancora delle precise relazioni tra morfotipo e sapore.



Sulla lingua i bottoni gustativi sono organizzati in speciali protusioni chiamate papille gustative; strutture specializzate di cui si distinguono diversi tipi: vallate, fogliate e fungiformi. Tutti tipi di papille gustative si trovano in differenti aree della lingua.

Le papille vallate (nell'uomo chiamate anche 'circumvallate' poiché appaiono come circondate da avvallamenti della superficie linguale) contengono approssimativamente 250 bottoni gustativi e sono disposte a V capovolta nella parte posteriore della lingua. Solitamente nell'uomo si trovano in quantità molto variabile (da 3 a 18 papille) al contrario del topo che ne mostra una sola al centro della lingua.

Le papille foliate si localizzano ai lati posteriori della lingua organizzate in solchi, da 2 a 9, e contengono circa 120 bottoni gustativi. Le fungiformi appaiono come elevate (circa 0,5 mm) rispetto alla superficie della lingua e

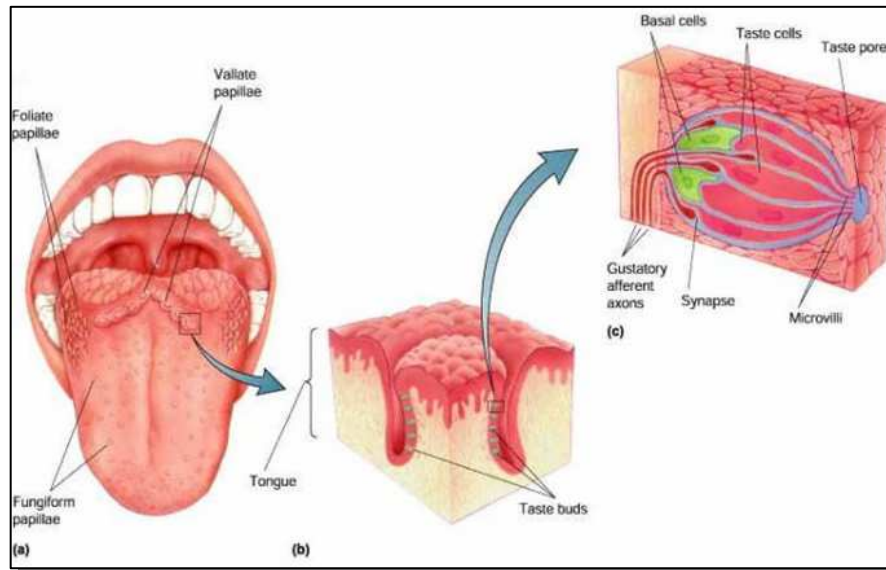


Figura 4: la lingua in dettaglio.

si trovano sparse sulla parte centrale in numero variabile a seconda dell'individuo; contengono in media dai 2,6 ai 3,4 bottoni a seconda della loro posizione anteriore o posteriore.

Esistono su diversi libri delle mappe della distribuzione delle papille gustative sulla lingua. Devono però essere prese in considerazione con molta cautela, vista l'alta variabilità individuale ed il loro significato è stato messo in discussione da numerosi autori.

La comprensione della trasmissione dei segnali gustativi presenta ancora lati oscuri. Le TRCs sono connesse come i nervi sensoriali afferenti attraverso delle sinapsi di cui non è però ancora sicuro quale sia neurotrasmettitore interessato (nel topo è la serotonina). Visto l'alto turnover delle cellule dei bottoni gustativi i nervi afferenti devono essere in grado di discriminare tra le cellule vecchie e quelle in formazione per

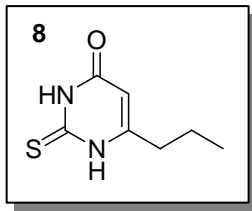
ripristinare le connessioni; ma come sono in grado di riconoscerle se le nuove cellule rispondono agli stessi stimoli di quelle vecchie? E le fibre come possono essere specifiche per uno stimolo se invece i bottoni gustatori rispondono a più di un sapore?

La soluzione più semplice prevedrebbe cinque tipi distinti di cellule gustative, una per ogni classe di stimoli (“labelled-line” model), ma dati sperimentali supportano anche un’altra teoria. Questa prevede che i TRCs possano rispondere a più stimoli, dato che sono connessi ad una popolazione di neuroni in grado di contribuire equamente alla codifica del segnale gestatorio che verrà interpretato solamente nel cervello. In questo modello, un composto amaro dovrebbe attivare una singola popolazione di TRCs, di cui ogni individuo risponderà con intensità differente. Analogamente, la stessa popolazione di TRCs in presenza di uno stimolo salato si attiverà generando una risposta differentemente modulata.

Spesso la natura e l'evoluzione non scelgono la strada più semplice e, per quanto riguarda la codifica dei segnali gustatori, non siamo ancora in grado di saperlo.

2.2.2 - Trasduzione degli stimoli gustativi amari.

Gli stimoli amari sono chimicamente molto diversi rispetto agli altri stimoli. Molte sostanze amare hanno infatti affinità con la membrana fosfolipidica delle cellule, le sostanze amare lipofile attraversano direttamente una membrana, mentre quelle idrofile interagiscono con recettori sulla superficie cellulare. Inoltre gli esperimenti evidenziano che esiste più di una via di trasduzione del segnale.



Tre gruppi di ricerca capeggiati da Matsunami, Adler e Chandrashekar iniziarono a scandagliare nel genoma umano, presumendo che questi recettori fossero collegati alle proteine G, e scoprirono una famiglia di recettori dell'amaro presenti sia nel topo che nell'uomo. Lo spunto iniziale degli studi era la conoscenza di una mutazione genica che riduce la sensibilità ad una sostanza amara conosciuta come PROP (6-*n*-propil-2-tiouracile) **8**, e questa variazione della sequenza genica si trovava in una zona nota del genoma umano.

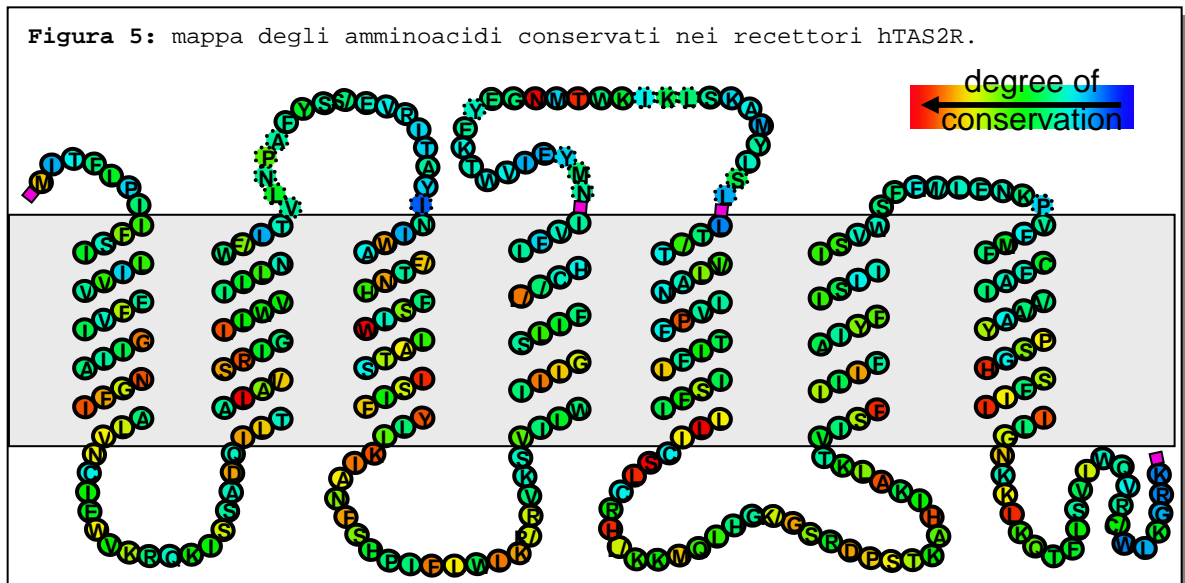
Il problema fondamentale della ricerca sui recettori gustativi (TRCs) non è tanto nella loro struttura, ma quanto nella loro varietà. Ne esistono infatti dai 30 mila ai 50 mila, distribuiti sulle cellule a loro volte raggruppate nelle papille gustative: riuscire ad isolare una quantità adeguata di materiale risultava veramente complicato.

I "cacciatori" di geni iniziarono così a sequenziare la regione attorno al sito mutato, identificando un gene candidato (fu un colpo di fortuna in quanto a posteriori risultò che il gene che influenza la sensibilità al PROP non è un recettore gustativo). Usando la sequenza del gene candidato, furono identificati altri 19 geni simili dispersi in tre cromosomi. Una nuova famiglia di recettori era nata.

Attualmente si conoscono 25 geni e 11 pseudogeni; con l'eccezione del recettore RAS2R1 situato sul cromosoma 5, gli altri TAS2R sono presenti sui cromosomi 7 e 12 raggruppati rispettivamente in cluster di 9 e 15 geni.

I TAS2Rs sono strutturalmente diversi fra di loro, ma se paragonati, mostrano una similitudine di sequenza variabile tra il 17 e il 90%. Questo suggerisce che differenti membri della famiglia siano in grado di riconoscere una grande varietà di strutture. La struttura dei recettori consiste in sette domini transmembrana α -elica, con un estremità

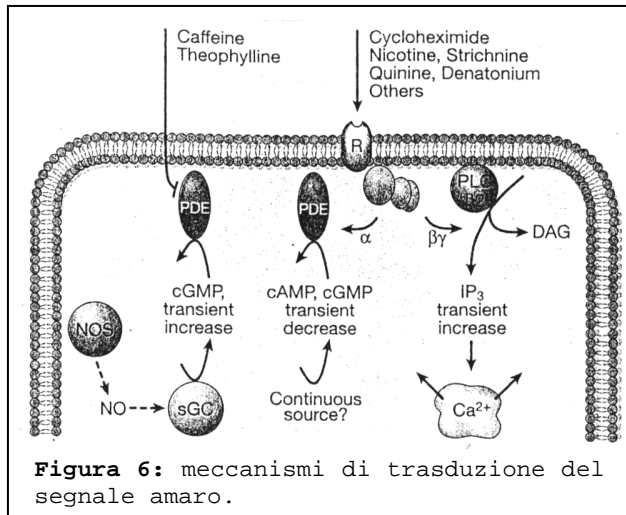
carbossiterminale citosolica altamente variabile, e presumibilmente legata alla loro regolazione.



La scoperta della proteina ‘Gustducin’ nei laboratori di Robert Margolskee è stata una pietra miliare nell’elucidazione del meccanismo di trasduzione dell’amaro. Si tratta della subunità α di una proteina G in grado di stimolare la fosfodiesterasi che degrada il secondo messaggero cAMP, della cui diminuzione risentono alcuni canali della membrana citoplasmatica che si aprono, permettendo il passaggio di sodio, potassio e calcio ed inducendo una depolarizzazione nelle cellule, con conseguente rilascio di neurotrasmettitori. Questo meccanismo di trasduzione del segnale presenta analogie con i bastoncelli della retina, in cui la rodopsina, recettore di membrana, attiva la trasducina che stavolta induce la fosfodiesterasi a degradare cGMP.

Gustducina è l'unica proteina specifica per le cellule dell'amaro al momento conosciuta, ed il parallelismo tra i recettori della retina e Gustducina mostra un insospettabile livello di conservazione di funzione, dovuto ad un comune processo evolutivo.

Altri esperimenti hanno rivelato che non tutte le cellule gustative in grado di rispondere agli stimoli amari esprimono la proteina Gustducina. La presenza di altre cascate del segnale per i recettori dell'amaro risulta essere pertanto controversa.



Si ritiene probabile l'esistenza di altre proteine G di tipo inibitorio. Studi condotti nel 1988 da Myles Akabas et. al. (16) e nel 1990 da Solomon Snyder et. al. (17) hanno stabilito che esiste una partecipazione dell'IP3 e del DAG, oltre alle proteine G,

nella trasduzione del segnale amaro. Gli esperimenti suggeriscono infatti che le molecole dell'amaro legano i recettori sulla superficie cellulare. Questi attivano le proteine G e a loro volta inducono l'attivazione della fosfolipasi C che genera IP3, riconosciuto come stimolo per il rilascio del calcio dai compartimenti cellulari. Il calcio causa alla cella una iperpolarizzazione per attivazione dei canali del potassio, o può anche attivare direttamente il rilascio di neurotrasmettitori.

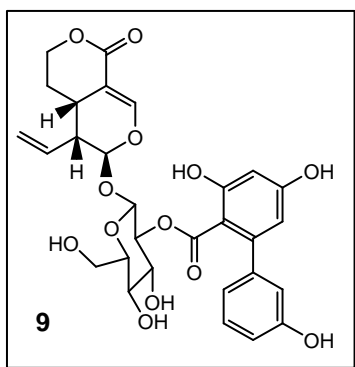
Yukio Okada et. al. hanno però proposto un terzo meccanismo in cui si collegano le sostanze amare con le secrezioni di ioni cloro che causano la depolarizzazione cellulare.

2.2.3 - La varietà strutturale dei composti amari

Esistono numerose e diverse sostanze in grado di attivare i recettori dell'amaro, ma, sfortunatamente, non esiste un vero database completo di

tutti i composti ritenuti amari. Nel 1927 Von Skramlik aveva già evidenziato alcuni gruppi amarogenici quali NO_2 , $\text{N}\equiv$, $=\text{N}=\text{}$, $-\text{SH}$, $-\text{S}-$, $-\text{S}-\text{S}$, $=\text{CS}$. Queste informazioni devono però essere prese con cautela in quanto la loro presenza non è necessariamente un indicatore per predire la qualità dell'amaro. Nel '79 Tancredi, basandosi su studi di similarità tra alcune strutture, propose un archetipo di struttura amara, in analogia con quanto fatto una decina di anni prima per il senso del dolce. In questo modello è presente un donatore di legame idrogeno (A-H) ed un sito accettare (B) distanziati di circa 0,3 nm; purtroppo l'applicabilità generale di questo modello è ancora da validare. Il grande numero di composti amari con la loro diversità strutturale mostra una elevata variabilità di molti parametri quali dimensione, idrofobicità, cariche, e questo non può che suggerire, o confermare, l'esistenza di una grande famiglia di recettori.

I composti amari conosciuti comprendono terpeni, diterpeni, lattoni sesquiterpeni, flavoni, glucosidi; di quest'ultima classe fa parte l'amarogentina **9**, il composto più amaro che si conosce.



Molte sostanze amare sono contenute negli alimenti. Ovviamente molti di questi provengono da piante (verdura, birra, estratti alcolici di piante) ma altre molecole si formano in seguito ai trattamenti industriali subiti dagli alimenti, principalmente grazie al calore (torrefazione del caffè, reazioni di Maillard su amminoacidi e zuccheri) o per fermentazione (formaggi). Alcune molecole appaiono durante la maturazione dell'alimento (irrancidimento da lipasi o da ossidazione lipidica, peptici da idrolisi enzimatica).

La percezione dell'amaro è generalmente collegata con una risposta avversiva: elevati tenori di composti amari inducono un rifiuto da parte del

consumatore, proteggendolo dall'ingestione di sostanze potenzialmente tossiche quali alcaloidi e glucosidi cianogenici.

Un certo numero di composti amari sono stati testati per il loro possibile effetto benefico; il punto di partenza era l'ipotesi che molti composti amari svolgano nella pianta un'azione protettiva da elementi di stress, quali infezioni batteriche e fungine o predatori. Nella dose giusta potrebbero essere utili anche per l'uomo, anche se ad altre concentrazioni questi composti mostrano sovente effetti tossici. Si tratta di due facce della stessa medaglia, e per questo si cerca di sviluppare dei metodi industriali per la rimozione dei principi amari.

3 – I TERPENI

I terpeni sono i prodotti naturali più abbondanti e più ampiamente diffusi nelle piante, ma sono presenti, anche se in misura minore, negli organismi animali e nei microrganismi. Questi composti, caratterizzati da una notevole varietà strutturale, sono detti anche isoprenoidi in quanto costituiti per la massima parte dalla ripetizione di una o più unità isopreniche, legate l'un l'altra secondo un sistema *testa-coda* (*'regola isoprenica'*).

L'isoprene (2-metil-1,3-butadiene) è una molecola a cinque atomi di carbonio: quattro sono disposti linearmente e presentano due doppi legami in posizione 1 e 3, il quinto atomo di carbonio forma una ramificazione in posizione 2 sotto forma di gruppo metilico (-CH₃), (FIG.3.1)

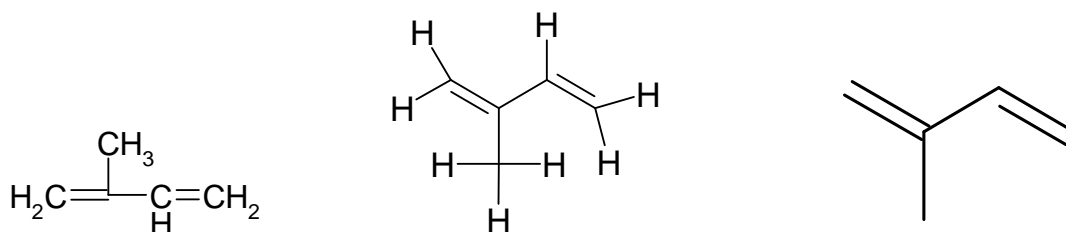


FIG. 3.1 Isoprene (2-metil-1,3-butadiene)

A seconda del numero di ripetizioni isopreniche si distinguono le diverse classi: *emiterpeni* (costituiti da una singola unità isoprenica, C₅), *monoterpeni* (costituiti da due unità isopreniche, C₁₀), *sesquiterpeni* (costituiti da tre unità isopreniche, C₁₅), *diterpeni* (costituiti da quattro unità isopreniche, C₂₀), *sesterterpeni* (costituiti da cinque unità

isopreniche, C₂₅, che si ritrovano soprattutto nei microrganismi), e *triterpeni* (costituiti da sei unità isopreniche, C₃₀), il cui precursore aciclico è lo squalene. Questi ultimi sono presenti in natura in forma tetraciclica e pentaciclica. (*Fig.3.2*)

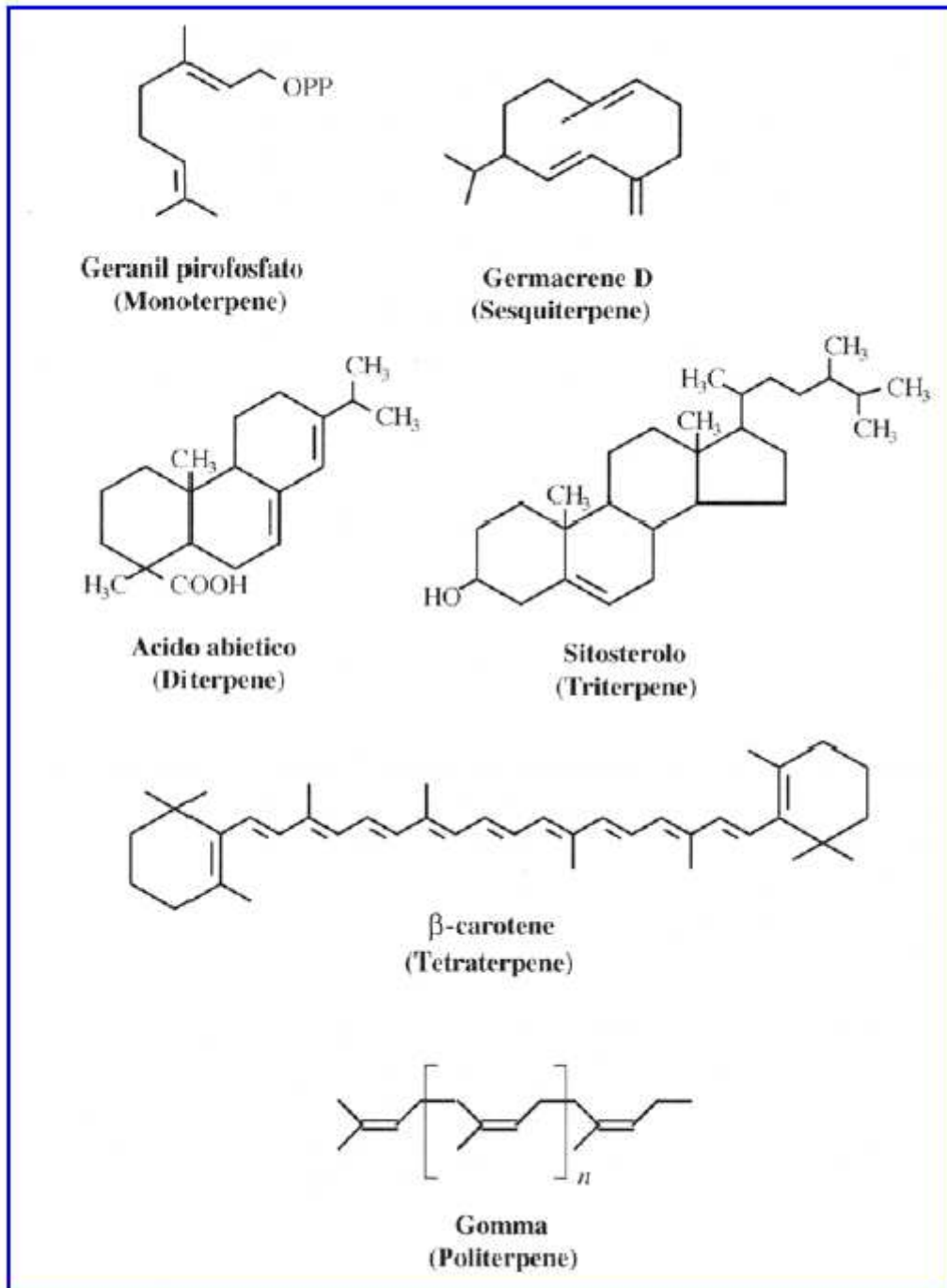


FIG. 3.2 Principali classi di terpeni

Gli *emiterpeni* e i *monoterpeni* sono composti molto volatili e profumati che molto probabilmente svolgono un ruolo di difesa antiparassitaria della

pianta e possono essere coinvolti nella riproduzione della stessa. Pertanto si può attribuire un ruolo ecologico a tali composti.

Vi sono alcuni terpeni ciclici che svolgono un ruolo biologico ben definito, come per esempio l'acido abscissico, un *sesquiterpene* e le *ine*, *diterpeni*, che sono i ben noti ormoni vegetali. Un altro *diterpene* di interesse biologico è il fitolo che costituisce la catena laterale aciclica delle clorofille. Composti terpenici come lo squalene, caratterizzato da 30 atomi di carbonio, precursore aciclico dei *triterpeni*, va considerato come il dimerico di un *sesquiterpene* aciclico. Analogamente il *fitoene*, composto aciclico di 40 atomi di carbonio, va considerato come il dimerico di un *diterpene* aciclico. In entrambi i composti le due unità terpeniche acicliche si legano secondo un sistema coda-coda.

Dal fitoene si formano molecole colorate come il *licopene* ed i *carotenoidi*. Questi ultimi servono come molecole che raccolgono la luce nei sistemi fotosintetici ed hanno un ruolo nella protezione dei procarioti dagli effetti dannosi della luce.

Di origine isoprenica sono anche la catena laterale di 50 atomi di carbonio del *Coenzima Q10*, presente nella catena respiratoria mitocondriale, e la catena laterale di 45 atomi di carbonio del *Plastochinone-9*, un chinone somigliante all'Ubichinone, presente nel sistema fotosintetico.

Le *gomme naturali* sono prodotti della polimerizzazione di unità isopreniche.

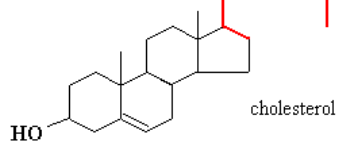
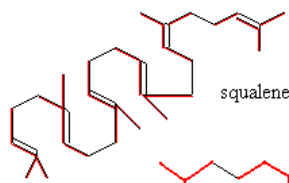
Infine alcuni composti fitotossici prodotti da funghi fitopatogeni, definiti fitotossine, come le ofioboline, sono *sesterterpeni*.

Composti ciclici aventi origine triterpenica sono gli *steroidi*.

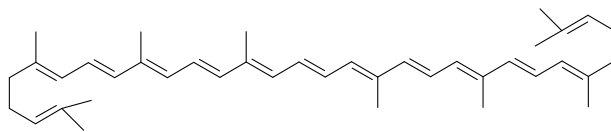
Questi posseggono un caratteristico nucleo strutturale tetraciclico, da cui derivano diverse famiglie di composti naturali di interesse biologico, come ormoni sessuali, acidi biliari, steroli e corticosteroidi.

Il precursore degli *steroli vegetali*, detti anche *fitosteroli*, é un triterpene tetraciclico, il *cicloartenolo*, mentre il precursore degli steroli presenti negli animali e nei microrganismi é il *lanosterolo*, anche quest'ultimo di natura triterpenica. Un esempio di fitosterolo molto diffuso è rappresentato dallo *stigmasterolo*, mentre il *colesterolo* e l'*ergosterolo* sono esempi di steroli molto diffusi rispettivamente negli organismi animali e nei funghi.

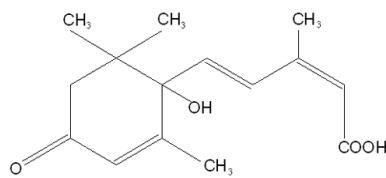
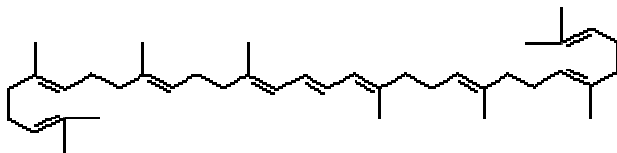
Un esempio di ciascun gruppo di composti é mostrato in Fig.3.3 .



