

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO

FACOLTA' DI SCIENZE M.F.N.

TESI SPERIMENTALE PER LA LAUREA TRIENNALE IN SCIENZE E
TECNOLOGIE CHIMICHE PER L'INDUSTRIA E PER L'AMBIENTE

**ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE
DI METABOLITI DAL FUNGO
LEUCOPAXILLUS AMARUS**

RELATORE

DOTT. MARCO CLERICUZIO

CANDIDATO

FRANCESCO VERARDI

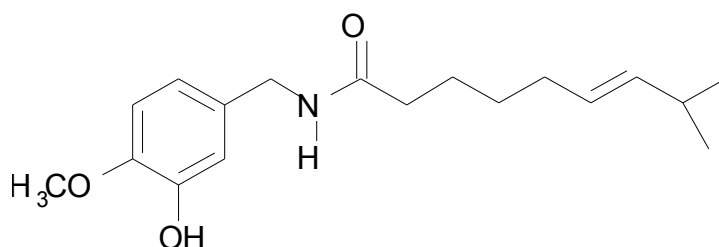
ANNO ACCADEMICO 2001 - 2002

INTRODUZIONE

Il mondo vegetale, i funghi, i batteri, gli organismi marini, etc., sono un vero scrigno di metaboliti secondari la cui struttura è sovente ancora ignota. Molte di queste molecole sono di potenziale utilità per l'uomo: basti pensare a quante di esse sono utilizzate (sia tal quali, sia come punti di partenza per trasformazioni semi-sintetiche) come farmaci, o come additivi alimentari, o ancora come profumi, o in altri settori industriali. Queste molecole hanno la caratteristica di essere state selezionate da lunghi processi evolutivi, e nell'organismo che li produce, svolgono spesso una fondamentale funzione di difesa contro predatori o parassiti.

E' evidente che l'isolamento e la conoscenza della struttura molecolare di questi metaboliti siano prioritari rispetto alle loro successive applicazioni. Nel nostro laboratorio vengono isolati e studiati metaboliti provenienti da piante e soprattutto da funghi della classe Basidiomiceti.

Una linea di ricerca in cui si inserisce la presente tesi è quella del rapporto struttura-attività in molecole dotate di sapori particolari, cosa assai diffusa nei corpi fruttiferi (carpofori) di funghi superiori. Per esempio, il sapore fortemente piccante di alcune specie della famiglia Russulaceae (generi *Russula* e *Lactarius*) è stato correlato alla presenza di composti a struttura dialdeidica (isovellerale, piperidiale, etc.) che, come la capsaicina, hanno la capacità di interagire con un particolare recettore del nostro corpo, e cioè il recettore vanilloide (fig.1).