Lycopene



fitoene



Acido abscissico (ABA)

Plastoquinone

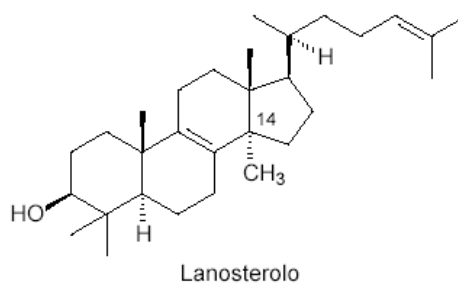
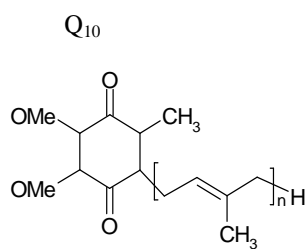
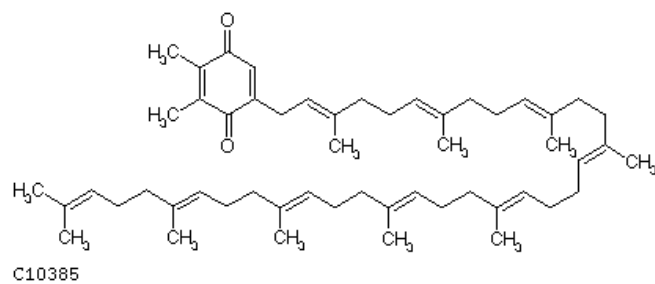


Fig. 3.3 qualche esempio di terpeni aciclici e ciclici

3.1 Biosintesi dei terpeni

La biosintesi avviene a partire dall'isopentenil pirofosfato (IPP) che condensa col suo isomero dimetilallil-ipofosfato (DMAPP) mediante il sistema *testa-coda* per dare geranil pirofosfato, precursore aciclico dei *monoterpeni* (C₁₀).

Tale condensazione è catalizzata da un enzima definito geranil pirofosfato sintasi, che appartiene alla classe delle preniltransferasi; questi enzimi sono responsabili in generale della condensazione di una molecola di IPP con una di DMAPP.

La successiva condensazione di un'ulteriore unità di IPP ad opera della farnesil pirofosfato sintasi, da origine al farnesil pirofosfato, il precursore aciclico dei *sesquiterpeni* (C₁₅). Un'ulteriore addizione al farnesil pirofosfato di una unità di IPP conduce alla formazione del geranilgeranil pirofosfato, il precursore aciclico dei *di terpeni* (C₂₀). La condensazione secondo il sistema *coda-coda* di due unità di geranilgeranil pirofosfato mediante la fitoene sintasi conduce alla formazione del *fitoene* (C₄₀), il precursore aciclico dei carotenoidi. L'ulteriore condensazione di un'altra unità di IPP con una di geranilgeranil pirofosfato determina la formazione del geranilfarnesil pirofosfato, il precursore aciclico dei *sesterterpeni* (C₂₅). Infine la condensazione secondo il sistema *coda-coda* di due unità di farnesil pirofosfato ad opera della squalene sintasi determina la formazione dello *squalene* (C₃₀) che é il precursore aciclico dei *triterpeni* (C₃₀). I triterpeni tetraciclici sono i precursori degli steroidi, che costituiscono una classe di composti naturali di notevole interesse biologico. Pertanto il DMAPP rappresenta l'unità che inizia la catena

terpenica, mentre lo IPP costituisce l'unità che l'estende, secondo come schematizzato in Fig. 3.3.

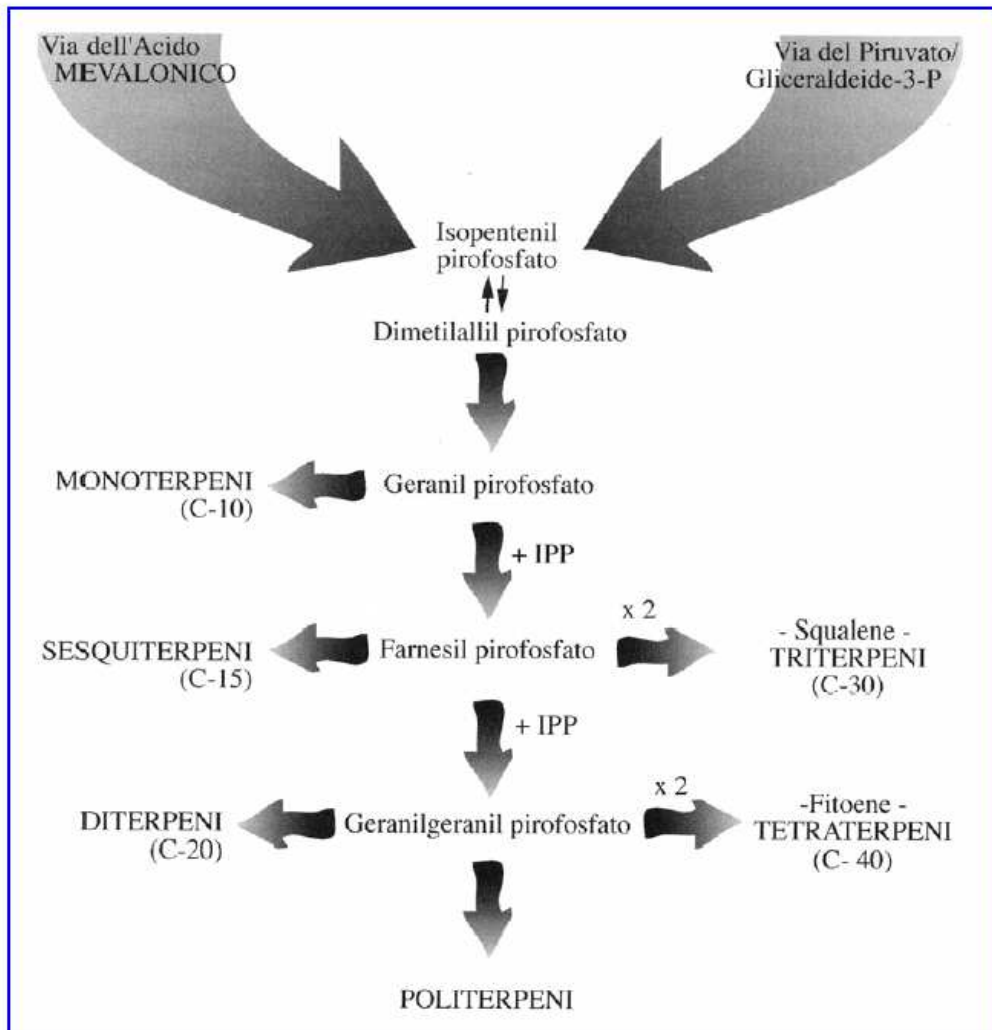


FIG. 3.3 Biosintesi dei terpeni

4 - DEFINIZIONE E SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questa tesi è quello di:

- a) stabilire le relazioni struttura-attività di lattoni sesquiterpenici amari di origine alimentare
- b) studiare l'inibizione del loro sapore amaro da parte di composti a basso e ad alto peso molecolare.

I lattoni sesquiterpenici presentano un modello multiplo di attività biologica in vitro, e rappresentano un esempio paradigmatico per comprendere le basi dell'amaro, date le loro caratteristiche di:

- elevata attività (superiore a quella di alcaloidi come la caffeina e la chinina)
- sicurezza tossicologica alle concentrazioni cui viene percepito il sapore amaro
- facilità di reperimento da prodotti agricoli
- polifunzionalizzazione strutturale con ampia possibilità di modificazione chimica.

In questo contesto, i lattoni sesquiterpenici a struttura guaianolidica di carciofo (*Cynara scolymus* L.) soddisfano pienamente i requisiti indicati, in particolare per quanto riguarda gli aspetti tossicologici, data la loro presenza in comuni verdure ed il loro uso in bevande alcoliche.

La ricerca è stata articolata in quattro obiettivi:

- 1) Isolamento dei lattoni sesquiterpenici da prodotti agricoli facilmente ottenibili in grosse quantità (foglie di carciofo).

- 2) Modificazione strutturale sistematica dei composti naturali, con ottenimento di una "libreria" di derivati per lo studio delle relazioni struttura-attività
- 3) Valutazione delle proprietà amare dei composti ottenuti, previa valutazione tossicologica preliminare.
- 4) Ricerca di una serie di potenziali inibitori delle proprietà amare dei composti naturali e dei loro analoghi.

Si sono individuati due obiettivi

OBIETTIVO 1.

Le foglie del carciofo costituiscono un prodotto agricolo facilmente ottenibile in grosse quantità. Questa biomassa contiene lattoni sesquiterpenici con strutture di tipo guaianico variamente funzionalizzate. I composti principali delle foglie di carciofo sono la *cinaropicrina* e la *grosseimina*, che costituiscono circa lo 0,5 -1% del loro peso secco.

OBIETTIVO 2.

La *cinaropicrina* e la *grosseimina* sono composti polifunzionalizzati che possono quindi essere sottoposti ad un'ampia gamma di modificazioni chimiche.

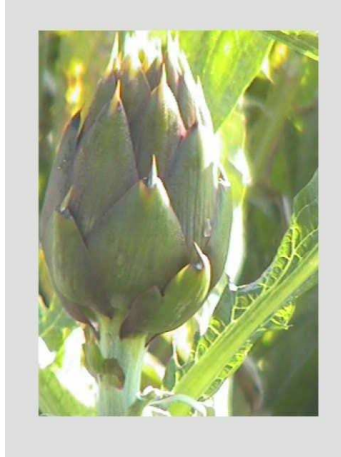
Le principali modifiche strutturali prese in esame sono state:

- a) la riduzione chemoselettiva del doppio legame esometilenico coniugato al carbonile lattonico;
- b) idrogenazione dei legami olefinici non coniugati;
- c) eterofunzionalizzazione dei doppi legami per addizione nucleofila e

elettrofila;

- d) esterificazione di gruppi ossidrilici
- e) reazioni di ossidoriduzione su gruppi carbonilici ed ossidrilici;
- f) dimerizzazioni pericicliche in modo da ottenere strutture dimeriche analoghe ai lattoni sesquiterpenici amari dell'*assenzio*, che ci sono serviti da riferimento .

4.1 - La pianta del Carciofo



Nome Botanico: *Cynara scolymus L.*

Specie studiata: *Spinoso sardo* o *Violetto*

Nome Farmaceutico

- *Cynarae folium*

Nome Italiano

- Carciofo

Nome Inglese

- Artichoke
- Garden Artichoke
- Globe Artichoke

Nome Francese

- Artichaut

Nome Tedesco

- Artischocke

Nome Spagnolo

- Alcachofa

Nome Sardo

- Cancioffa

Il carciofo, è una pianta originaria del bacino del Mediterraneo.

Pare che gli antichi Egizi già conoscessero il Carciofo e che i Greci se ne cibassero comunemente. Le prime descrizioni risalgono al IV sec. a.C.. Allo storico Teofrasto (371-286 a.C.) dobbiamo le prime fonti in cui si fa cenno alle colture di carciofo, egli descrisse le coltivazioni delle popolazioni della Sicilia orientale sotto il tiranno Diocleziano; chiamava la pianta "cactus", descrivendone le caratteristiche e sostenendo che "nasce solo in Sicilia e non in Grecia".

Il carciofo (*Cynara scolymus* L.) appartiene alla famiglia delle Asteraceae (ex Compositae), tribù delle Cynareae. Il genere *Cynara*, secondo Wiklund (1992), comprende otto specie spontanee, tutte originarie del bacino del Mediterraneo. Tra esse si ricorda il *Cynara Cardunculus* L. var *Silvestris* che, come confermato da studi recenti, è la forma ancestrale (originaria) sia del carciofo coltivato che del cardo (*Cynara cardunculus* L. var *cardunculus*).

Il carciofo é una pianta perenne rizomatosa con più gemme basali dalle quali si sviluppano foglie e fusti.

Le foglie lunghe fino a 100-140 cm, possono essere lobate (foglie giovani) o pennatosette (foglie adulte), di colore verde più o meno intenso, o talvolta grigiastre nella pagina superiore, verde più chiaro o grigio nella pagina inferiore per la presenza di peluria. In genere sono intere le foglie più giovani o quelle in prossimità del capolino e si distinguono ulteriormente

per essere inermi o leggermente spinescenti.

Il fusto si presenta eretto, con striature in senso longitudinale, alto fino a 80-160 cm, termina con una infiorescenza solitaria, così come tutte le sue ramificazioni laterali, che costituisce la parte edibile della pianta.

I fiori azzurri, ermafroditi tubolosi, sono riuniti in una infiorescenza a capolino, detta anche "calatide". Il capolino comprende una parte basale carnosa, "ricettacolo", sul quale sono inseriti i fiori ermafroditi detti "flosculi".

Inframezzati ai fiori sono presenti sul talamo numerose setole bianche e traslucide che costituiscono il "pappo". L'insieme nei primi stadi viene volgarmente indicato sotto il nome di "peluria". Sul ricettacolo si inseriscono le brattee, a disposizione embricata l'una sull'altra, le più interne sono di consistenza tenera e carnosa, le più esterne più dure e fibrose.

Il frutto è un achenio, di colore grigiastro-bruno unito al calice trasformato in pappo per favorire la disseminazione.

4.1.1 - Utilizzo e proprietà

Il carciofo è una pianta davvero "generosa" di cui si può utilizzare praticamente tutto: dai capolini per il fresco a tavola o per la trasformazione agroalimentare, ai carducci o alle foglie fresche e secche per l'alimentazione del bestiame, per finire con le foglie e le radici da cui si estraggono ortofenoli ed acidi utilizzati in farmacologia e nell'industria dei liquori (aperitivi e digestivi).

Gli aspetti qualitativi e nutrizionali di questo ortaggio sono interessanti. Visto che il periodo di raccolta (fine autunno-inverno) è ostile a molti fitofagi, in alcune zone viene prodotto senza alcun intervento fitosanitario o comunque tali interventi risultano rari ed avvengono solo in casi di emergenza.

Un'altra caratteristica da prendere in considerazione è il suo valore officinale, infatti, grazie ad una particolare sostanza, la *cinarina*, contenuta nelle foglie, nello stelo e nell'infiorescenza, svolge un'azione benefica sulla secrezione biliare, favorisce la diuresi renale e regolarizza le funzioni intestinali.

Oltre ad essere un eccellente protettivo epatico il carciofo abbassa il tasso di colesterolo nel sangue, con benevoli effetti sulla circolazione sanguigna e sull'attività cardiaca. Inoltre al carciofo è attribuita una forte capacità antiossidante.

Di riflesso esplica attività antireumatica, antiurica ed antidiabetica. L'elevato contenuto di *inulina* lo rende particolarmente idoneo all'alimentazione dei diabetici.

Sembra inoltre efficace nella cura dell'orticaria e di alcune forme eczematose cutanee, oltre che possedere virtù afrodisiache. Grazie alla ricca presenza di composti vitaminici, infine, contribuisce a ridurre la

permeabilità e la fragilità dei vasi capillari. In cosmesi, il succo svolge un'azione bioattivante, vivificante e tonificante per la pelle.

Alle ben note proprietà amare del Carciofo, note da secoli, la ricerca moderna ha aggiunto proprietà più propriamente epatiche e biliari. Infatti il Carciofo stimolerebbe la coleresi e agirebbe anche come epatoprotettivo. Inoltre la sua tendenza ad abbassare il tasso di colesterolemia lo rende utile in caso di disturbi da calcolosi biliare (visto il legame tra metabolismo del colesterolo e calcoli biliari) e iperlipidemia. Il Carciofo potrebbe rivelarsi un rimedio elettivo per tutti i problemi che rientrano nella diatesi artritica (calcoli biliari, obesità, iperlipidemia e reumatismo) proprio per questa azione sia a livello lipidico/colesterolico che direttamente epatico/biliare.

Nella tabella sottostante viene riportato un sunto di quelle che sono le attività e le indicazioni d'uso del carciofo.

TABELLA DELL'ATTIVITA' DEL CARCIOFO

<i>Attività principali</i>	<i>Indicazioni</i>
Anticoleistatica	Artrite
Colagoga	Cistifellea (disturbi funzionali)
Depurativa	Costipazione
Epatoprotettiva	Dermatosi (legata ad intossicazione)
Troporestorativa epatica	Dispepsia (non infiammatoria, e sintomi associati)
Amara	Epatici, disturbi (funzionali)
Antiemetica	Flatulenza
Coleretica	Intossicazione
Diuretica	Intossicazione (epatica)
Ipocholesterolemizzante	Iperlipidemia
	Ittero
	Nausea
	Patologie cardiovascolari (prevenzione a lungo termine)
	Reumatismo
	Ridotta funzionalità epatica
	Sindrome del colon irritabile
	Vomito

Per concludere, si riporta qui di seguito anche una poesia, dedicata al carciofo dal noto poeta Pablo Neruda.

Ode al carciofo

Il carciofo dal tenero cuore si vestì da guerriero,
ispida edificò una piccola cupola,
si mantenne all'asciutto sotto le sue squame,
vicino al lui i vegetali impazziti si arricciarono,
divennero viticci,
infiorescenze commoventi rizomi;
sotterranea dormì la carota dai baffi rossi,
la vigna inaridì i suoi rami dai quali sale il vino,
la verza si mise a provar gonne,
l'origano a profumare il mondo,
e il dolce carciofo lì nell'orto vestito da guerriero,
brunito come bomba a mano,
orgoglioso,
e un bel giorno,
a ranghi serrati,
in grandi canestri di vimini,
marciò verso il mercato a realizzare il suo sogno:
la milizia.
Nei filari mai fu così marziale come al mercato,
gli uomini in mezzo ai legumi coi bianchi spolverini erano i generali dei carciofi,
file compatte,
voci di comando e la detonazione di una cassetta che cade,
ma allora arriva Maria col suo paniere,
sceglie un carciofo,
non lo teme,

lo esamina,
l'osserva contro luce come se fosse un uovo,
lo compra,
lo confonde nella sua borsa con un paio di scarpe,
con un cavolo e una bottiglia di aceto finché,
entrando in cucina,
lo tuffa nella pentola.

Così finisce in pace la carriera del vegetale armato che si chiama carciofo,
poi squama per squama spogliamo la delizia e mangiamo la pacifica pasta
del suo cuore verde.

P.Neruda

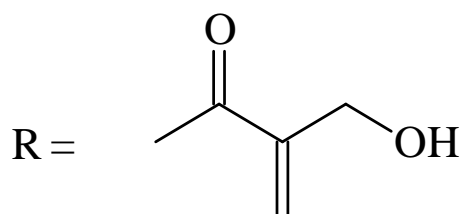
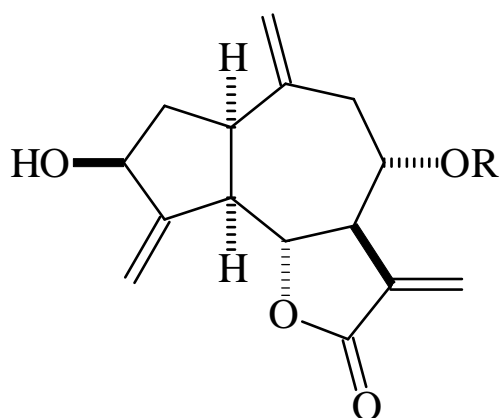
5 – PARTE SPERIMENTALE

Nella tabella sottostante vengono riportati i Costituenti Principali del carciofo

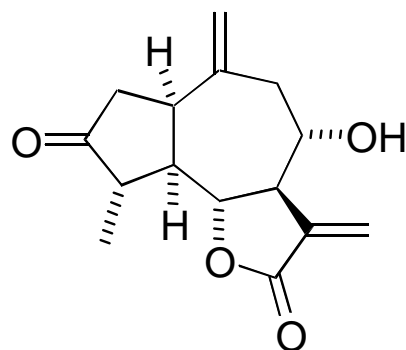
Derivati dell'acido caffeico:	acido clorogenico, acido neoclorogenico, acido criptoclorogenico, cinarina.
Lattoni sesquiterpenici:	cinaropicrina, deidrocinaropicrina, grosseimina, cinaratriolo.
Flavonoidi:	rutina.

Tali composti sono stati ottenuti mediante una metodica estrattiva che verrà descritta in dettaglio nel paragrafo '5.1.1 - Descrizione del metodo di estrazione'.

Il composto principale isolato con una resa del 5% è stata la *cinaropicrina* **1** ed è un amaricante:

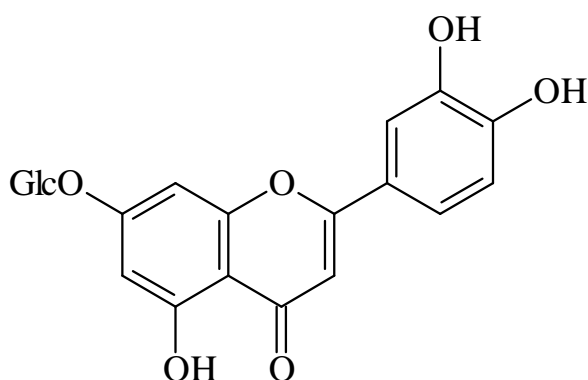


Il secondo composto isolato è la *grosseimina 2*, anche questa presente in buone percentuali

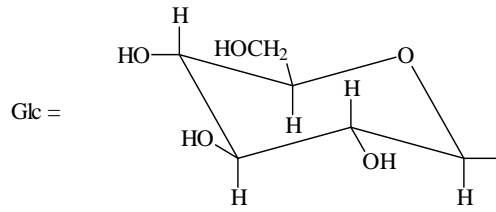


Le foglie triturate sono state anche estratte, oltre con metodo di seguito descritto (par. 5.1), anche con una miscela di metanolo e etanolo e il residuo ottenuto dopo la distillazione del solvente è stato frazionato nei vari componenti per successive estrazioni con solventi meno polari, cristallizzazione e cromatografia in colonna. Abbiamo separato e identificato i flavoni sotto indicati:

1)

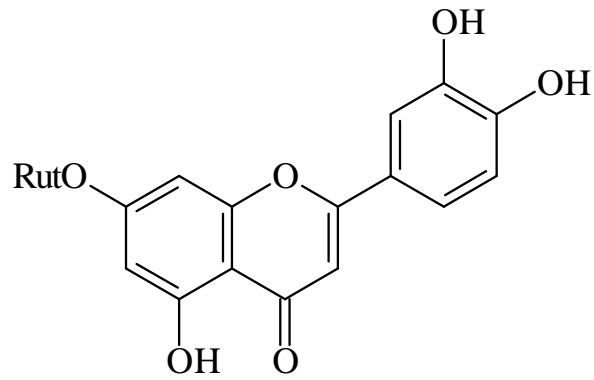


Luteolin 7-O-β-D-glucopiranoside



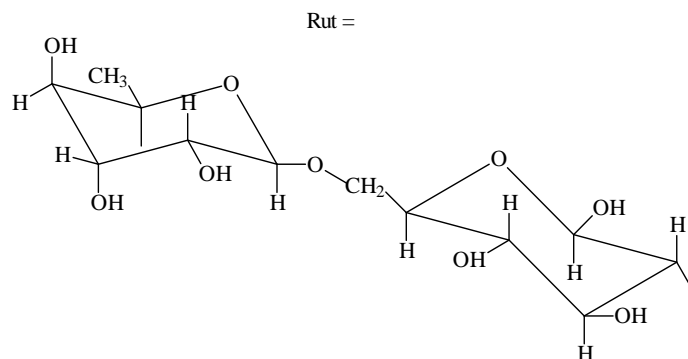
con

2)

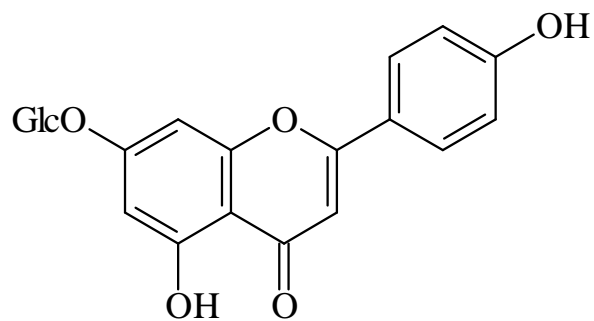


Luteolin -7-O-rutinoside

con

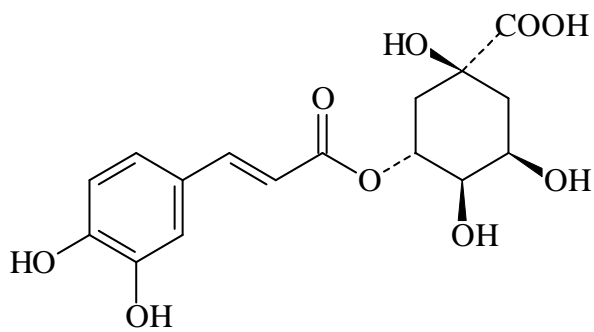


3)



Apigenin 7-rutinoside

4)



Acido Clorogenico

5.1 - ESTRAZIONE E CROMATOGRAFIA

La parte sperimentale si è articolato nelle diverse fasi sotto indicate:

1. Estrazione delle foglie di carciofo e purificazione preliminare dell'estratto, rimuovendo clorofilla e composti apolari.
2. Frazionamento dell'estratto per cromatografia.
3. Identificazione strutturale dei composti.
4. Analisi di tipo recettoriale

5.1.1 - Descrizione del metodo di estrazione

Si polverizza la sostanza da estrarre e si prepara l'imbutto separatore che verrà utilizzato per l'estrazione:

1. Si monta un sostegno su cui si appoggia l'imbutto.
2. Si introduce un batuffolo di cotone (o a piacere un pezzo di garza) in modo che non venga perso prodotto quando, nel raccogliere l'estratto, l'imbutto separatore viene aperto.
3. Sopra al cotone, usando una tramoggia, viene deposto un sottile strato di sabbia in modo da separare la sostanza polverizzata dal cotone e quindi dal fondo dell'imbutto.

A questo punto l'imbutto separatore è pronto per essere utilizzato:

1. Si introduce nell'imbutto tutta la sostanza precedentemente polverizzata.
2. Si ricopre l'intera massa di sostanza con acetone e lasciamo riposare per alcune ore; tuttavia, per aumentare la capacità estrattiva dell'acetone, è conveniente di tanto in tanto agitare l'imbutto e sfiatarlo, in modo da

- eliminare i vapori che si formano durante l'agitazione stessa.
3. Dopo alcune ore, è possibile procedere alla prima estrazione, raccogliendo l'estratto in un pallone precedentemente tarato.
 4. Contemporaneamente viene aggiunto nuovo acetone nell'imbuto, in modo da poter procedere successivamente ad una nuova estrazione.

Nel pallone si ritrova perciò l'estratto più l'acetone di estrazione che verrà eliminato tramite evaporatore rotante.

Una volta tirato a secco l'estratto, si aggiunge l'acetone della seconda estrazione e si evapora nuovamente.

Questa operazione è ripetuta per tre volte in modo da essere sicuri di aver estratto ogni sostanza dalla massa polverizzata; evaporato tutto l'acetone, si pesa l'estratto in modo da poter determinare la resa dell'estrazione.

5.1.2 - Eliminazione della Clorofilla.

Per questa reazione è conveniente usare un recipiente "monouso" in quanto la clorofilla, precipitando, forma una massa molto densa che tende ad aderire alle pareti del recipiente stesso rendendone difficile la pulizia. Si è scelto di utilizzare a questo scopo una bottiglia di acqua minerale pulita e asciutta.

Normalmente si usano circa 100 mL di EtOH e 100 mL di $\text{Pb}(\text{Ac})_2$ al 3% per ogni 100 mL di estratto.

È molto importante ricordare che, per una buona riuscita della reazione, i due reattivi vanno usati in uguale quantità; inoltre quando si prepara la soluzione di $\text{Pb}(\text{Ac})_2$, si usa acqua distillata per evitare la precipitazione di sali di Pb^{2+} .

Una volta preparati i due reattivi, si trasferiscono insieme all'estratto nel recipiente precedentemente predisposto e vi si lasciano a reagire per alcune ore, dentro uno stiletto chiuso, al buio; osservando l'andamento della reazione, si vede che dopo un certo periodo la clorofilla incomincia ad aderire alle pareti del recipiente, formando uno strato che nel tempo diviene sempre più denso.

Quando la reazione è terminata, si filtra il tutto in un pallone usando un filtro a pieghe; il filtrato che otteniamo è limpido e trasparente.

A questo punto la soluzione ottenuta è pronta per le operazioni di lavaggio che verranno effettuate successivamente (il cosiddetto 'clean-up'); tuttavia non bisogna dimenticare che questa reazione potrebbe danneggiare alcuni costituenti dell'estratto e la sostanza che si desidera isolare potrebbe essere degradata o in gran parte eliminata come sale di piombo.

Quindi, in questi casi, è poco vantaggioso eliminare la clorofilla con questo metodo, ma comunque un metodo veloce che da comunque buoni risultati; in alternativa si può procedere seguendo vie diverse, tra le quali fare direttamente una colonna in silice.

5.1.3 - Eliminazione della fase acquosa dalla soluzione.

Nel pallone usato per raccogliere il filtrato, si trovano le sostanze estratte, EtOH e eventuali sali di piombo rimasti. Per eliminare la fase acquosa, si evapora la soluzione fino a metà del volume iniziale, in questo modo si recupera l'etanolo e nel pallone rimangono solamente la soluzione acquosa con i sali di piombo e l'estratto.

A questa soluzione si aggiunge acqua distillata in modo da aumentare la fase acquosa ed evitare la precipitazione di sali di piombo, che si avrebbe usando acqua normale; si procede quindi effettuando un lavaggio con

Acetato di Etile in modo che la sostanza estratta si ripartisca nella fase organica.

Per questo lavaggio si usa un normale imbuto separatore in cui si mettono la fase acquosa con l'estratto e alcuni mL di Acetato di Etile, si agita bene, si sfiata e si aspetta che si separino le due fasi, di cui la fase superiore è rappresentata dalla fase organica di Acetato di Etile, e la fase inferiore è invece rappresentata dalla fase acquosa che in questo caso ha densità maggiore.

La fase acquosa così raccolta è nuovamente lavata con Acetato di Etile, seguendo il medesimo schema, in modo da essere sicuri che tutto l'estratto si ripartisca nella fase organica; si controlla la completezza dell'estrazione con una cromatografia su strato sottile TLC.

A questo riguardo è importante ricordare che per ottenere un risultato migliore, è meglio fare tante estrazioni con piccoli quantitativi di Acetato di Etile, che non un unico lavaggio fatto con volumi maggiori di solvente.

Alla fase organica così ottenuta si aggiunge Na_2SO_4 anidro fino a quando non si ottiene, per agitazione, una soluzione limpida, che indica una totale assenza di fase acquosa.

A questo punto la soluzione dell'estratto viene filtrata in un pallone tarato e tirata a secco; si ottiene una massa cristallina che, pesata, determina una prima resa effettiva della reazione.

Prima di procedere alla separazione tramite colonna, viene preparato uno standard dell'estratto in modo da avere sempre un campione di sostanza che funga da riferimento.

Per formare lo standard si preleva la minima quantità di estratto e la si diluisce in un contenitore apposito con alcune gocce di CH_2Cl_2 o di Acetone (a seconda della solubilità della sostanza).

5.1.4 - Cromatografia su gel di silice

Per poter fare una buona separazione su colonna, occorre prima verificare la polarità delle varie frazioni che compongono l'estratto; in questo modo sarà anche possibile scegliere l'eluente migliore da usarsi nella colonna stessa.

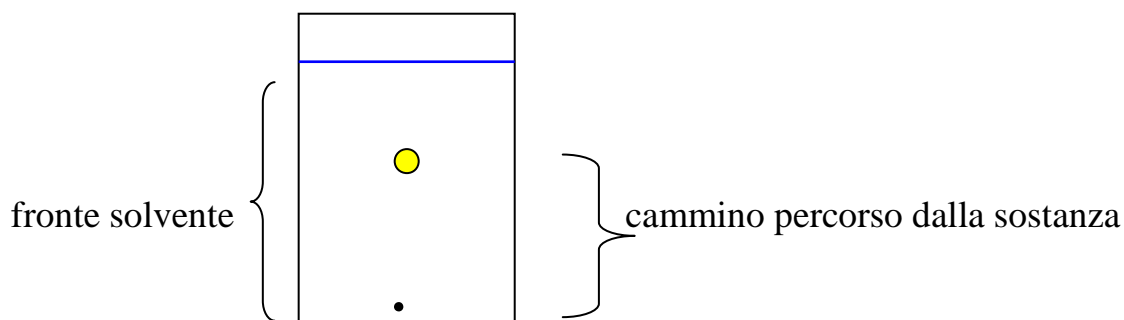
Si procede allora facendo una cromatografia su SiO_2 (TLC) usando diversi eluenti; si incomincia con una miscela avente polarità intermedia (per esempio 5 parti di Etere di Petrolio e 5 parti di Acetato di Etile) ed in base al risultato ottenuto si aumenta la componente apolare (Etere di Petrolio 100%) o la componente polare (EtOAc 100%).

Se la sostanza in esame presenta gruppi molto polari, usando un eluente con polarità intermedia, tenderà a rimanere attaccata ai gruppi polari della SiO_2 e quindi non riuscirà ad avanzare lungo la lastra seguendo il fronte dell'eluente stesso.

Viceversa, se la sostanza è completamente apolare, non riuscirà ad aderire alla SiO_2 , che forma lo strato solido, e di conseguenza avanzerà insieme al fronte dell'eluente.

In entrambi i casi non otterremo una buona cromatografia, perché non si distingueranno le diverse bande formate dalle sostanze contenute nell'estratto; per avere un buon risultato, le sostanze cromatografate devono dare un rapporto R_f di circa 0.5, ovvero le sostanze devono compiere circa la metà del cammino percorso dal fronte dell'eluente: in questo modo, l'estratto si separa in bande ben definite, compiendo un tragitto più o meno lungo sulla lastra di silice, a seconda della polarità di ciascuna banda.

($R_f = \text{Fronte del solvente} / \text{Cammino percorso dalla sostanza interessata}$)



Come già accennato, si procede utilizzando come eluente una miscela 5/5 di Etere di Petrolio e Acetato di Etile.

Se le sostanze rimangono troppo in basso, le diverse bande risulteranno sovrapposte le une alle altre, a significare che l'estratto è composto da diverse sostanze polari; per poterne vedere la separazione, si dovrà aumentare la componente polare dell'eluente. Quest'ultimo si lega ai gruppi polari delle sostanze da separare e le fa scorrere verso il fronte dell'eluente stesso, fino ad ottenere un R_f di circa 0.5.

Viceversa succederà se le sostanze sono in buona parte apolari: esse tenderanno a viaggiare con il fronte dell'eluente stesso, ammassandosi le une sulle altre: in questo caso si dovrà aumentare la percentuale di Petroliere dell'eluente.

La composizione giusta della miscela di eluenti di partenza è fondamentale per la buona separazione in colonna delle sostanze costituenti l'estratto da cromatografare e di conseguenza per un migliore recupero di queste, che ci guadagnano in purezza.

5.1.5 - Colonna per la separazione dell'estratto.

Per quanto riguarda le dimensioni della colonna da usare, solitamente si considera la seguente proporzione: 50 g di silice per ogni grammo di estratto da cromatografare.

Se poi l'estratto è solubile nell'eluente scelto come eluente di partenza, lo si può introdurre direttamente in colonna; in caso contrario lo si dovrà far prima adsorbire su silice, aiutandosi con un po' di solvente in cui l'estratto è solubile (solitamente CH_2Cl_2 o Acetone). Allontanato poi completamente in solvente utilizzato, si introduce il 'polverino' sifatto in colonna.

5.1.6 - Andamento della colonna per la separazione dell'estratto.

Si raccoglie l'estratto in provette fino a che, tramite controllo per cromatografia TLC, si è certi che tutta la sostanza che forma la prima banda è stata esaurita in colonna; si cambia perciò l'eluente della colonna aumentando il grado di polarità della miscela giocando sulla percentuale di EtilAcetato.

Lo stesso procedimento sarà ripetuto fino a che saranno state recuperate tutte le sostanze che interessano.

Finita la cromatografia su colonna, le provette che contengono gli stessi componenti vengono riunite ed il solvente viene evaporato sotto vuoto. I campioni recuperati vengono purificati per cristallizzazione e inviati all'analisi.

5.2 - Caratterizzazione di un recettore gustativo per i lattoni sesquiterpenici

L'intera zona codificante il gene hTAS2R46 (AF494227) è stata clonata nel vettore pcDNA5FRT (Invitrogen) con l'aggiunta per mutagenesi di un sito di restrizione per EcoRI al di fuori della MCS (MultiCloning Site). Il cDNA codificante 45 amminoacidi del recettore 3murino per la somatostatina è stato posizionato al 5' della sequenza di hTAS2R46 per facilitare il posizionamento in membrana del recettore clonato. La porzione C-terminale è stata invece estesa con una sequenza corrispondente alla glicoproteina D dell'herpes simplex virus (HSV-tag) per permettere una facile identificazione dell'espressione proteica.

Si utilizzano le cellule HEK293T stabilmente trasfettate con la proteina chimerica G α 16gust44 coltivate in piastre con 1 μ g/ml di lisina poly-D in DMEM contenente il 10% di siero fetale bovino, 100 Unità/ml di penicillina, e 100 μ g/ml di streptomina a 37°C col 5% di CO₂. Per un esperimento, le cellule vengono spostate e lasciate aderire su una piastra a 96 pozzetti con una densità di 3 x 10⁵ cells/pozzetto e incubate la notte. La trasfezione transiente avviene con 300ng di hTAS2R46 per pozzetto quando si ha una confluenza del 60-70%, utilizzando Lipofectamin 2000 secondo quanto prescritto dal produttore (Invitrogen). Dopo 24-30 ore, alle cellule viene aggiunto per 1 ora Fluo-4-AM (Molecular Probes), quindi tre cicli di lavaggio con buffer C1 (130mM NaCl, 5mM KCl, 10mM Hepes, 2mM CaCl₂, 10mM glucosio (pH 7.4)) per 30 minuti circa. Le sostanze sono dissolte in buffer C1 ed eventualmente in DMSO, senza eccedere oltre la concentrazione finale del 1%, quindi si testano utilizzando un automatico FLIPR (FLuorometric Imaging Plate Reader, Molecular Devices). Si esegue anche un controllo negativo per ogni piastra. L'incremento del

livello di calcio intracellulare è monitorato a 510 nm utilizzando per l'eccitazione una radiazione a 488 nm. Tutte le concentrazioni sono testate in triplicato in due differenti esperimenti. I dati vengono corretti in base alla densità delle cellule.

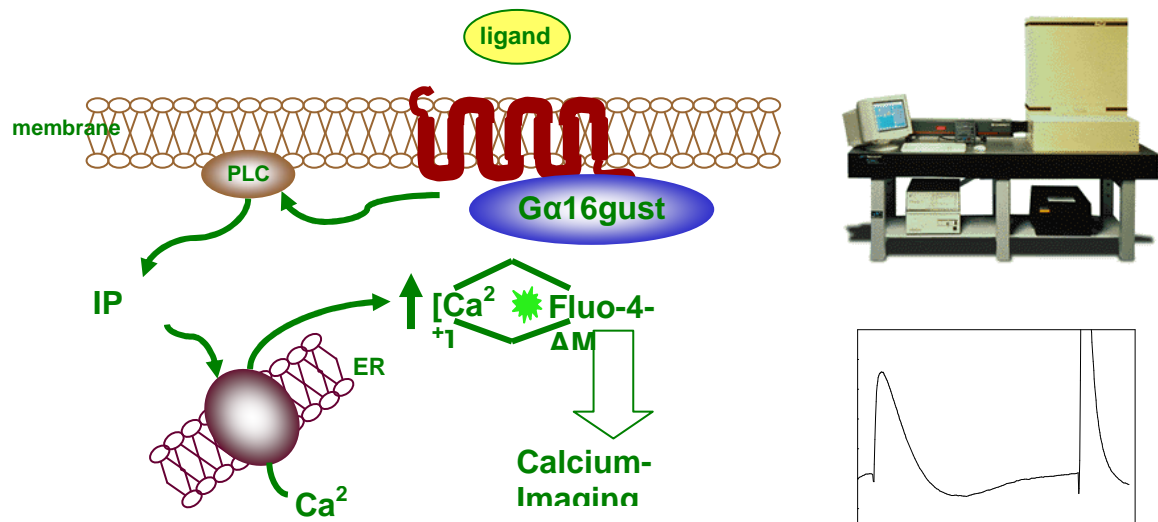


Figura 7: il FLIPR e il suo meccanismo di funzionamento.

6 - RISULTATI E DISCUSSIONI

6.1 – Messa a punto di una metodica di ottenimento della Grosseimina

Per quanto riguarda la metodica di ottenimento della Grosseimina, si segue quella descritta nel Capitolo 5.1 precedentemente trattato, fino all'eliminazione delle clorofille trattata nel paragrafo 5.1.2; si prosegue quindi con l'evaporazione dell'Etanolo mediante uso di evaporatore rotante.

A questo punto del procedimento estrattivo si ottengono, nel pallone di raccolta, due fasi: una parte acquosa, di color bianco opaco, e una parte resinosa di color giallo ocra che lambisce le pareti del pallone stesso. Un controllo per TLC evidenzia che la Grosseimina si ritrova quasi esclusivamente nella fase acquosa, insieme a poche altre sostanze.

Le due fasi vengono perciò separate per filtrazione su carta e sulla fase acquosa si procede con il Clean-up descritto nel paragrafo 5.1.3.

Si procede quindi alla purificazione dell'estratto così ottenuto per cromatografia su colonna C.C. con gel di silice e miscela di eluenti PetrolEtere/EtOAc in rapporto 8:2 (per eliminare parte delle sostanze con Rf minore della Grosseimina) e 7:3 (con il quale la Grosseimina fuoriesce dalla colonna, sotto forma di polvere bianca e pulita).

Nel paragrafo che segue viene riportato un esempio di estrazione che mette in evidenza le quantità di prodotti e solventi utilizzati per ottenere la Grosseimina pura.

6.1.1 – Un esempio di estrazione

Estrazione Acetonica.

È stata impiegata una quantità di foglie seccate e macinate pari a **200 g** e un volume di Acetone per l'estrazione pari a **1.5 L** (1 estrazione con acetone puro e 2 con acetone recuperato). È stato ottenuto un estratto acetonicò di **13.97 g**.

Precipitazione clorofille.

Sono stati utilizzati **150 mL** di Etanolo e **150 mL** di soluzione di PbCOOCH_3 al 3% (4.5 g di PbAcetato); la miscela così ottenuta è stata lasciata a riposare per circa trenta minuti lontano dalla luce, in uno armadietto di laboratorio. La soluzione è stata poi filtrata su carta ed evaporata dall'Etanolo.

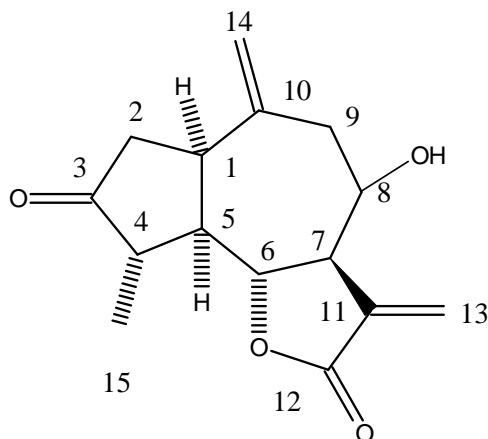
Separate le due fasi, come sopra descritto, si è effettuato il Clean-up consistente in un lavaggio con EtilAcetato (EtOAc) mediante 4 estrazioni da 50 mL l'una; a questo è seguita l'anidificazione con Na_2SO_4 anidro, filtrazione ed evaporazione del solvente mediante evaporatore rotante.

Si è ottenuto un Estratto di peso pari a : **0.66 g**, che viene purificato per C.C. su silice.

La resa della Grosseimina mediante un'estrazione con solventi sulle foglie di carciofo risulta perciò essere dello 0.33 %.

6.2 – Modificazioni strutturali

Grosseimina



Caratteristiche

La Grosseimina si presenta come una polvere bianca, leggermente giallastra; ha un peso molecolare PM di 262.31 e un punto di fusione a 196-199°C.

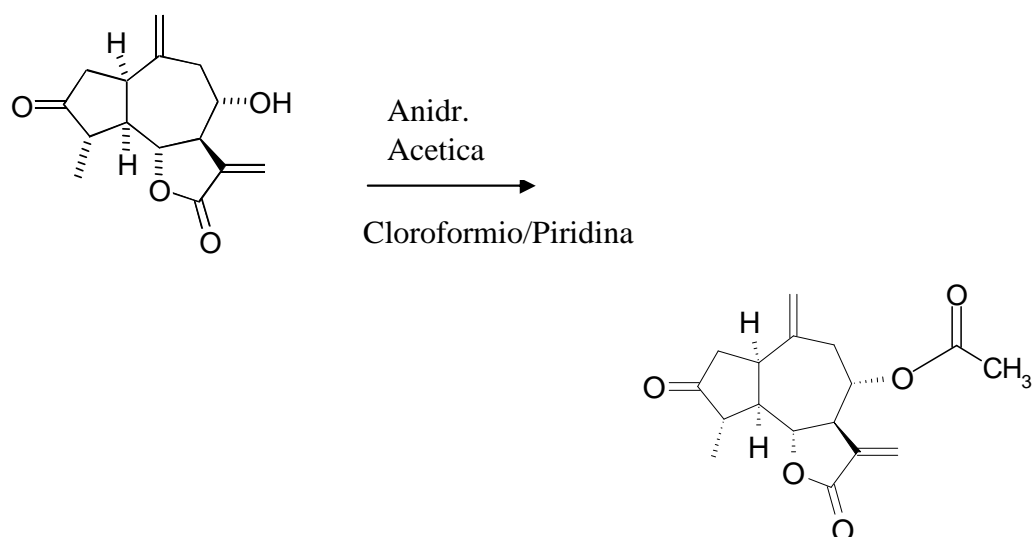
È perfettamente solubile in solventi come Acetone, Metanolo e Piridina, parzialmente in Cloroformio e Diclorometano.

Risulta visibile alla lampada Uv a $\lambda=254$ nm , assume una colorazione bruna-ocra con l'evidenziante al solforico e viene evidenziata con il Pancaldi.

Gli spettri NMR protonici e al Carbonio13 sono rispettivamente fig. 7.1 e fig. 7.2; nella tabella 7.1 vengono riportate le attribuzioni dei segnali più significativi.

6.2.1 – Modificazioni della funzione ossigenato in 8

• 6.2.1.1 – Acetilazione Grosseimina



200 mg di **Grosseimina** (0.762 mmol; PM =262) vengono fatti reagire con 389 mg di **Anidride Acetica** (5 equiv=3.81 mmol; PM= 102.09; corrispondenti a 0.360 mL con $\delta=1.08$ g/mL) in CHCl₃ (3 mL) con aggiunta un eccesso di Piridina (1 mL corrispondente a \wedge 16 eq; PM=79.10; $\delta P= 0.98$ g/mL) a T ambiente e sotto agitazione per 48 h, fino a completezza.

L'anidride acetica viene aggiunta goccia a goccia mediante un imbuto di carico.

Si controlla per TLC l'andamento della reazione con eluente PEtere/EtOAc in rapporto 5:5 e con evidenziante Pancaldi (Ce(SO₄)₂ aq /H₂SO₄/(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O); Rf_{in 5:5 P/E} : **G** =1.95

Si evidenzia la scomparsa di G, la presenza della macchia relativa alla Piridina in eccesso e di un'unica macchia a Rf_{in 5:5 P/E} : 1.28 , visibile all'Uv e al Pancaldi.

La soluzione di reazione è concentrata il più possibile all'evaporatore rotante, ottenendo un olio, di peso: 1.693 g.

Si procede con una purificazione del prodotto per via cromatografica mediante una C.C. in silice (15 mL) con EtOAc.

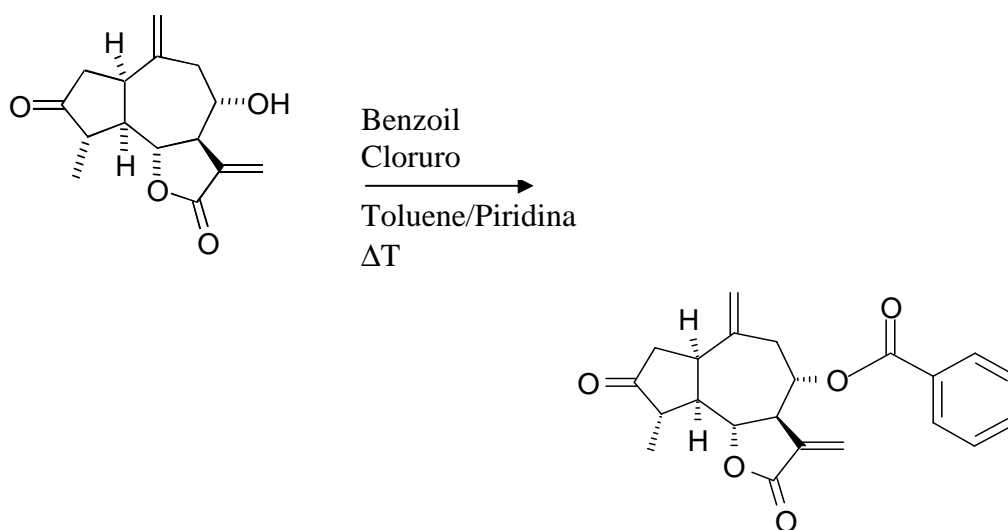
Si ottiene un solido bianco sporco di peso 0.192 g che, lavato 3 volte con 8:2 PEtere/EtOAc, fornisce un solido bianco rosato, di peso: 0.172 g

Resa teorica 100% = 0.255 g (PM = 335.27)

Resa: 67.4 %

Analisi effettuate: $^1\text{H-NMR}$ (fig. 7.3 e tab. 7.2)

• 6.2.1.2 – Benzilazione Grosseimina



200 mg di **Grosseimina** (0.763 mmol) vengono fatti reagire con 429 mg di **Benzoil Cloruro** (4 equiv=3.053 mmol, PM= 140.57, corrispondente a 0.355 mL con $\delta=1.21$ g/mL) in Toluene (5 mL) con aggiunta di 1 mL di **Piridina** (eccesso) a T=100°C (a intervalli regolari di 12 h) e sotto agitazione per 96 h.

Il **BC** viene aggiunta goccia a goccia mediante un imbuto di carico assieme alla **P**.

Si controlla per TLC controllo per TLC, eluente 7:3 PEtere/EtOAc con evidenziante Solforico 5% in Metanolo.

Rf_{in 7:3 P/E} : **G** =9.5

Alla fine della reazione si evidenzia la scomparsa di **G**, di diverse macchie visibili all'Uv, con Rf minori di **G**; di una macchia visibile all'Uv e colorata al solforico (marron-ocra) con Rf minore di **G** e molto evidente (Rf_{in 7:3 P/E} : **X** =2.53) che corrisponde al prodotto cercato.

La soluzione di reazione è concentrata il più possibile all'evaporatore rotante, ottenendo un olio, di peso: 0.545 g.

Si procede con una purificazione del prodotto per via cromatografica mediante una C.C. in silice (20mL), partendo da un eluente di miscela 9:1 in PEtere/EtOAc.

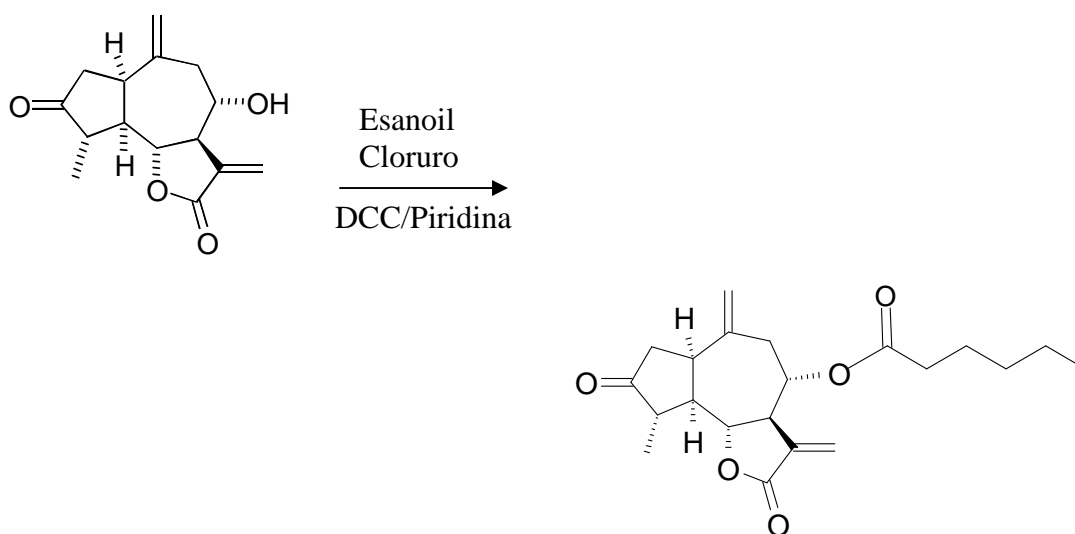
Il nostro prodotto esce con eluente 8:2 come solido bianco di peso: 0.176 g.

Resa teorica 100%: 0.280 g (PM= 366.41)

Resa: 63 %

Analisi effettuate: $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ (fig. 7.4 e fig. 7.5; tab. 7.3)

- 6.2.1.3 – Reazione con Esanoil Cloruro



200 mg di **Grosseimina** (1 equiv= 0.763 mmol) vengono fatti reagire con 308 mg di **Esanoil Cloruro** (3 equiv=2.29 mmol, PM= 134.61, corrispondente a 0.320 mL con $\delta=0.963$) in CH_2Cl_2 (3 mL) con aggiunta di 1 mL di **Piridina** a T ambiente e sotto agitazione per 24 h, fino a completezza.

L'EC viene aggiunto goccia a goccia mediante un imbuto di carico.

Controllo per TLC, eluente 5:5 in Petere/EtOAc con evidenziante Pancaldi ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2_{\text{aq}}/\text{H}_2\text{SO}_4/(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$);

$R_{f \text{ in } 5:5 \text{ P/E}}$: **G**= 2.29

La soluzione è color giallo scuro; per TLC si evidenzia la scomparsa di G e la presenza di una macchia a $R_{f \text{ in } 5:5 \text{ P/E}} = 1.45$, non visibile all'Uv e visibile al Pancaldi, corrispondente al prodotto cercato.

La soluzione di reazione è concentrata il più possibile all'evaporatore rotante, ottenendo un olio, di peso: 0.759 g.

Si procede con una purificazione del prodotto per via cromatografica mediante una C.C. in silice (25mL), partendo da un eluente di miscela 9:1 in PEtere/EtOAc.

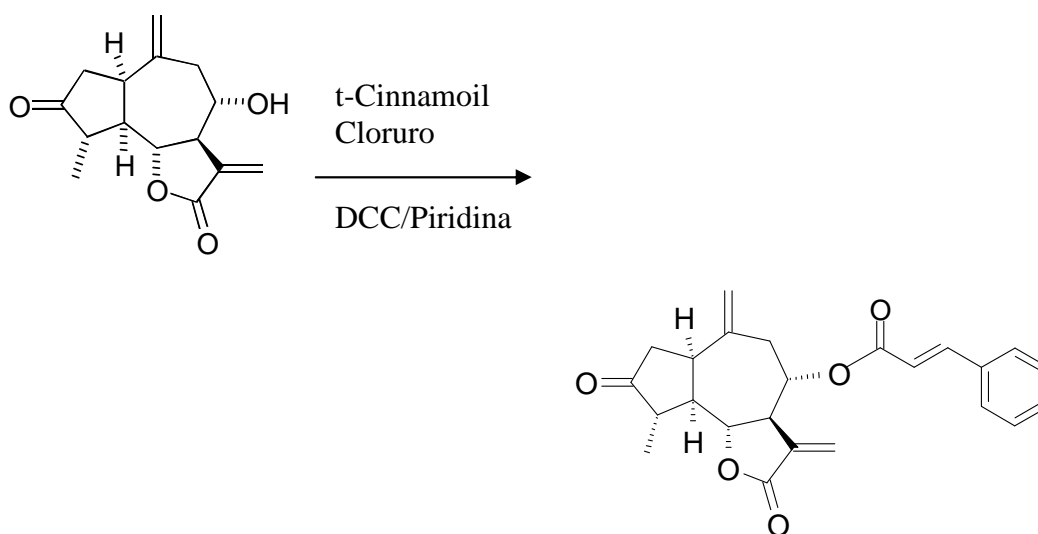
Il prodotto cercato esce con miscela 9:1/8:2 , come solido bianco di peso: 0.215 g; poiché presenta impurezze, si effettua una filtrazione del prodotto su Allumina neutra, ottenendo un prodotto pulito e di peso: 0.187 g

Resa teorica 100%= 0.275 g (PM= 360.45)

Resa: 68 %

Analisi effettuate: ¹H-NMR (fig. 7.6; tab. 7.4)

- 6.2.1.4 – Reazione con trans-Cinnamoil Cloruro



200 mg di **Grosseimina** (1 equiv=0.763) vengono fatti reagire con 255 mg di trans-Cinnamoil Cloruro (2 equiv, PM= 166.61) in CH₂Cl₂ (2 mL, per sciogliere il t-CC) e 2 mL di Piridina che scioglie completamente G, a T ambiente e sotto agitazione, fino a completezza.

Nb: Il t-CC va pesato sotto cappa, con dovute precauzioni: è corrosivo e di odore acre.

Controllo per TLC, eluente 5:5 in PEtere/EtOAc con evidenziante Pancaldi (Ce(SO₄)₂ aq /H₂SO₄/(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O);

Rf_{in 5:5 P/E}: **G** =2.37

La reazione sembra completa; per TLC si evidenzia la scomparsa di G, la presenza di una macchia a Rf_{in 5:5 P/E} = 1.36, visibile all'Uv e al Pancaldi, corrispondente al prodotto cercato più delle impurezze.

La soluzione viene concentrata all'evaporatore rotante, ottenendo una pasta bianco sporco di peso: 0.863 g, che viene purificata per C.C., in allumina (25 mL) a partire da un eluente di miscela 8:2 in PetrEtere/EtOAc.

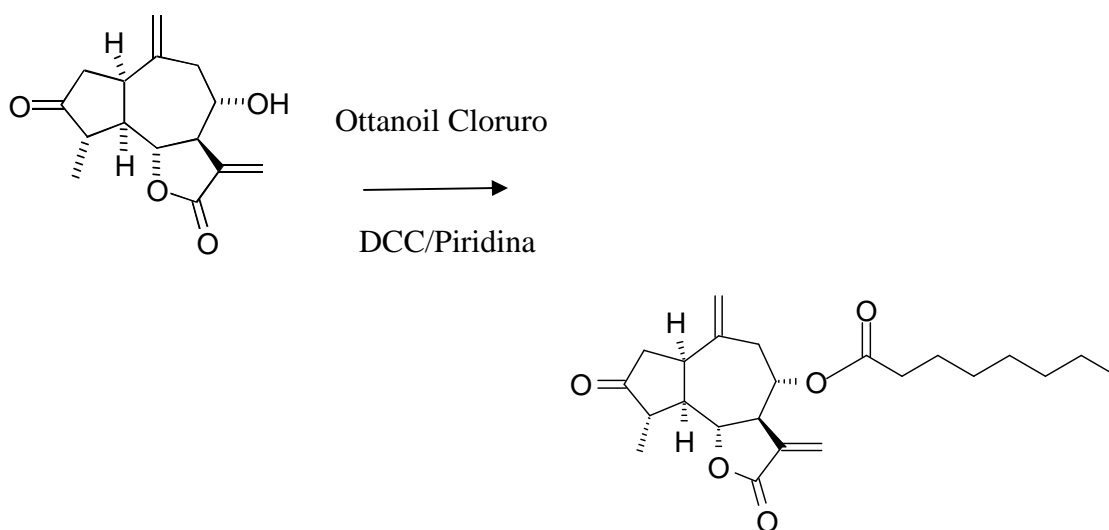
Il nostro prodotto esce con miscela 8:2, come solido bianco di peso:
0.039 g.

Resa teorica 100% = 0.299 g (PM = 392.45)

Resa: 13 %

Analisi effettuate: $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ (fig. 7.7 e fig. 7.8; tab. 7.5)

- 6.2.1.5 – Reazione con Ottanoil Cloruro



200 mg di **Grosseimina** (1 equiv=0.763 mmol) vengono fatti reagire con 620 mg di **Ottanoil Cloruro** (5 equiv=3.365 mmol, PM= 162.66 corrispondente a 0.65 mL con $\delta=0.95$) in CH_2Cl_2 (3 mL) con aggiunta di 1mL di Piridina, a T ambiente e sotto agitazione per 24 h, fino a completezza.

L'OC viene aggiunto goccia a goccia mediante un imbuto di carico.

L'andamento della reazione viene seguito tramite TLC, utilizzando come eluente la miscela 1:9 in PEtere/EtOAc e l'evidenziante Pancaldi $\text{Ce}(\text{SO}_4)_{2\text{aq}}/\text{H}_2\text{SO}_4/(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $R_{f \text{ in } 1:9 \text{ P/E}}: \mathbf{G} = 1.42$.

Alla fine della reazione per TLC si evidenzia la scomparsa di G e la presenza di un'unica macchia a $R_{f \text{ in } 1:9 \text{ P/E}} = 1.07$, visibile all'Uv e al Pancaldi.

Concentrata la soluzione all'evaporatore rotante, si ottiene una pasta bianco sporco, di peso: 1.56 g, che viene purificata con una C.C. in allumina (25 mL) con EtOAc.

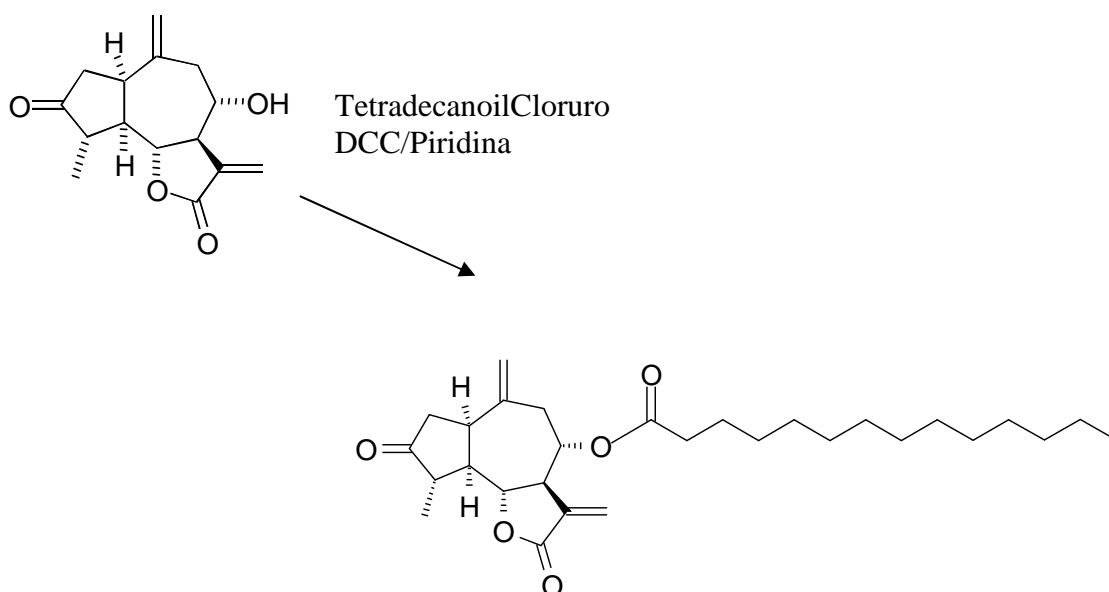
Si ottiene un solido bianco, filtrato su allumina neutra, di peso: 0.120 g.

Resa teorica (100%): 0.296 g

Resa: 40.5 %

Analisi effettuate: $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ (fig. 7.9 e fig. 7.10; tab. 7.6)

- 6.2.1.6 – Reazione con Tetradecanoil Cloruro



200 mg di **Grosseimina** (1 equiv=0.763 mmol) vengono fatti reagire con 565 mg di **Tetradecanoil Cloruro** ('Miristoil Cloruro') (3 equiv=2.289 mmol, PM= 246.82 corrispondente a 0.622 mL con $\delta=0.908$) in CH_2Cl_2 (3 mL) con aggiunta di \wedge 2 mL di **Piridina** a T ambiente e sotto agitazione per 24 h, fino a completezza.

Il TDC viene aggiunto goccia a goccia mediante un imbuto di carico.

La reazione viene controllata per TLC, eluente 5:5 in PEtere/EtOAc con evidenziante Pancaldi ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \text{ aq} / \text{H}_2\text{SO}_4 / (\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$); R_f in 5:5 P/E: **G** =2.1.

Alla fine della reazione si evidenzia la formazione di una macchia a R_f in 5:5 P/E: **X** =1.14, evidenziata con il Pancaldi; sono presenti anche altri prodotti.

La soluzione viene concentrata all'evaporatore rotante, ottenendo un olio misto a solido di peso: 2.778 g

Questo viene purificato attraverso filtrazione su allumina neutra, seguito da una C.C. in silice (25mL) a partire da un eluente di miscela 9:1 in PetrEtere/EtOAc.

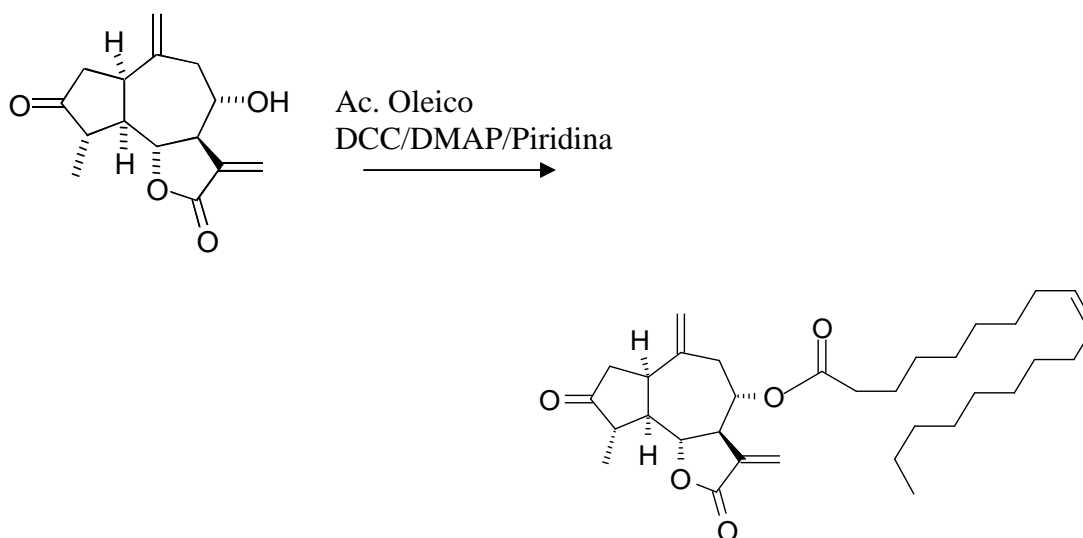
Il nostro prodotto esce con miscela 9:1 come un solido bianco di peso: 0.287 g.

Resa teorica (100%): 0.318 g (PM=472.67)

Resa: 90.2%

Analisi effettuate: $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ (fig. 7.11 e fig. 7.12; tab. 7.7).

- 6.2.1.7 – Reazione con Acido Oleico



200 mg di **Grosseimina** (1 equiv=0.763) vengono fatti reagire con 1,078 g di **Acido Oleico** (5 equiv=3.815 mmol, PM=282.47, corrispondente a 1.210 mL con $\delta=0.89$), liquido giallo viscoso, in CH_2Cl_2 (3 mL) con aggiunta di 173 mg di DCC (N,N' dicicloesil carbodiimide: 1.1 eq, PM. 206.33) e 75 mg di DMAP (Dimetilammino piridina: 0.8 eq, PM. 122.17) a T ambiente e sotto agitazione per 24 h, fino a completezza.

L'AO viene aggiunto goccia a goccia mediante un imbuto di carico.

La reazione viene controllata per TLC, eluente 5:5 in PEtere/EtOAc con evidenziante Pancaldi ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ aq / H_2SO_4 /(NH_4) $_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$); R_f in 5:5 P/E: **G** =1.71.

Alla fine della reazione, la soluzione è color arancio; è presente una grossa quantità di precipitato bianco; sono presenti due sostanze predominanti.

Una ha R_f in 5:5 P/E: **X1** =1.2; un'altra di R_f in 5:5 P/E: **X2** =1.1.

Viene effettuato un lavaggio con H_2SO_4 2N e con NaHCO_3 sat.; concentrata la soluzione si ottiene un solido bianco miscelato ad un liquido scuro, di peso: 0.872 g.

Ridiluito con CH_2Cl_2 e filtrato su celite, si separa un liquido marroncino (**XL**, la TLC evidenzia 2 sostanze di cui una è **X1** e l'altra è Grosseimina non reagita) e un precipitato bianco che viene recuperato lavando la celite con acetone (la TLC evidenzia 1 sostanza pura di peso 0.078 g, **Xs** = **X2**. L'NMR protonico conferma che non è la sostanza desiderata).

XL, concentrato all'evaporatore rotante, fornisce un olio giallino, di peso: 0.940 g, che viene purificato per C.C. in silice (30mL) a partire da un eluente di miscela 9:1.

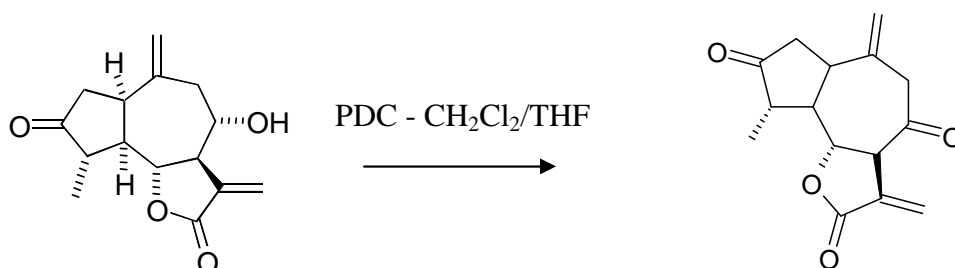
Il nostro prodotto esce con miscele 9:1 e 8:2 in Petere/EtOAc; si ottiene X1, un olio di peso: 0.145 g.

Resa teorica X_1 (100%): 0.391g (PM=512.65)

Resa: 37 %

Analisi effettuate: ^1H -NMR, ^{13}C -NMR (fig. 7.13 e fig. 7.14; tab. 7.8).

- 6.2.1.8 – Ossidazione con PDC



200 mg di **Grosseimina** (1 equiv=0.763 mmol) vengono fatti reagire con 250 mg di **PDC** (PM.376.21=0.87 equiv=0.6645 mmol) in CH₂Cl₂/THF in rapporto 8:2 (10 mL) a T ambiente e sotto agitazione, fino a completezza.

La reazione viene controllata per TLC con eluente 2:8 P/E ed evidenziante al solforico; R_f in 2:8 P/E : **G** =1.79 , ocra al solforico, Uv-vis.

La soluzione è torbida per la presenza del PDC di colore marron scuro. Dopo 24 h il ppt è di color nero; per TLC si evidenzia la presenza di una macchia a ugual R_f di G, marron al solforico e Uv+; di una macchia Uv+ ma incolore al solforico, con R_f in 2:8 P/E =1.39; e di una macchia Uv+ e incolore al solforico, R_f in 2:8 P/E : =2.39 (che dovrebbe corrispondere al prodotto cercato).

Si filtra su allumina neutra, eliminando il prodotto di R_f in 2:8 P/E =1.39, e si elimina il solvente evaporando all'evaporatore rotante. Si ottiene un prodotto denso di peso: 0.250 g.

Effettuando una purificazione su colonna in silice 30 mL, con miscele in P:E in rapporto da 5:5 a 2:8, si isola un solido pastoso color biancastro di peso: 0.050 g.

Resa teorica X_1 (100%): 0.201g (PM=261)

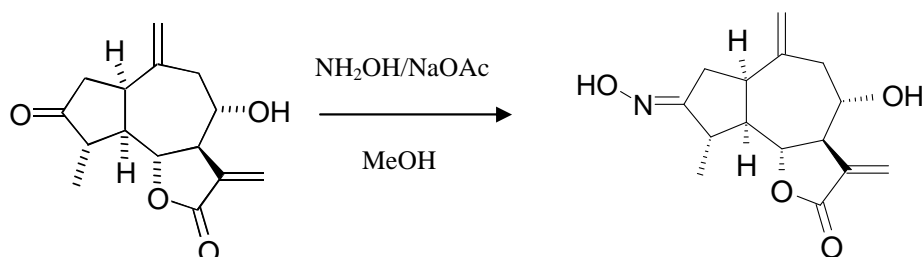
Resa: 25 %

Analisi effettuate: $^1\text{H-NMR}$ (fig. 7.15; tab. 7.9).

Nb: Si riprova aumentando il tempo di reazione (72 h) e il rapporto con l'ossidante in 1:3. Si ottiene una resa ancora minore di prodotto (6 mg). Il PDC degrada la Grosseimina.

6.2.2 – Modificazioni del carbonile in 3

• 6.2.2.1 – Ossima della Grosseimina

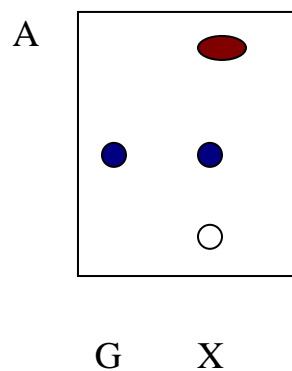


200 mg di **Grosseimina** (1 equiv=0.763) vengono fatti reagire con 106 mg di **Idrossilammina Cloridrata** (2 equiv=1.526 mmol PM=69.50), in MeOH (20 mL) con aggiunta di 62.6 mg di NaOAc (1 eq , PM. 82.03) a T ambiente e sotto agitazione per 24 h, fino a completezza.

La reazione viene controllata per TLC, eluente 5:5 in PEtere/EtOAc con evidenziante Solforico al 5% in Metanolo; R_f in 5:5 P/E : **G** =2.47.

Alla fine della reazione, la soluzione è color giallo, trasparente; sono presenti ancora un po' di Grosseimina più altre 4 sostanze, di cui una più evidente e color oca al solforico, di R_f in 5:5 P/E: **A** =2.21, che corrisponde al prodotto cercato.

La soluzione viene filtrata su allumina neutra e concentrata all'evaporatore rotante: si ottiene un solido bianco di peso: 0.304 g, contenente 3 sostanze, di cui una è G.



La miscela viene purificata con una C.C. in silice (30mL) a partire da un eluente di miscela 8:2 in PetrEtere/EtOAc.

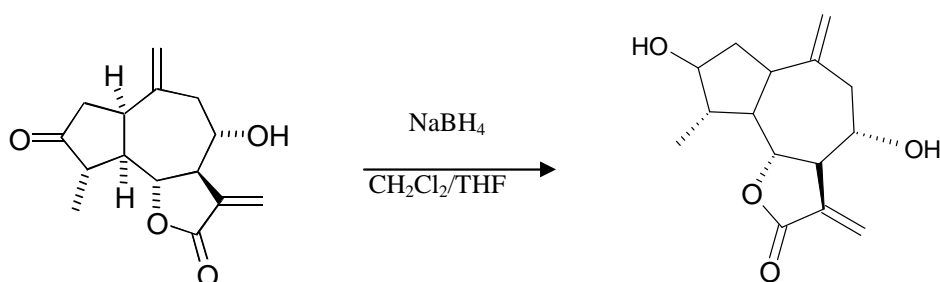
Il nostro prodotto esce con miscela 8:2 e 7:3: si ottengono 0.098 g di prodotto bianco.

Resa teorica (100%): 0.241g (PM= 278)

Resa: 46 %

Analisi effettuate: $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ (fig. 7.16 e fig. 17.17; tab. 7.10).

- 6.2.2.2 – Riduzione con NaBH₄.



200 g di Grosseimina (1 equiv=0.763 mmol) vengono fatti reagire con 28.86 mg di NaBH₄ (0.763 mmol; 1 mol=4 equiv; PM= 37.83 uma) in CH₂Cl₂/THF 8:2 (30 mL) a T ambiente e sotto agitazione fino a completezza.

La soluzione è limpida; si sviluppa H₂.

La reazione è controllata mediante TLC con evidenziante al solforico e eluente 2:8 in Petere/EtOAc; la Grosseimina ha Rf_{in 2:8 P/E} : 1.5.

Si lascia in agitazione per 1h.

Per TLC si evidenzia la presenza di vari prodotti, di cui ne spiccano tre: uno a Rf_{in 2:8 P/E}: 2, colorato di viola all'evidenziante e Uv+; uno colorato di ocra, Uv+, di ugual Rf di G :1.5; e uno Uv+, di Rf_{in 2:8 P/E} : 1.2, non visibile all'Uv.

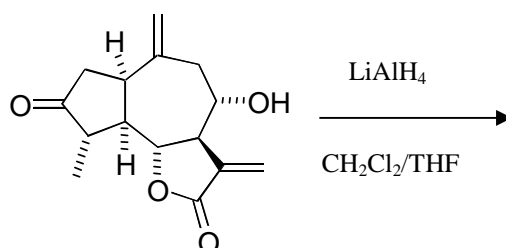
Si tira a secco la soluzione ottenendo un solido bianco sporco, peso: 0.35 g.

Si prova a purificare la miscela con una C.C. in silice (30 mL), con miscele in PEtere/ EtoAc ma non si riesce ad isolare nessuno dei prodotti.

Analisi effettuate: ¹H-NMR (fig. 7.18; tab. 7.11).

6.2.3 – Modificazioni del gruppo lattonico in 12

• 6.2.3.1 – Riduzione con LiAlH_4 .



200 mg (0.673 mmol) di Grosseimina vengono sospesi in 20 mL di CH_2Cl_2 e si aggiungono sotto agitazione magnetica 57 mg di LiAlH_4 (1: 2).

(Nb: Si usa quello grigio).

Si controlla la reazione per TLC (Pe/EtOAc 5:5 , $R_{fG}=1.63$)

Dopo 1h la reazione è come bloccata; si aggiungono allora 10 mL di MeOH e si controlla per TLC: la Grosseimina si esaurisce quasi subito.

Poiché la soluzione contiene ancora LiAlH_4 non reagito, si filtra ottenendo una soluzione gialla trasparente.

E' presente un'unica una sostanza Uv- e gialla al solforico, di $R_f= 1.75$.

Si acidula con H_2SO_4 fino a $\text{pH}=2$ e la soluzione si opacizza.

Si lava con una soluzione di NaHCO_3 , si estrae e si filtra, anidrificando con Na_2SO_4 .

La fase acquosa risulta giallognola e opaca, la fase organica incolore.

Si evapora la fase organica all' evaporatore rotante, ottenendo un olio giallo, contenente il prodotto pulito, che fatto asciugare pesa: 0.270 g.

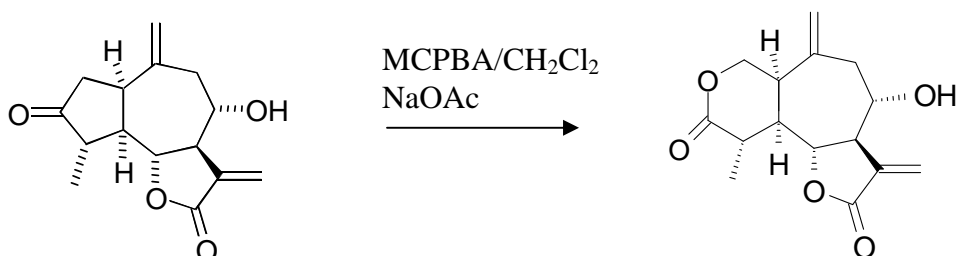
Si prova una TLC su silice del prodotto diluito e filtrato su una Pasteur contenente allumina neutra: la macchia sale, come nel prodotto tq.

Resa: ?

Analisi effettuate: non siamo riusciti, per via del tempo e di problemi con lo strumento, ad effettuare le analisi su questo prodotto.

6.2.4 – Modificazioni del gruppo metilenico in 14

6.2.4.1–Reazione con Acido *m*-Cloro perossibenzoico



200 mg di **Grosseimina** (1 equiv=0.763 mmol) vengono fatti reagire con 198 mg di MCPBA *Acido m-Cloro perossibenzoico* (1.5 equiv=1.14 mmol, PM. 152.57) in CH₂Cl₂ (10 mL) a T ambiente e sotto agitazione, fino a completezza.

Vengono aggiunti 156 mg di NaOAc (1.5 eq) che funge da tampone.

La reazione viene controllata per TLC con eluente 6:4 in PEtere/EtOAc con evidenziante solforico al 5% in Metanolo.

La reazione va a completezza già dopo un'ora per esaurimento di MCPBA; sono presenti 5 sostanze, di cui 2 predominanti: una di R_f uguale a G (R_f in 6:4 P/E: **G** =3.13), indicata con A, di color marron al solforico e visibile all'Uv, e una di R_f in 6:4 P/E: 5.875, colorata di ocra all'evidenziante, indicata con B; le altre tre sono visibili all'Uv, con un R_f molto più alto.

Si esegue una filtrazione della miscela di reazione su allumina neutra per eliminare i prodotti acidi ed eventuale peracido ancora presente.

Concentrato all'evaporatore rotante, si ottiene un precipitato bianco di peso: 0.398 g contenente le due sostanze colorate all'evidenziante!

Si ricorre ad una purificazione mediante una C.C. su allumina (30 mL), polverino in silice e eluente 7:3 P/ E. Si isola B come un solido bianco di peso: 0.072 g, che esce dalla colonna come secondo prodotto.

Resa teorica: 0.212 g (PM=278.3)

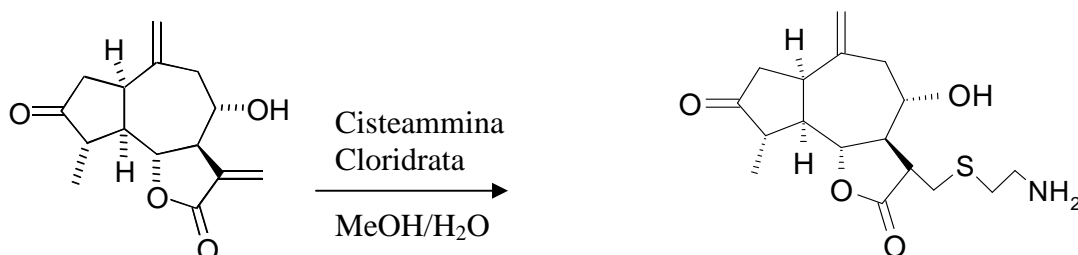
Resa di B: 34%

Analisi effettuate: $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ (fig. 7.21 e fig. 7.22; tab. 7.13).

E' stata effettuata la reazione aumentando il rapporto Peracido:Grosseimina ma parallelamente ad un leggero aumento di prodotto di-lattonico si ha la formazione di una terza sostanza, presumibilmente un intermedio di reazione.

6.2.5-Addizione al doppio legame in 13

• 6.2.5.1 – Reazione con Cisteamina



200 mg di Grosseimina (1 equiv=0.763) vengono fatti reagire con 86 mg di Cisteamina Cloridrata (NH₂-CH₂-CH₂-SH, 1.5 equiv=1.144 mmol, PM=77.14) in una miscela di 2 mL di MeOH/H₂O 4:1 a T ambiente e sotto agitazione per 48h.

La reazione viene controllata per TLC con eluente 3:7 in PEtere/EtOAc e eluente 8:2 in EtOAc/MeOH ed evidenziante H₂SO₄/MeOH al 5%.

La G è visibile all'Uv, marron al Solforico (Rf G =1.22 in 8:2 E/M); la Cisteamina non è invece visibile.

La soluzione durante la reazione assume color verde chiaro; si evidenzia la comparsa di una macchia visibile all'Uv, con Rf inferiore a quello della Grosseimina, non visibile al Solforico; la reazione è completa dopo 48h ed la soluzione assume un color arancione; si evidenzia la scomparsa di G e la presenza di una nuova macchia a Rf inferiore, visibile all'Uv e marron al Solforico di Rf 'R' =1.33, in 8:2 E/M.

La soluzione viene concentrata all'evaporatore rotante, ottenendo un mix di olio e solido polverulento di peso: 0.312 g.

Si ricorre ad una purificazione mediante C.C. in silice (20 mL) con EtOAc.

Si isola R come un solido bianco cristallino, di peso: 0.066 g.

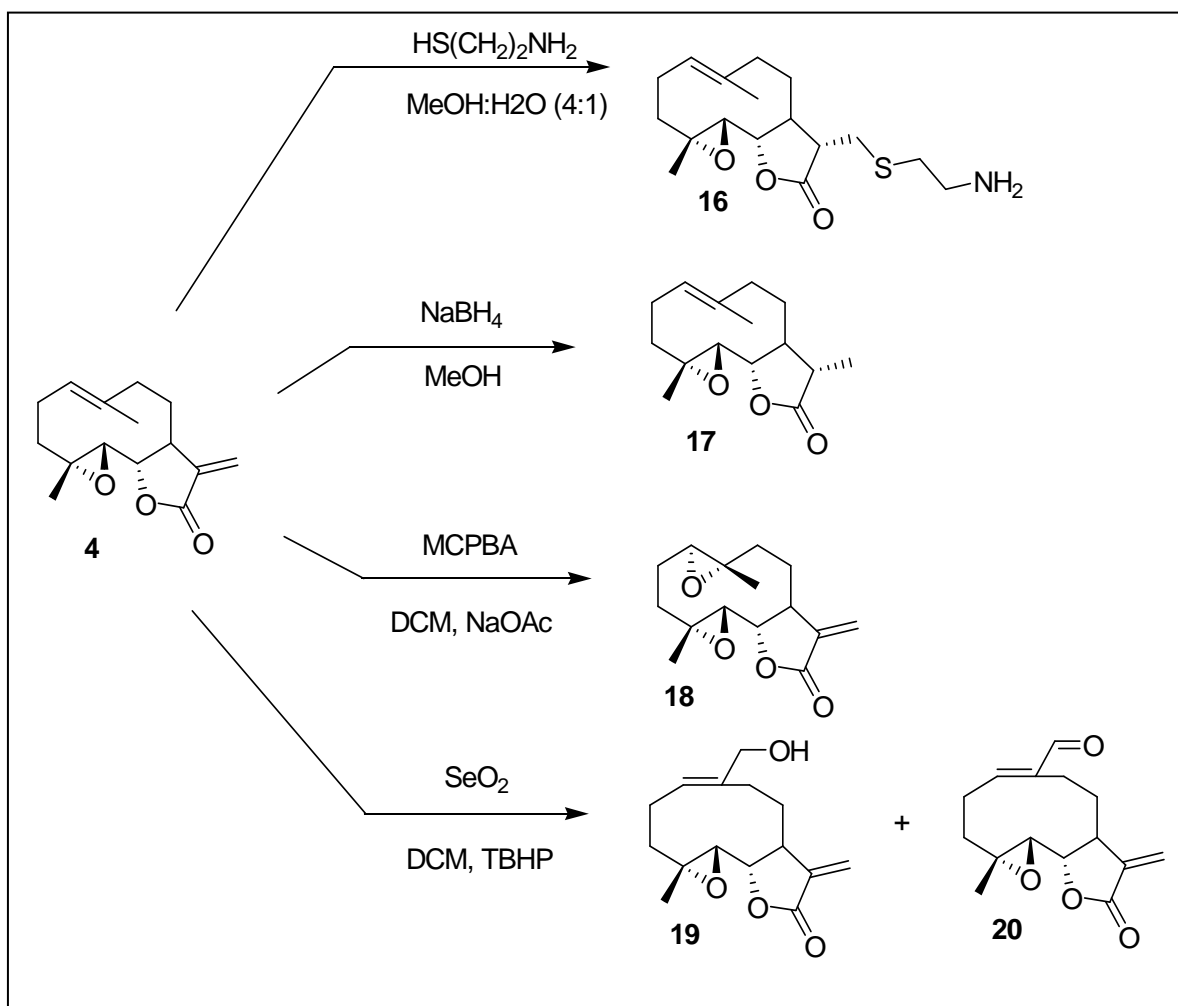
Resa teorica R (100%): 0.285 g

Resa: 23 %

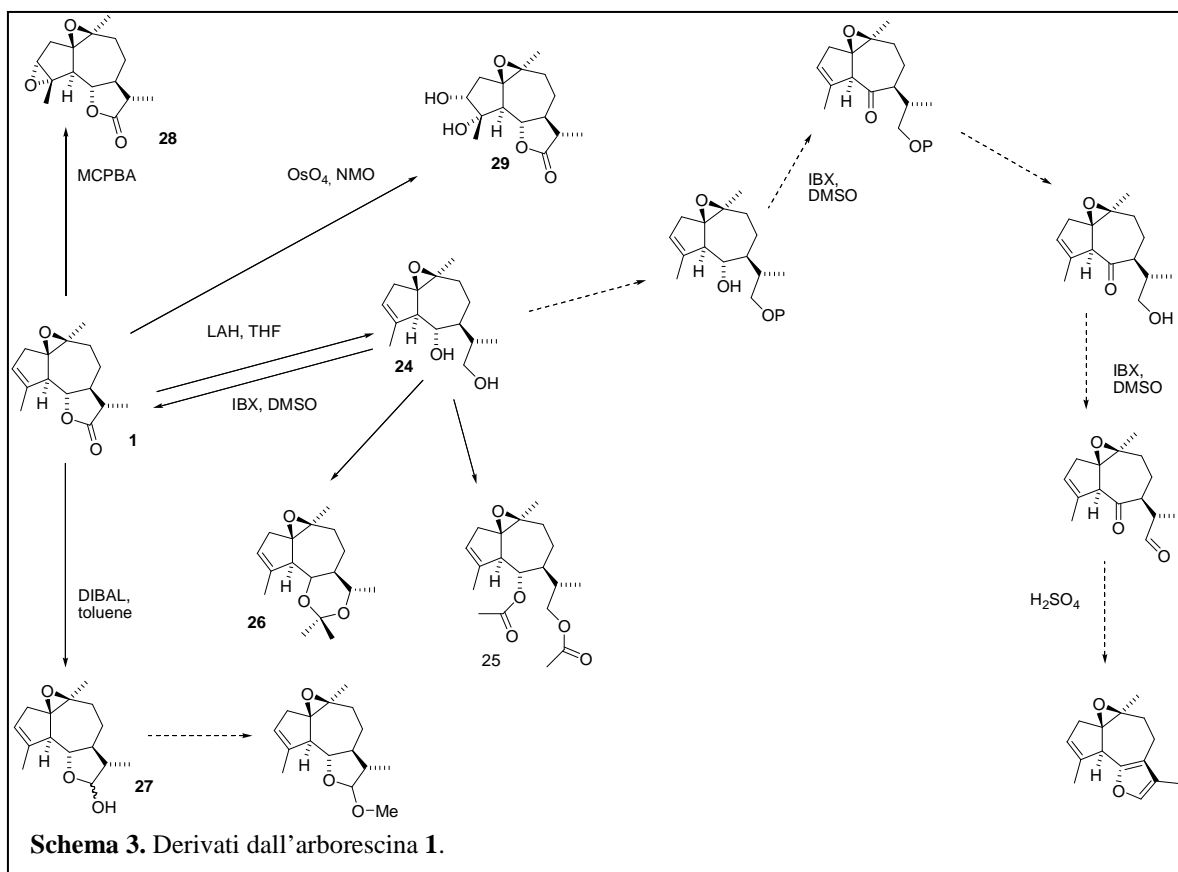
Analisi effettuate: $^1\text{H-NMR}$ (fig. 7.23; tab. 7.14).

Nel paragrafo successivo vengono riportati in modo schematico le sintesi di lattoni sesquiterpenici, di struttura molto simile alle nostre Cinaropicrina e Grosseimina, disponibili da studi effettuati nel laboratorio del prof. Giovanni Appendino, del DISCAFF di Novara, cui mi sono appoggiata per la tesi e dove ho lavorato per alcuni periodi della mia tesi; tali studi sono stati portati avanti con la collaborazione, in particolare, del Dott. Alberto Massarotti con cui ho potuto avviare un lavoro in parallelo tra i derivati del carciofo e i derivati di *Artemisia arborescens* (Arborescina), *Artemisia absinthium* (Absintina) e *Tanacetum vulgare L.* (Partenolide), che hanno una struttura molto simile ai derivati del carciofo e che sono stati, quindi, sottoposti alle medesime sintesi.

6.2.6 Schemi sintetici



Schema 1. Derivati dal partenolide 4.

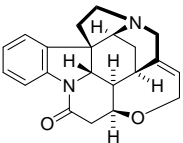
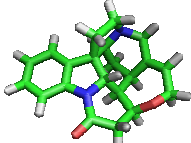
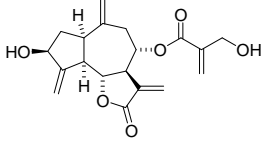
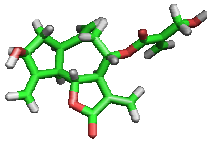
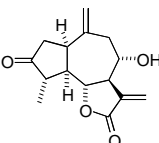
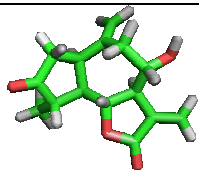
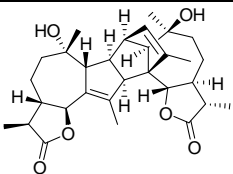
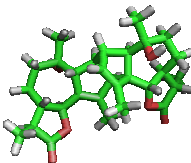
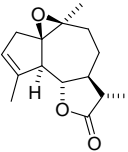
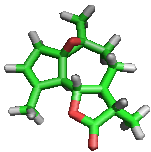
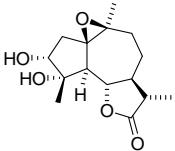
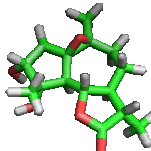
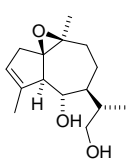
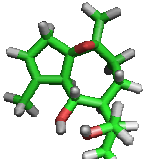


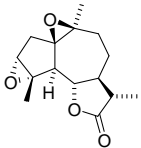
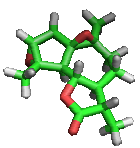
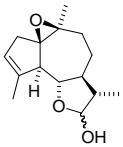
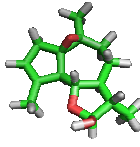
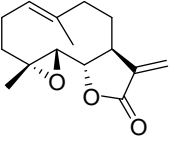
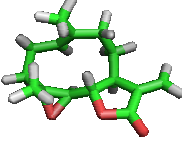
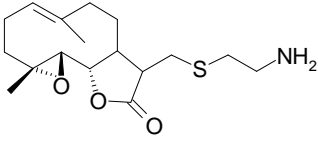
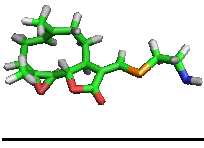
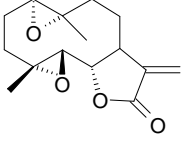
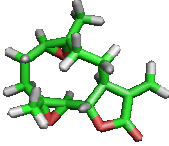
6.3 – Risultati dei saggi biologici

Non per tutte le molecole identificate in questo lavoro sono disponibili i dati sull'attività nei confronti dei recettori hTAS2R, sia perché alcuni composti sono risultati tossici per le cellule in cui i recettori erano espressi e sia perché il tempo ridotto a disposizione non ci ha permesso di ottenere la serie completa dei dati sugli analoghi della Grosseimina.

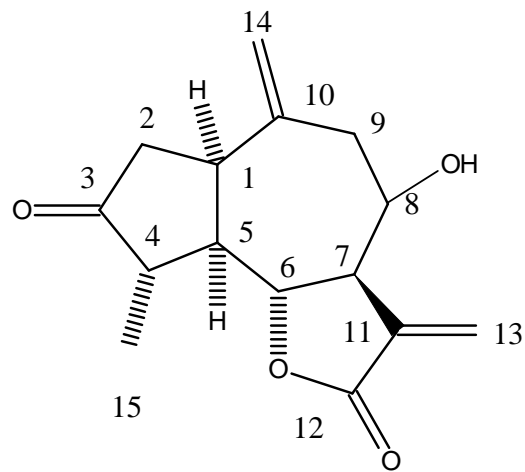
L'analisi recettoriale dei derivati interessati sono stati effettuati dal gruppo di ricerca del prof. W. Meyerhof del German Institute of Human Nutrition di Postdam. Saranno riportati pertanto i risultati ottenuti per la Cinaropicrina e la Grosseimina insieme a quelli ottenuti per i derivati dei lattoni sesquiterpenici Arborescina, Absintina e Partenolide sottoposti a indagine recettoriale .

6.3.1 Dati biologici

Agonista	Struttura		Concentrazione attiva su hTAS2R46
	2D	3D	
Stricnina			~ 0,1 μM
Cinaropicrina			~ 3 μM
Grosseimina			~ 1 μM
Absintina			~ 1 μM
Arborescina			~ 3 μM
Arborescina diidrossi			~ 300 μM
Arborescina diolo			None

Arborescina eossido			~ 100 μM
Arborescina lattolo			~ 10 μM
Partenolide			~ 2 μM
Partenolide cisteammina			~ 3 μM
Partenolide eossido			~ 3 μM

7 - TABELLE



Grosseimina

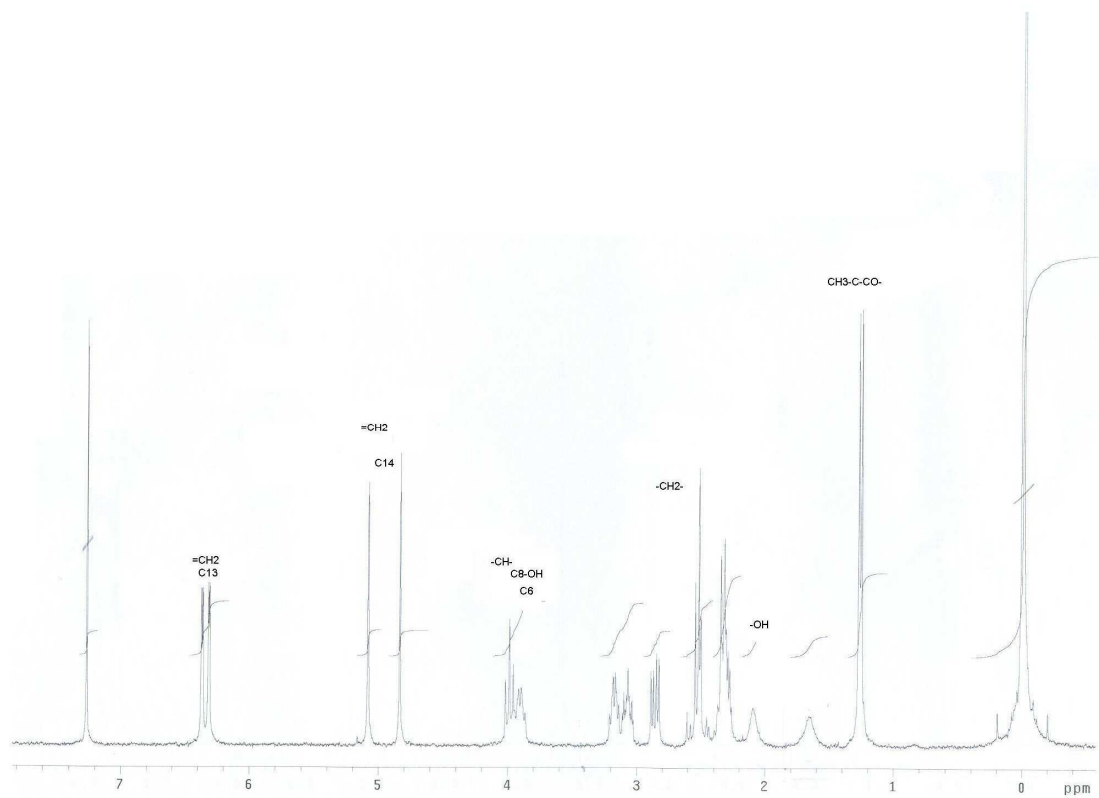


fig. 7.1 - $^1\text{H-NMR}$ Grosseimina

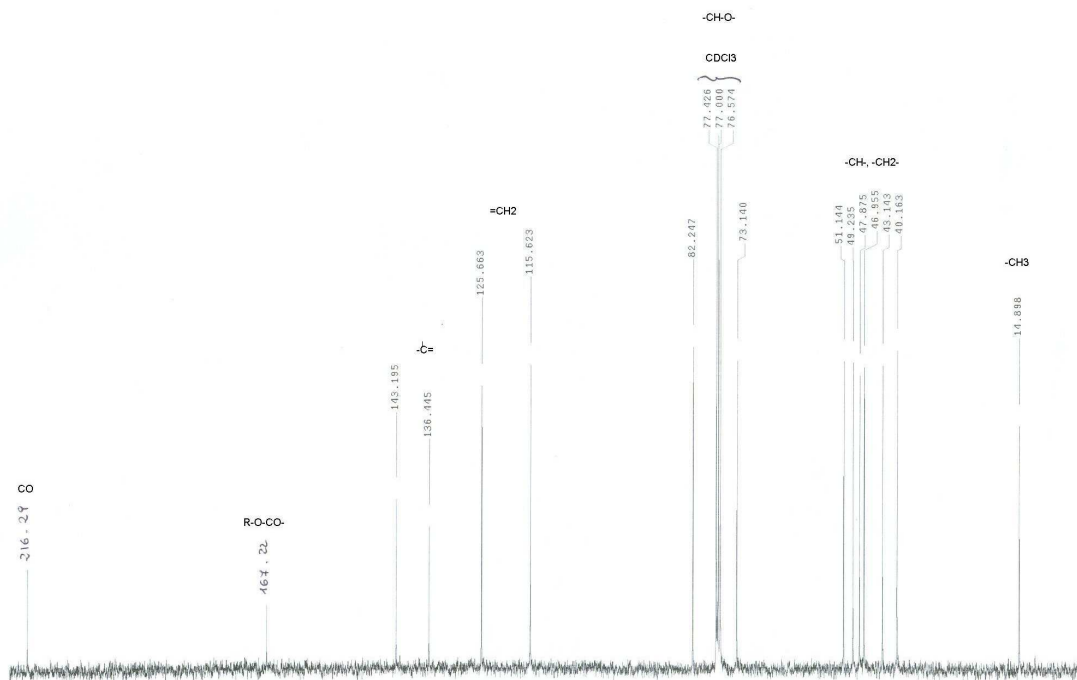
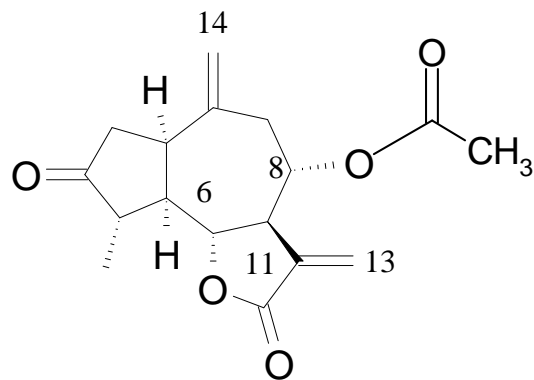


fig. 7.2 – ^{13}C -NMR Grosseimina

	Segnali ^1H in ppm	Segnali ^{13}C in ppm
CH_3 -	1.25; 1.27	CH_3 - 14.9
CH_2	2 - 3.2	CH_2 40.2
CH -	3.8 - 4	CH - 43.1
C_7	3.04 - 3.11	46.9
$\text{C}_{6,8}$	3.86 - 4.02	47.9
		49.2
$=\text{CH}_2$		51.1
C_{14}	4.83; 5.08	$=\text{CH}_2$
C_{13}	6.31; 6.32; 6.36; 6.37	C_{13} 115.6
		C_{14} 125.7
OH	2.09	$\text{R}_2\text{-C=}$ C_{10} 136.4
		C_{11} 143.2
		$=\text{C-O-CO-R}$ C_{12} 167.2
		$-\text{CO}-$ C_3 216.3

Tab. 7.2 Segnali NMR della Grosseimina



Grosseimina Acetato

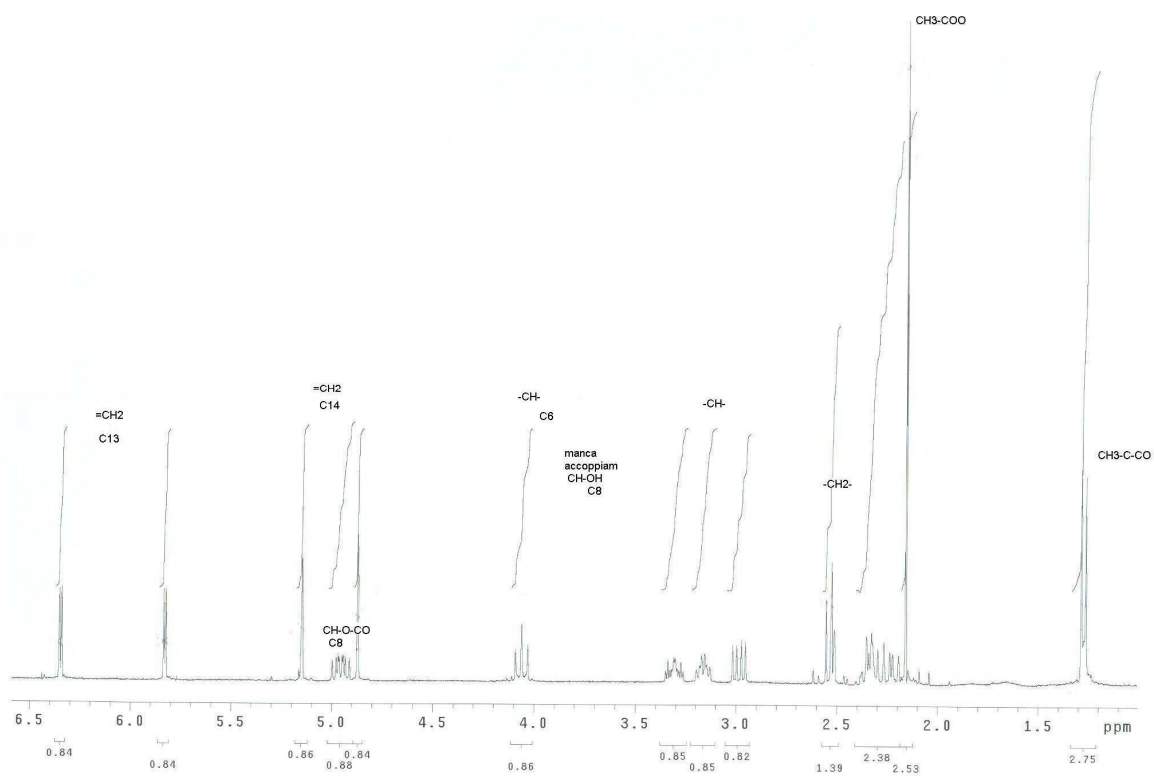
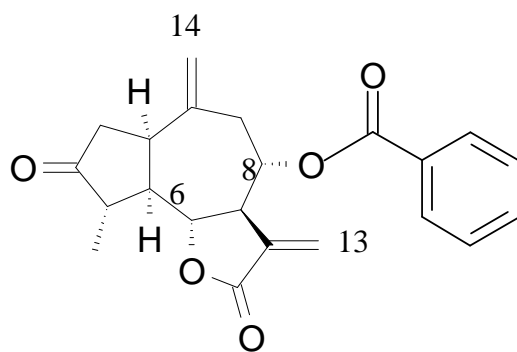


fig. 7.3 - $^1\text{H-NMR}$ Grosseimina Acetato

Segnali ^1H in ppm		
CH_3-		1.26; 1.28
CH_3-COO		2.16
CH_2		2.2-3.4
$\text{CH}-$	C_6	4.03; 4.06; 4.09
	C_8	4.91 - 5.00
$=\text{CH}_2$		
C_{14}		4.87; 5.15
C_{13}		5.82; 5.83; 6.34; 6.35

Tab. 7.2 Segnali NMR della Grosseimina Acetato



Grosseimina Benzoato

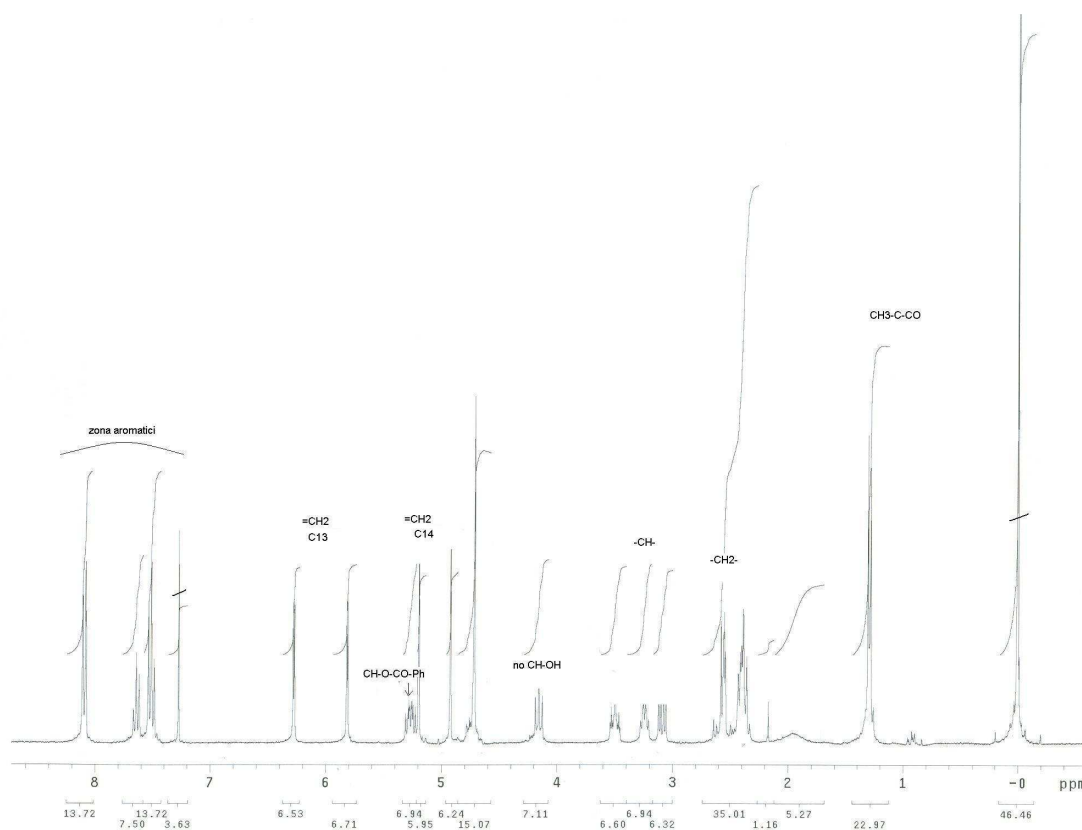


fig. 7.4 $^1\text{H-NMR}$ Grosseimina Benzoato

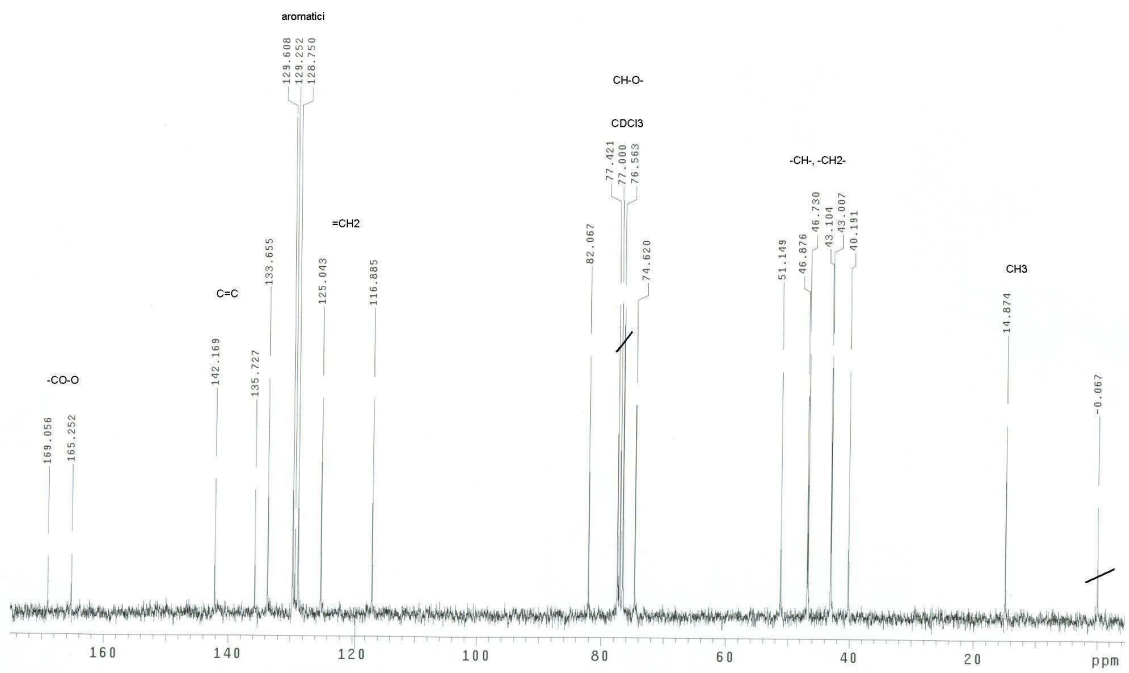
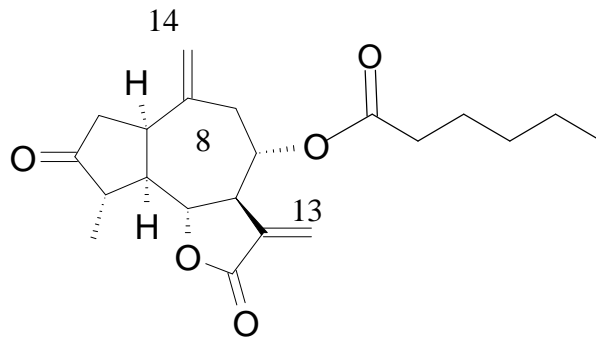


fig. 7.5 ¹³C-NMR Grosseimina Benzoato

Segnali ^1H in ppm		Segnali ^{13}C in ppm	
CH_3-	1.28; 1.31	CH_3-	14.9
		CH_2	40.2
CH_2	2.17 - 2.64	$\text{CH}-$	43.0
			46.8
			47.9
$\text{CH}-$	3.06 - 3.54		51.1
C_6	4.13; 4.16; 4.19	CH-O	
$=\text{CH}_2$		C_8	74.6
C_{14}	4.95; 5.19	C_6	82.1
C_{13}	5.08; 5.82; 6.27; 6.28	$=\text{CH}_2$	
C arom	7.5 - 8.1	C_{14}	116.9
		C_{13}	125.0
		C arom	128.7; 129.2; 129.6; 133.7
		$\text{R}_2-\text{C}=\text{C}$	
		C_{10}	135.7
		C_{11}	142.2
		$=\text{C-O-CO-R}$	165.2; 169.1
		$-\text{CO}-$	C_3 216.3

Tab. 7.3 Segnali NMR della Grosseimina Benzoato



Esanoil Grosseimina

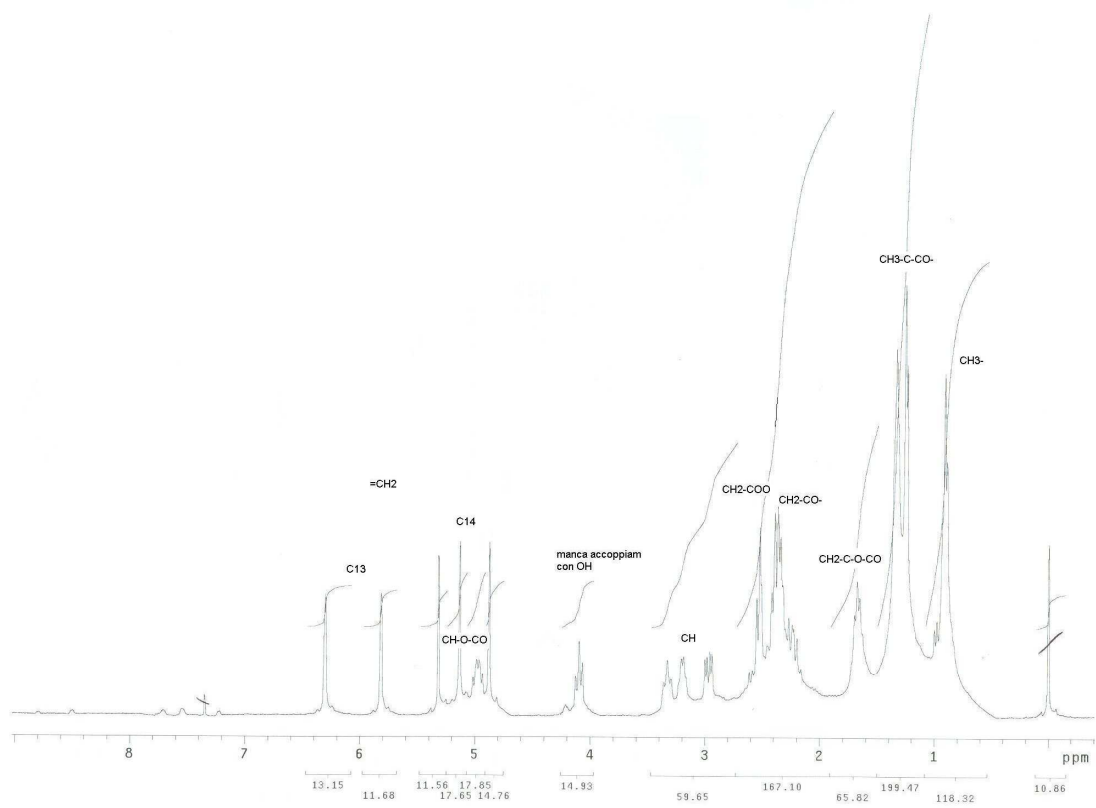
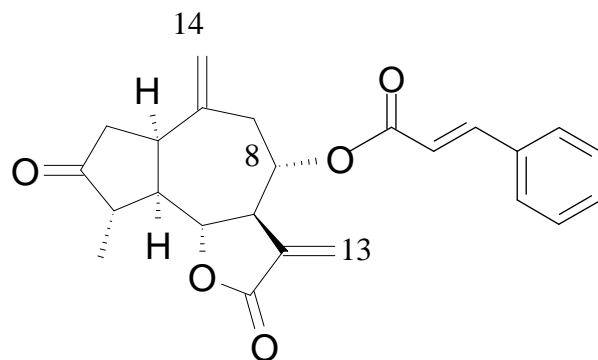


fig. 7.6 - $^1\text{H-NMR}$ Esanoil Grosseimina

Segnali ^1H in ppm	
CH_3-	0.90; 0.92; 0.98
$\text{CH}_3-\text{C}-\text{CO}$	1.26
CH_2	1.35-3.33
$\text{CH}_2-\text{C}-\text{OCO}$	1.66; 1.68; 1.70
CH_2-CO	2.20-2.46
CH_2-COO	2.51; 2.52; 2.55
$\text{CH}-\text{C}_6$	4.07; 4.10; 4.13
C_8	4.94-5.15
$=\text{CH}_2$	
C_{14}	4.88; 5.32
C_{13}	5.82; 6.03

Tab. 7.4 Segnali NMR della Esanoil Grosseimina



trans-Cinnamoil Grosseimina

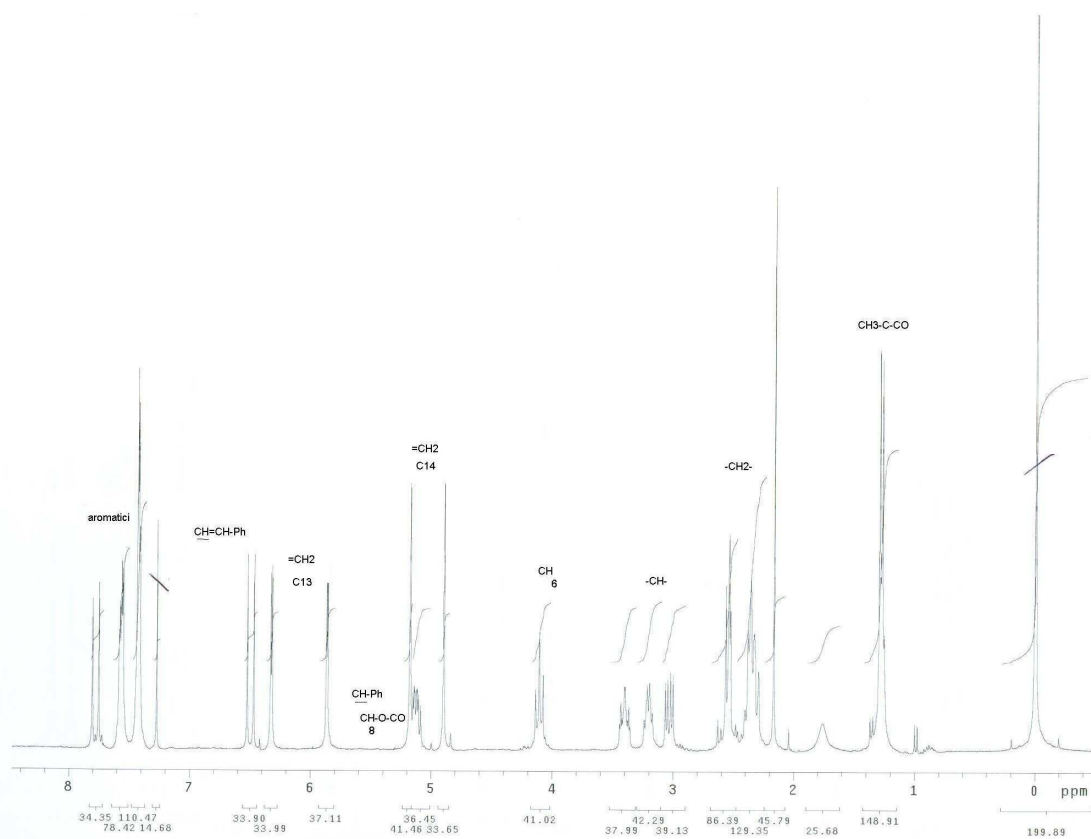


fig. 7.7 - $^1\text{H-NMR}$ della trans-Cinnamoil Grosseimina

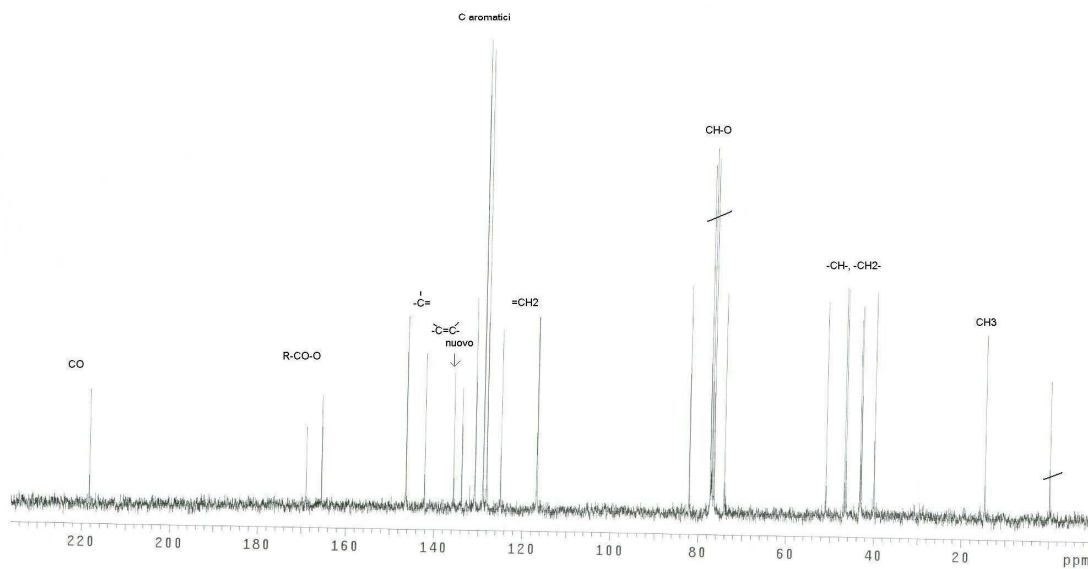
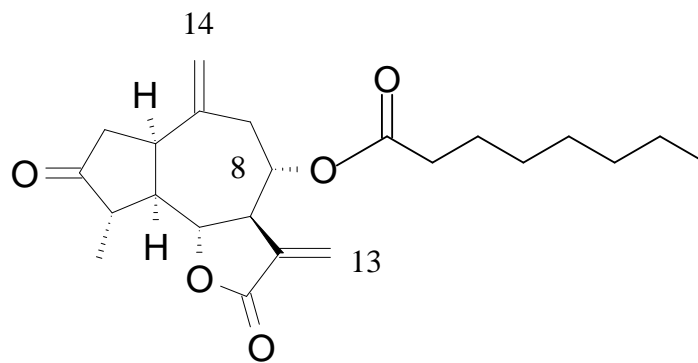


fig. 7.8 ^{13}C -NMR della trans-Cinnamoil Grosseimina

Segnali ^1H in ppm		Segnali ^{13}C in ppm	
$\text{CH}_3\text{-C-CO}$	1.27;1.29	$\text{CH}_3\text{-}$	14.8
CH_2	2.17 – 2.63	CH_2	40.11; 43.07
CH-	3.0-3.4	CH-	43.35
C_6	4.08; 4.11; 4.14		46.54
CH-Ph	5.09-5.15		46.88
CH=CH-Ph	6.47; 6.52		51.06
$=\text{CH}_2$		CH-O	
C_{14}	4.90; 5.18	C_8	74.14
C_{13}	5.86; 5.87; 6.32;6.33	C_6	82.20
C arom	7.42 – 7.81	$=\text{CH}_2$	
		C_{14}	116.80
		C_{13}	125.03
		C arom	128.21; 129.98; 130.84; 133.84;
		HC=CH	135.71
		$\text{R}_2\text{-C=}$	
		C_{10}	142.26
		C_{11}	146.46
		O-CO-R	165.63; 169.09
		-CO-	C_3 218.39

Tab. 7.5 Segnali NMR della trans-Cinnamoil Grosseimina



Ottanoil Grosseimina

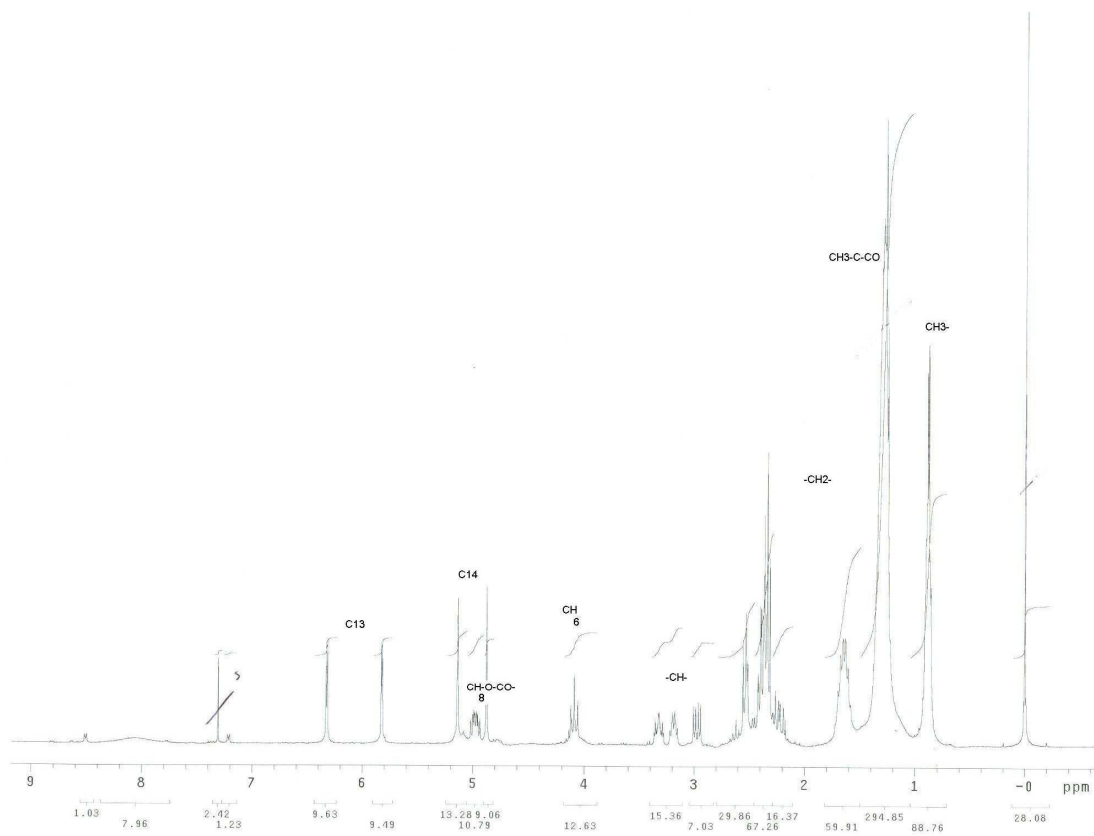


fig. 7.9 - ¹H-NMR della Ottanoil Grosseimina

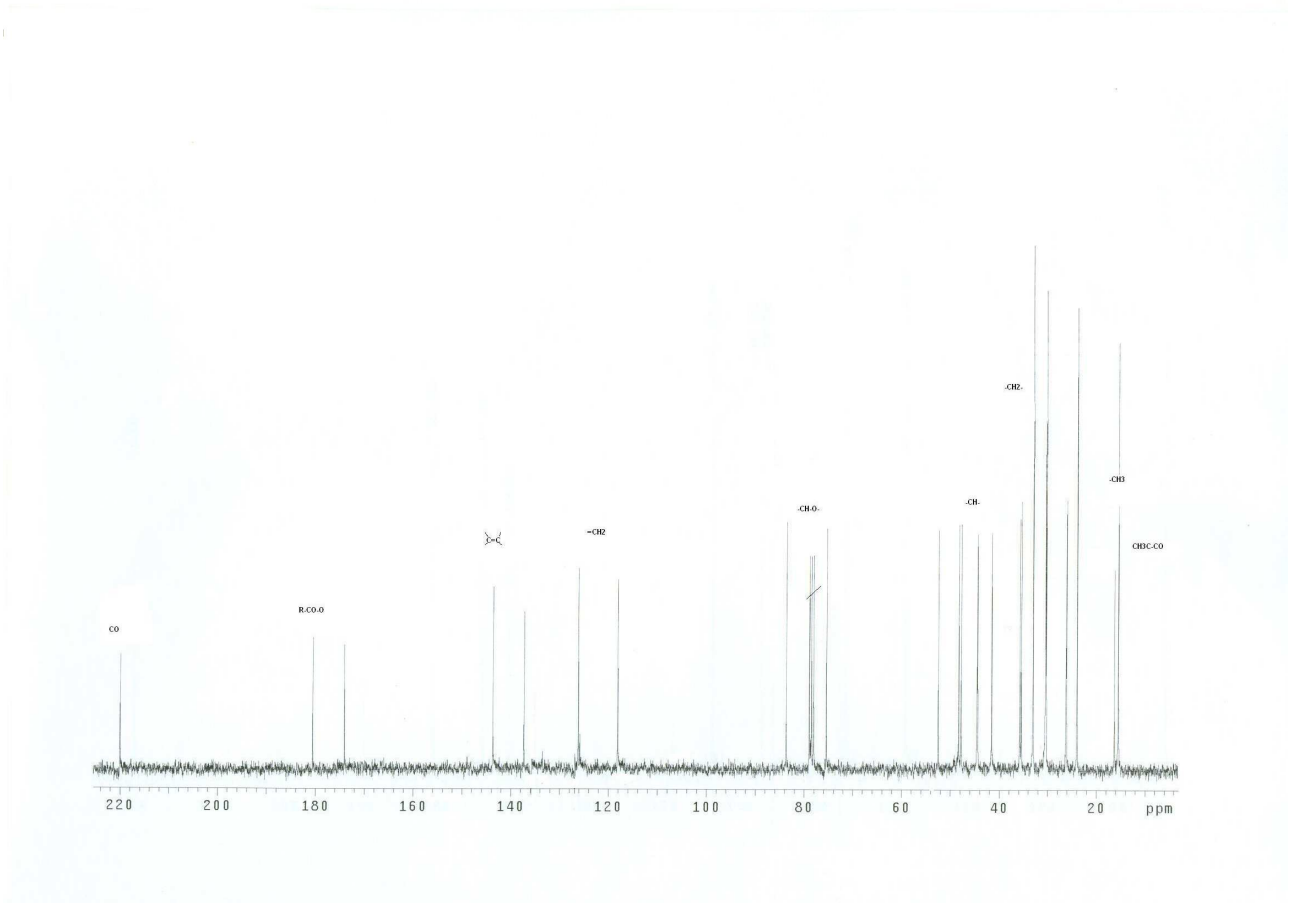
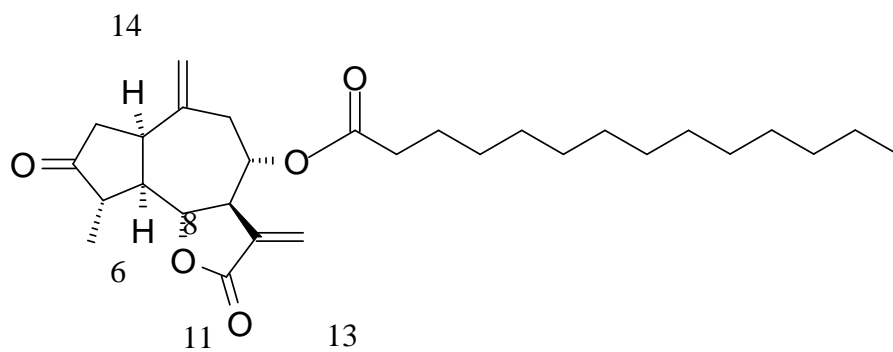


fig. 7.10 ^{13}C -NMR della Ottanoil Grosseimina

Segnali ^1H in ppm		Segnali ^{13}C in ppm	
CH_3-	0.86; 0.88; 0.89	CH_3-	15.45
$\text{CH}_3-\text{C}-\text{CO}$	1.27; 1.29	$\text{CH}_3-\text{C}-\text{CO}-$	16.26
CH_2	1.58 - 2.61	CH_2	23.98 – 35.47
		$\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$	35.78
$\text{CH}-$	2.94 - 3.35	$\text{CH}-$	41.57 – 52.47
C_6	4.06; 4.09; 4.12	$\text{CH}-\text{O}$	
$\text{CH}-\text{O}-\text{CO}-$	4.94 - 5.02	C_8	75.48
$=\text{CH}_2$		C_6	83.68
C_{14}	4.88; 5.14	$=\text{CH}_2$	
C_{13}	5.82; 5.83; 6.32; 6.33	C_{14}	118.12
		C_{13}	126.19
		$\text{R}_2-\text{C}=\text{C}$	
		C_{10}	137.31
		C_{11}	143.70
		$\text{O}-\text{CO}-\text{R}$	174.06; 180.60
		$-\text{CO}-$	
		C_3	220.04

Tab. 7.6 Segnali NMR della Ottanoil Grosseimina



Tetradecanoil Grosseimina

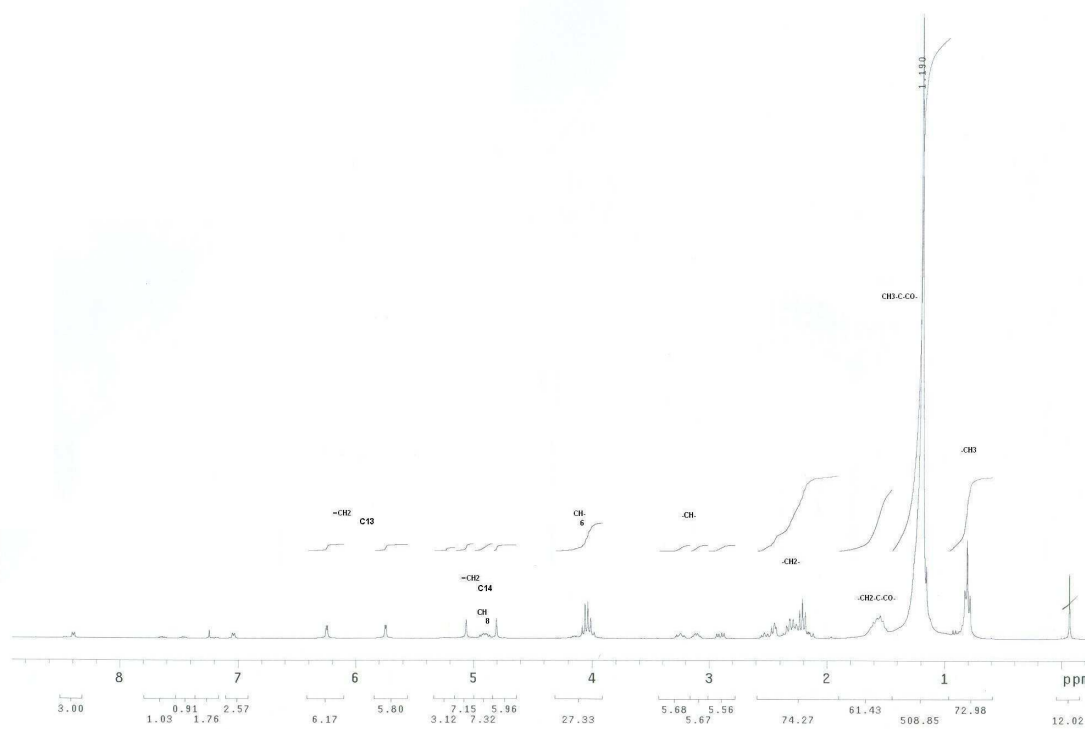


fig. 7.11 - $^1\text{H-NMR}$ della Tetradecanoil Grosseimina

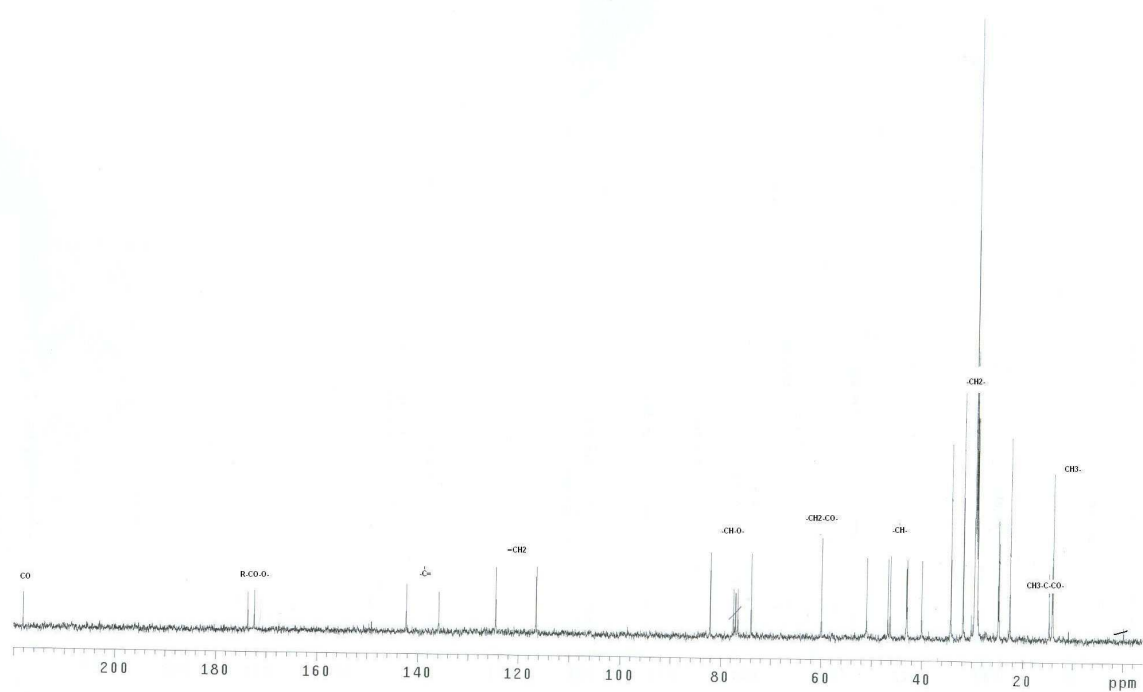
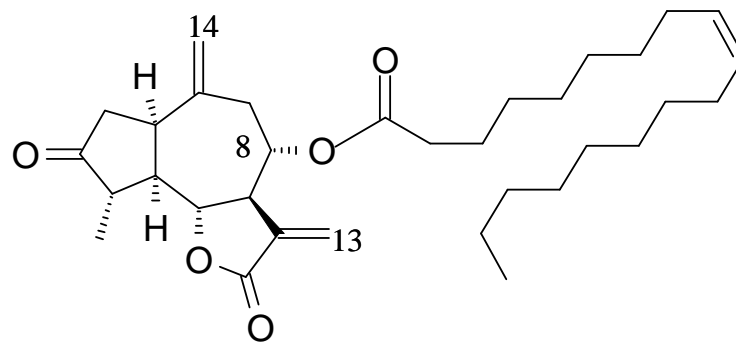


fig. 7.12 ^{13}C -NMR della Tetradecanoil Grosseimina

Segnali ^1H in ppm		Segnali ^{13}C in ppm	
CH ₃ -	0.79; 0.83; 0.85	CH ₃ -	13.98
CH ₃ -C-CO	1.15; 1.19	CH ₃ -C-CO-	14.74
		CH ₂	22.56 – 31.81
		CH ₂ -CO-O-	34.25
CH ₂	1.52 - 2.56	CH-	40.41 – 50.97
		CH-O	
CH-	2.87 - 3.29	C ₈	73.94
C ₆	3.98 - 4.08	C ₆	82.10
CH-O-CO-	4.86 - 5.01	=CH ₂	
=CH ₂		C ₁₄	116.51
C ₁₄	4.80; 5.23	C ₁₃	124.51
C ₁₃	5.74; 5.75; 6.24; 6.25	R ₂ -C=	C ₁₀ 135.86
			C ₁₁ 142.25
		O-CO-R	172.41; 173.67
		-CO-	C ₃ 218.14

Tab. 7.7 Segnali NMR della Ottanoil Grosseimina



Oleato della Grosseimina

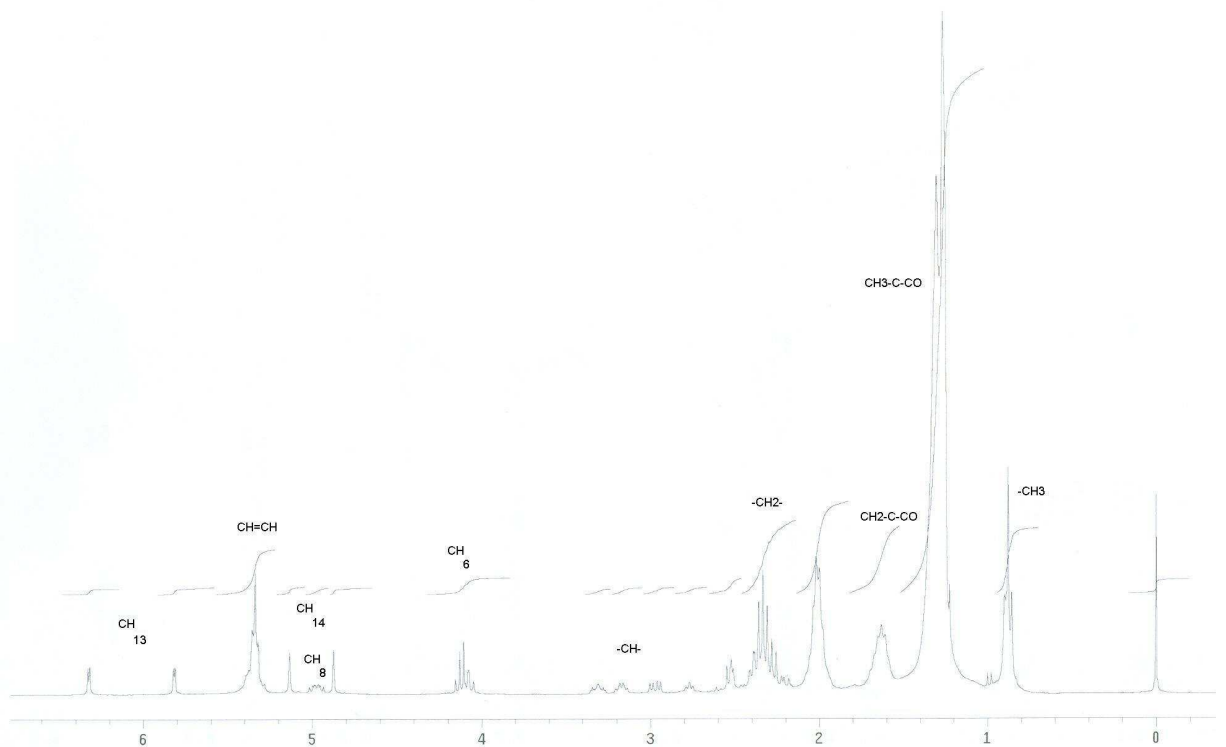


fig. 7.13 - $^1\text{H-NMR}$ dell' Oleato della Grosseimina

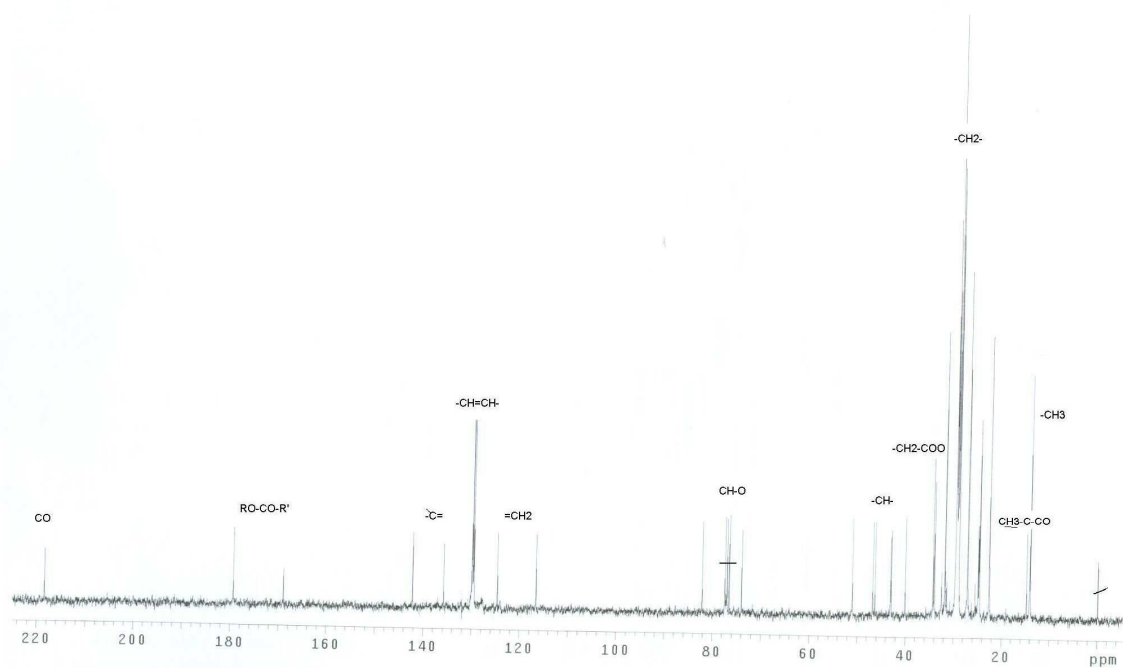


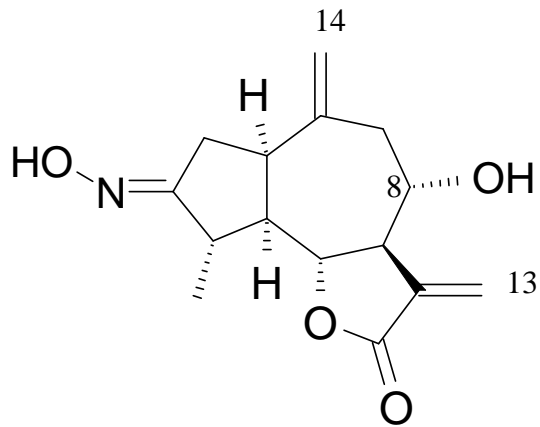
fig. 7.14 ^{13}C -NMR dell' Oleato della Grosseimina

Segnali ^1H in ppm		Segnali ^{13}C in ppm	
CH_3-	0.86; 0.88; 0.90	CH_3-	14.02
$\text{CH}_3-\text{C}-\text{CO}$	1.27; 1.31	$\text{CH}_3-\text{C}-\text{CO}-$	14.76
CH_2	1.61 - 2.55	CH_2	22.60 – 34.0
		$\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$	34.28
$\text{CH}-$	2.75 - 3.34	$\text{CH}-$	40.09 – 51.00
C_6	4.05 - 4.16	$\text{CH}-\text{O}$	
C_8 $\text{CH}-\text{O}-\text{CO}-$	4.93 - 5.02	C_8	74.00
$=\text{CH}_2$		C_6	82.17
C_{14}	4.88; 5.14	$=\text{CH}_2$	
C_{13}	5.81; 5.82; 6.32; 6.33	C_{14}	116.61
$\text{CH}=\text{CH}$	5.29 - 5.38	C_{13}	124.65
		$\text{R}_2-\text{C}=\text{C}$	
		C_{10}	135.83
		C_{11}	142.22
		$\text{CH}=\text{CH}$	129.61; 129.87
		$\text{O}-\text{CO}-\text{R}$	172.49; 179.34
		$-\text{CO}-$	
		C_3	218.42

Tab. 7.8 Segnali NMR dell' Oleato della Grosseimina

Segnali ^1H in ppm	
$\text{CH}_3\text{-C-CO}$	1.29;1.33
CH_2	1.51 - 2.65
CH-	2.83 - 3.24
C_6	3.85 - 4.06
$\text{C}_8 \text{ CH-O-CO-}$	4.23 -4.32
$=\text{CH}_2$	
C_{14}	4.85; 5.15
C_{13}	6.28; 6.29; 6.37; 6.38

Tab. 7.9 Segnali NMR del prodotto di ossidazione della Grosseimina



Ossima della Grosseimina

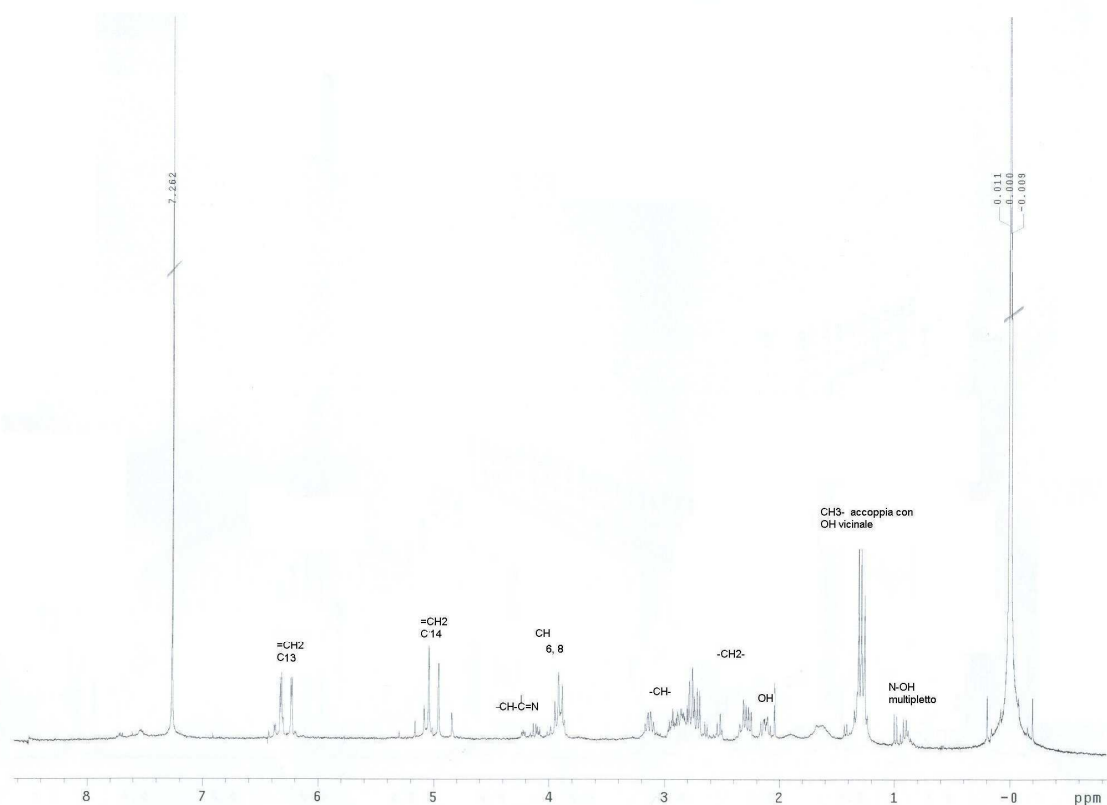


fig. 7.15 - $^1\text{H-NMR}$ dell' Ossima della Grosseimina

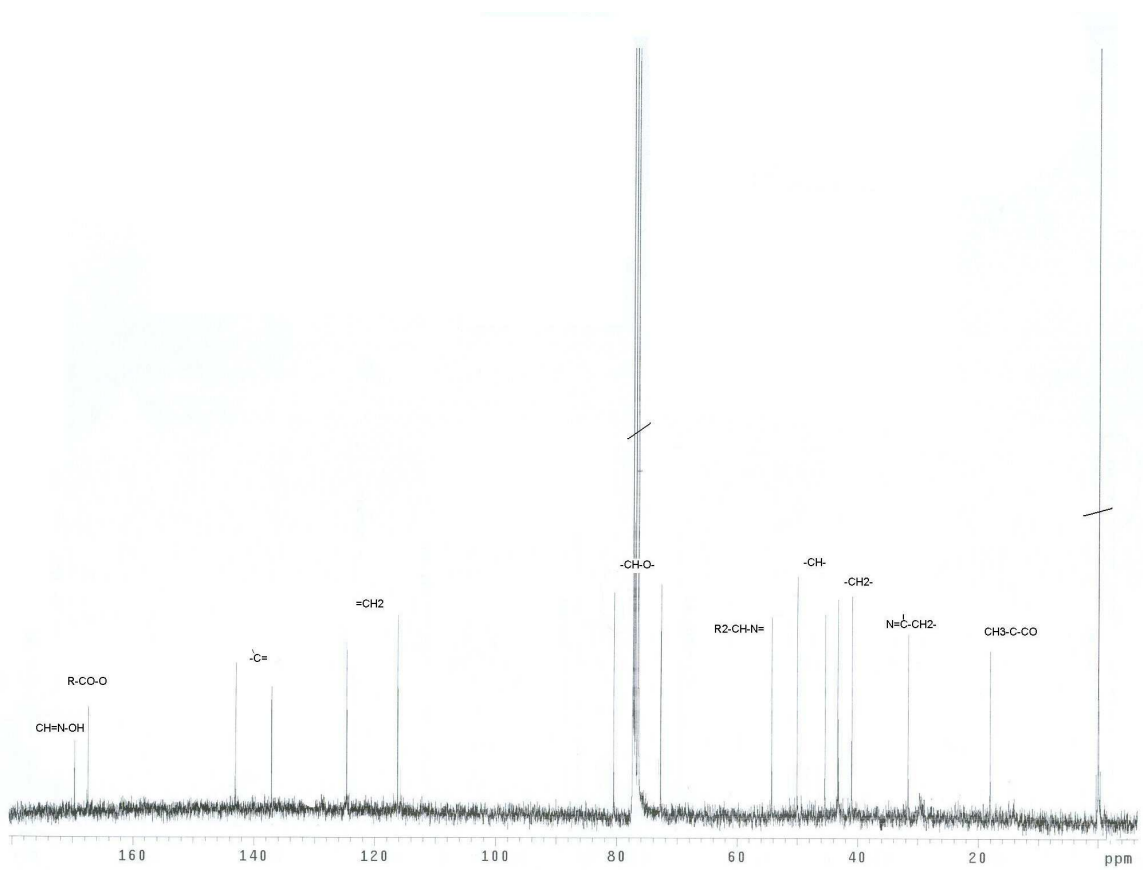
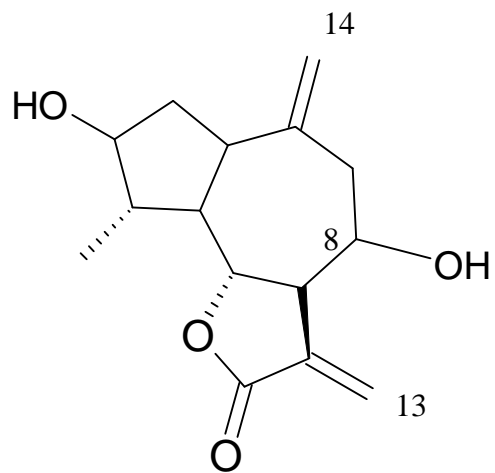


fig. 7.16 ^{13}C -NMR dell' Ossima della Grosseimina

Segnali ^1H in ppm		Segnali ^{13}C in ppm	
$\text{CH}_3\text{-C-C-N}$	1.28 – 1.35	$\text{CH}_3\text{-C-C-N}$	18.05
CH_2	1.65 – 2.80	CH_2	40.98
CH-	2.83 - 3.17	$\text{CH}_2\text{-C-N=}$	31.64
$\text{C}_{6,8}$	3.87 – 4.14	CH-C=N	54.28
CH-C-N	2.82 – 2.97	CH-O	43.29 – 50.03
$=\text{CH}_2$		C_8	72.78
C_{14}	4.96; 5.04	C_6	80.55
C_{13}	6.23; 6.24; 6.32; 6.33	$=\text{CH}_2$	C_{14} 116.20
N-OH	0.88 – 1.00		C_{13} 124.64
OH	2.08 – 2.17	$\text{R}_2\text{-C=}$	C_{10} 137.13
			C_{11} 142.99
		O-CO-R	167.44
		-C=NOH	169.69

Tab. 7.9 Segnali NMR dell' Ossima della Grosseimina



Prodotto di riduzione con NaBH₄ della Grosseimina

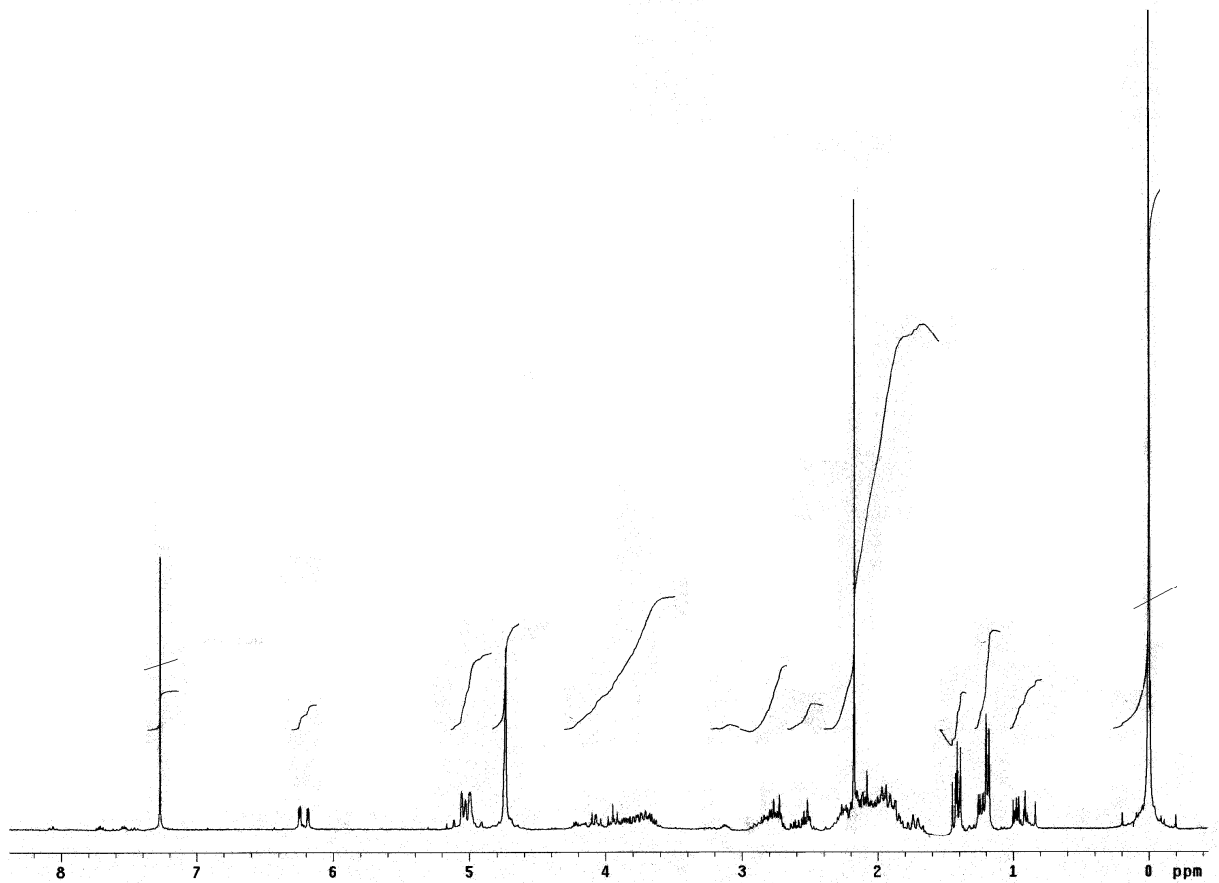
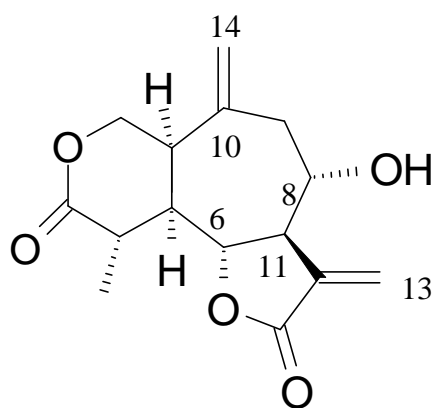


fig. 7.18 - ¹H-NMR del Prodotto di riduzione con NaBH₄ della Grosseimina: miscela .

Segnali ^1H in ppm	
$\text{CH}_3\text{-C-CO}$	1.18;1.21
CH_2	1.20 - 2.85
CH-	3.1 – 4.2
C_6	4.05 - 4.16
$\text{C}_8 \text{ CH-O-CO-}$	4.93 -5.02
$=\text{CH}_2$	
C_{14}	4.88; 5.14
C_{13}	6.18; 6.19; 5.28; 5.29
OH	4.75

Tab. 7.8 Segnali NMR del Prodotto di riduzione con NaBH_4 della Grosseimina



Dilatone della Grosseimina

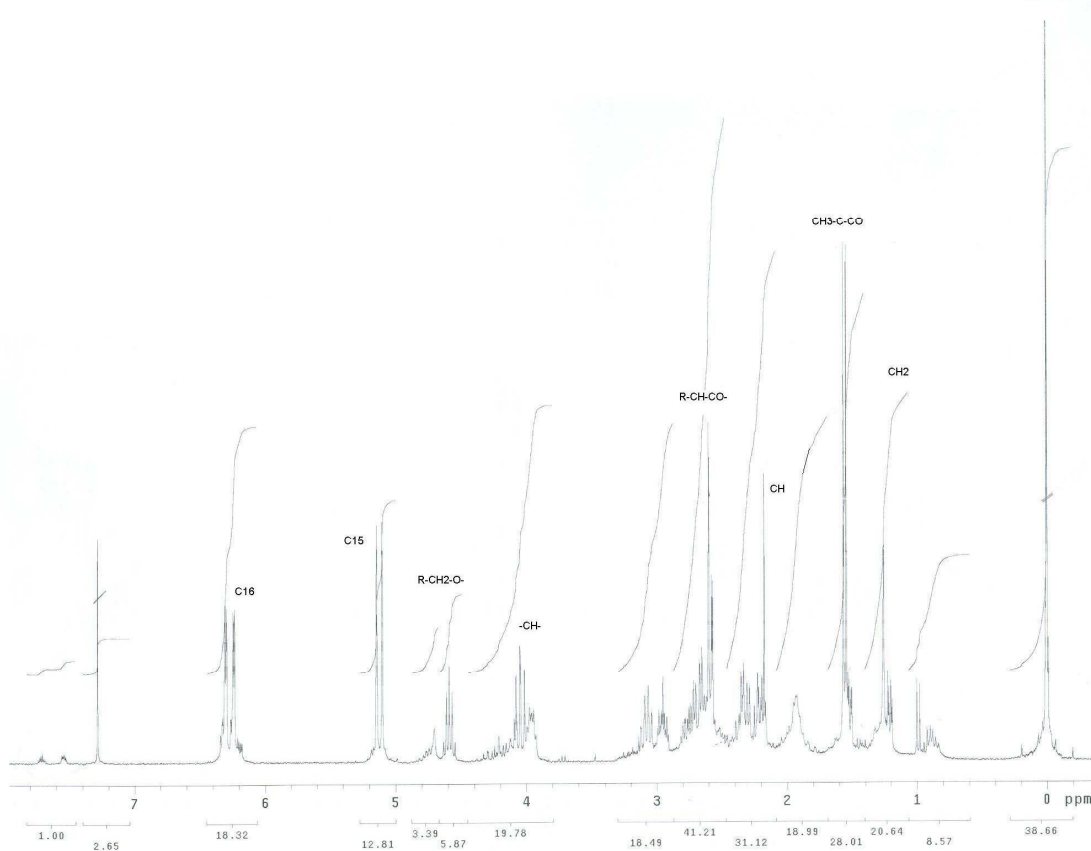


fig. 7.18 - $^1\text{H-NMR}$ del Dilatone della Grosseimina

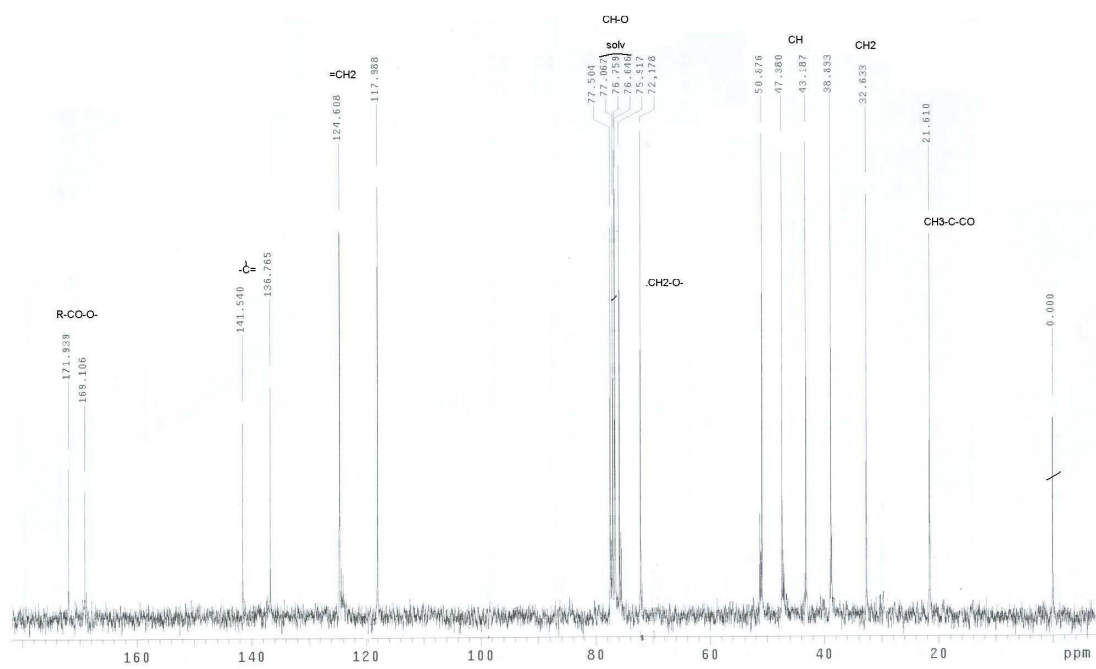
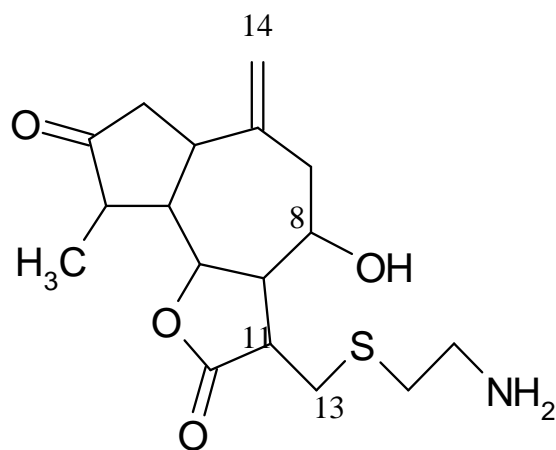


fig. 7.19 $^{13}\text{C-NMR}$ del Dilatone della Grosseimina

Segnali ^1H in ppm		Segnali ^{13}C in ppm	
$\text{CH}_3\text{-C-CO-O}$	1.55; 1.57	$\text{CH}_3\text{-C-CO-O}$	21.61
CH_2	0.88-1.33	CH_2	32.63
		$\text{CH}_2\text{-O-}$	72.18
		CH-	38.83 – 51.07
CH-	2.17 - 3.12	CH-O	
C_6	3.93 - 4.24	C_8	75.92
$\text{C}_2 \text{ CH}_2\text{-O-CO-}$	4.55 -4.71	C_6	77.50
$=\text{CH}_2$		$=\text{CH}_2$	
C_{15}	5.10; 5.14	C_{15}	117.99
C_{16}	6.24; 6.25; 6.30; 6.31	C_{16}	124.61
		$\text{R}_2\text{-C=}$	C_{10} 136.76
			C_{13} 141.54
		O-CO-R	169.11; 171.94

Tab. 7.11 Segnali NMR del Dilattone della Grosseimina



Derivato cisteamminico della Grosseimina

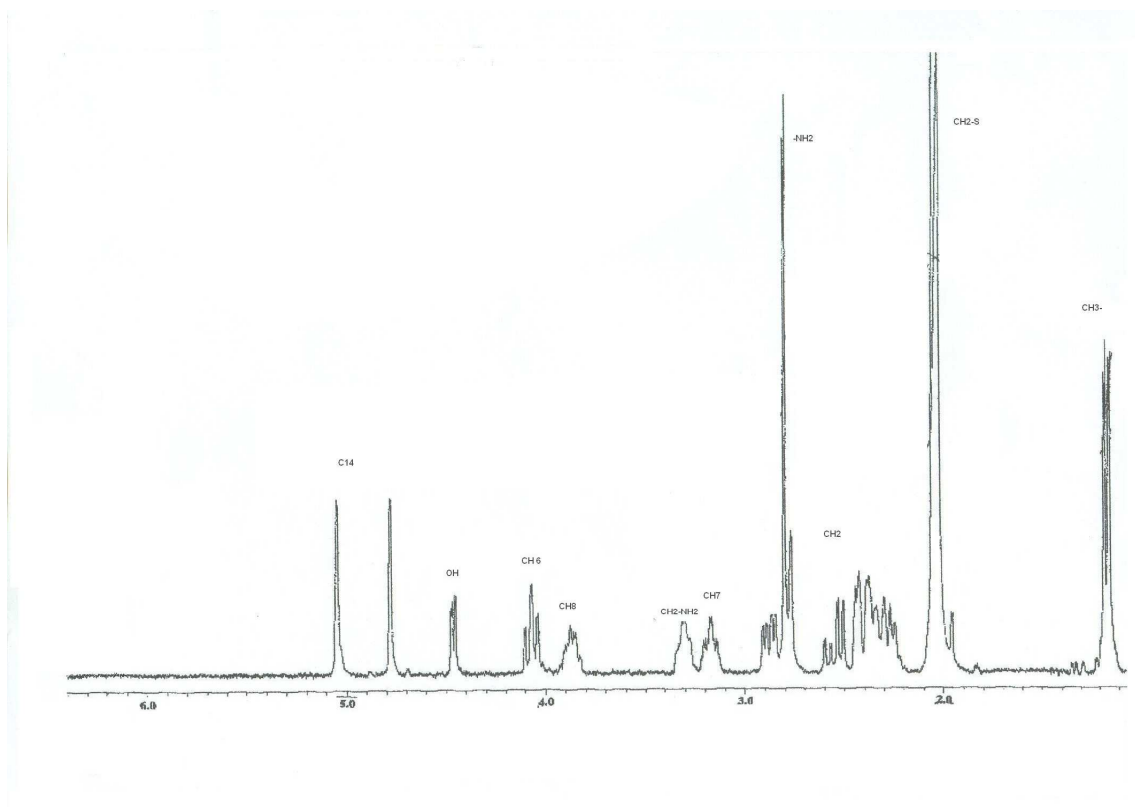
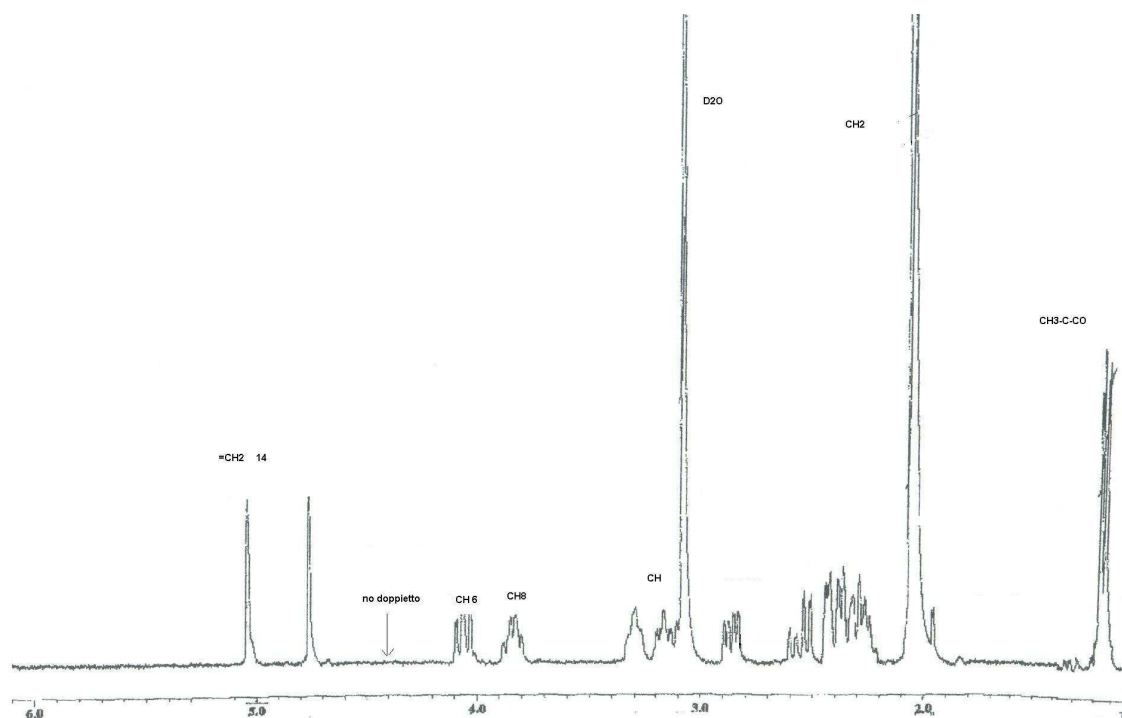


fig. 7.23 - $^1\text{H-NMR}$ del Derivato cisteamminico della Grosseimina



$^1\text{H-NMR}$ del Derivato cisteaminico della Grosseimina con aggiunta di una goccia di D_2O

Segnali ^1H in ppm	
$\text{CH}_3\text{-C-CO}$	1.15 – 1.17
CH_2	2.03 - 2.86
CH-	3.15– 2.86
C_6	4.04 - 4.10
$\text{C}_8 \text{ CH-O-CO-}$	3.86 –3.88
$=\text{CH}_2$	
C_{14}	4.78; 5.105
OH	4.45 – 4.47 scambia con D_2O
NH_2	2.79;2.80 scambia con D_2O

Tab. 7.14 Segnali NMR del Derivato cisteaminico della Grosseimina

8 – BIBLIOGRAFIA

- Tancredi T., Lelj F., Temussi P.A. (1979) *Chem. Sens. Flav.* **4**, 259-265
- Markham, K.R. (1982) *Techniques of Flavonoid Identification*, Academic Press, Chemistry Division, Department of Scientific and Industrial Research, Petone, New Zeland.
- McLaughlin S.K., McKinnon P.J., Marggolskee R.F. (1992) *Nature* **357**, 563-569
- Sato T., Okada Y., Miyamoto T. (1994) *Physiol. Behav.* **56**(6), 1133-1139
- Harborne, J.B (1998) *Phytochemical Methods, a guide to modern techniques of plant analysis*, 3th edn., Chapman & Hall, St Edmundsbury Press, Bury St Edmunds, Suffolk;
- Matsunami H., Montmayeur J.P., Buck L.B. (2000) *Nature* **404**, 601-604
- Firestein S. (2000) *Nature* **404**, 552-553
- Wegewner T. (2000) *HerbalGram* **50**, 47-54
- Feraz H.M.C., Grazini M.V.A., Ribeiro C.M.R. (2000) *J.Org.Chem.* **65**, 2606-2607
- Lindermann B. (2001) *Nature* **413**, 219-225
- Ferraz H.M.C., Longo jr. L.S., Grazini M.V.A. (2002) *Synthesis* **15**, 2155-2163
- Meyerhof W., Bufe B., Hogmann T., Krautwurst D., Raguse J. (2002) *Nat. Genet.* **32**(3), 397-401
- Hofmann T., Ho C.T., Pickenhagen W. (2003) *ACS Symposium S. No. 867* Cap.3: Identification of human bitter taste receptors, 45-49
- Curini M., Epifano F., Marcotullio M.C., Montanari F. (2004) *Synlett* **2**, 368-370
- Guarrera P.M. (2005) *Fitoterapia* **76**(1), 1-25

- Rogers S., Busch J., Peter H., Christ-Hazelhof E. (2005) *Chem. Sense.* **30**, 547-557
- Zhang S., Won Y.K., Ong C.N., Shen H.M. (2005) *Curr. Med. Chem. Antic. Ag.* **5**(3), 239-249
- Meyerhof W., Behrens M., Brockhoff A., Bufe B., Kuhn C. (2005) *Chem. Senses* **30**(suppl 1), i14-i15
- Meyerhof W. (2005) *Rev. Physiol. Bioch. P.*, **154**, 37-72
- Go Y., Satta Y., Takenaka O., Takehata N. (2005) *Genetics* **170**, 313-326

9-Conclusioni

L'argomento di questa tesi si pone all'interfaccia di molti campi di ricerca, in particolare di quello biochimico e quello nutrizionale. Utilizzando metodologie sperimentali della chimica organica e della biologia molecolare si è cercato di dare un contributo alla ricerca dei recettori gustativi, focalizzandosi su composti di rilevanza non solo nutrizionale, ma anche farmaceutica.

Le piante prese in esame, a livello di isolamento o di sintesi dei loro principi amari, hanno infatti valenza multipla: medicinale (carciofo e tanaceto), aromatico (carciofo e assenzio) ed erboristico (assenzio marino).

L'eterogenicità delle fonti è ricomposta dal fatto che tutti i principi amari studiati hanno una medesima origine essendo isoprenoidi. Utilizzando anche una biblioteca di isoprenoidi disponibile da studi precedenti nel laboratorio dove in parte ho svolto la tesi, ed il know how acquisito in un decennio di ricerche scientifiche nel campo dal professor Meyerhof, che si è occupato della parte riguardante i saggi biologici, si è arrivati all'identificazione di un recettore generale per le classi più importanti di isoprenoidi amari, quella dei lattoni sesquiterpenici. Questo recettore (hTAS2R46) era stato in precedenza descritto come un recettore tipico per l'alcaloide *stricnina*. Sono inoltre stati intrapresi studi di relazione struttura-attività mirati a meglio definire la specificità molecolare dell'interazione dei lattoni sesquiterpenici con questo recettore gustativo.

Partendo dalle conoscenze maturate dalle analisi sui composti descritti in questo lavoro, le prospettive future prevedono di completare lo studio delle relazioni struttura-attività della Grosseimina, approfondendo in particolare la relazione fra composti che presentano il gruppo lattonico ed il loro corrispondenti furani. I furanoterpeni sono infatti una classe importante di

agenti amari, ma i tentativi di identificare il recettore dell'amaro coinvolto nel loro riconoscimento sono stati finora frustrati dalla tossicità delle sonde impiegate per i saggi.

Dato il tempo relativamente tardo (in relazione alla scala temporale del Dottorato) in cui sono stati preparati gli analoghi della Grosseimina, non siamo ancora in grado di avere la serie completa dei dati su questi composti, ma i risultati ottenuti in precedenza sui derivati di isoprenoidi con struttura molto simile ai nostri sono incoraggianti, e fanno presupporre un risultato positivo anche da parte dei derivati della Grosseimina. A motivo delle modifiche puntiformi apportate al lead, la traduzione in relazioni struttura-attività dovrebbe essere relativamente diretta.

Dal punto di vista biologico la decodifica del codice neuronale delle informazioni gustatorie dovrebbe essere al primo posto dell'agenda. Si presume che la deorfanziazione dei recettori TAS2R porti entro tempi brevi all'identificazione di composti antagonisti, con un'applicazione importante nel campo della formulazione farmaceutica, dove il sapore amaro di molti principi attivi rappresenta un grosso problema formulativi per le preparazioni orali. A lungo termine, questi risultati sarebbe anche utili per aprire la strada allo sviluppo di una vera e propria "lingua artificiale", un utile mezzo per la quantificazione dei sapori durante la produzione di alimenti e il loro controllo qualità.

Un altro ulteriore aspetto importante è la delucidazione dei polimorfismi dei recettori dell'amaro, della loro diffusione in popolazioni specifiche, e della loro eventuale correlazione con patologie cronico degenerative (diabete) ed obesità.

10-Ringraziamenti

Si ringrazia, oltre al mio tutor prof. Gianfranco Seu, il prof. Giovanni Appendino del DISCAFF di Novara, cui mi sono appoggiata per la tesi e che mi ha ospitato presso il suo laboratorio per diversi periodi durante il mio lavoro di dottorato; il suo gruppo di ricerca e in particolar modo il Dott. Alberto Massarotti con cui ho potuto avviare il lavoro in parallelo tra i derivati del carciofo e i derivati di *Artemisia arborescens*, *Artemisia absinthium* e *Tanacetum vulgare L.*, e con cui ho lavorato nei miei periodi di studio in quel di Novara.

Si ringrazia inoltre il prof. W. Meyerhof del German Institute of Human Nutrition di Potsdam e il suo gruppo di ricerca, che si sono occupati dell'analisi recettoriale dei derivati prodotti in questo lavoro.

Un grazie in particolare alla dott.ssa Nicoletta Zinnarosu che mi ha aiutato nella registrazione degli spettri NMR.

Ringrazio inoltre tutti coloro che mi sono stati vicini e che mi hanno sostenuto con affetto in questi tre anni di lavoro.