Capsaicina

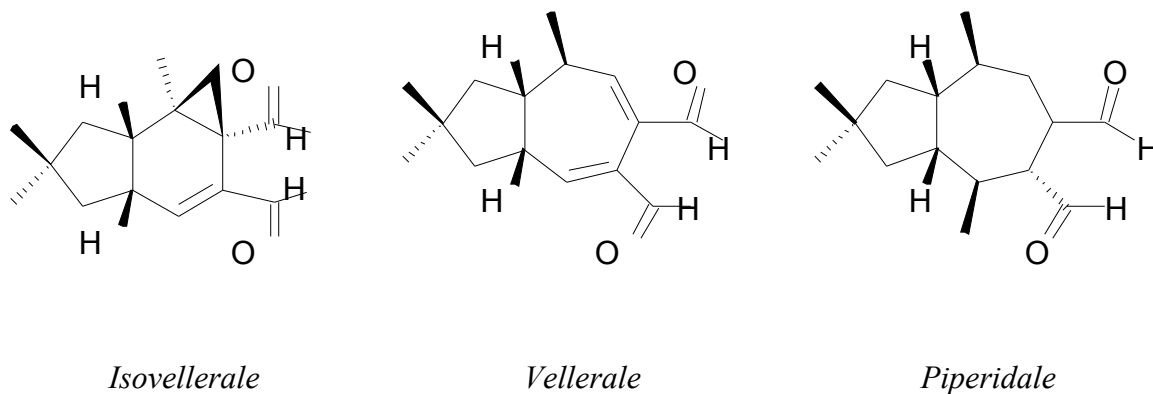


Fig. 1

Molto interessante è il rapporto struttura-attività per quel che concerne il sapore amaro. Molecole strutturalmente assai diverse tra loro (fig. 2), comunicano al nostro organismo la stessa sensazione di gusto. Alcuni di questi composti amari sono la lattarorufina A e l'infractopicrina (da Basidiomiceti), nonché la caffeina e i glicosidi genzianolidici dal mondo vegetale.

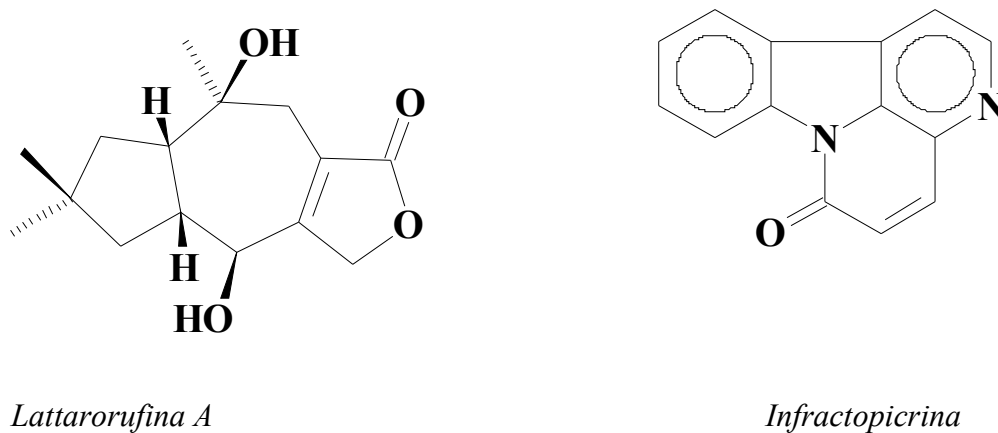


Fig. 2

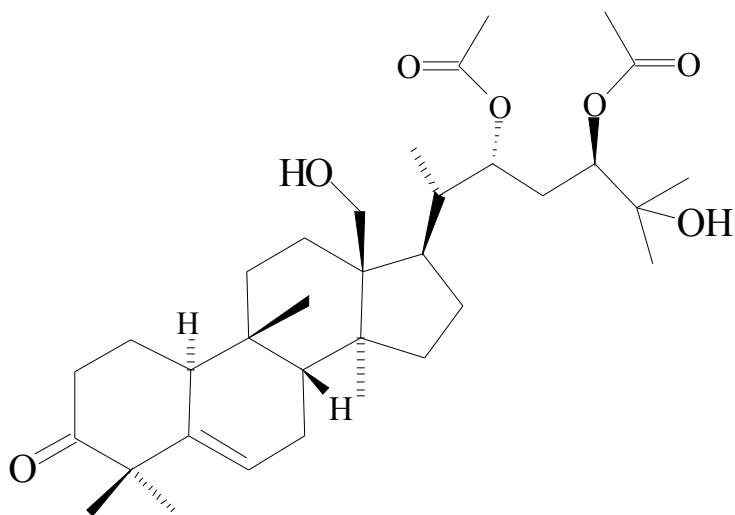
Questa diversità strutturale fa supporre o la presenza di più recettori adibiti a comunicare il senso dell'amaro, o di un singolo recettore multisito.

Recentemente ci siamo interessati al fungo *Leucopaxillus gentianeus* (= *L. amarus*), dalla carne fortemente amara, che cresce abbondante nei boschi della regione mediterranea (fig. 3). Il lavoro finora svolto ha permesso di isolare le molecole **1** e **2** (fig. 4a,b): si tratta di triterpeni a scheletro cucurbitaceo, entrambi nuovi per la scienza. Nessuna delle due

molecole, però, è dotata di gusto amaro: i composti responsabili del sapore del fungo sono ancora da scoprire.

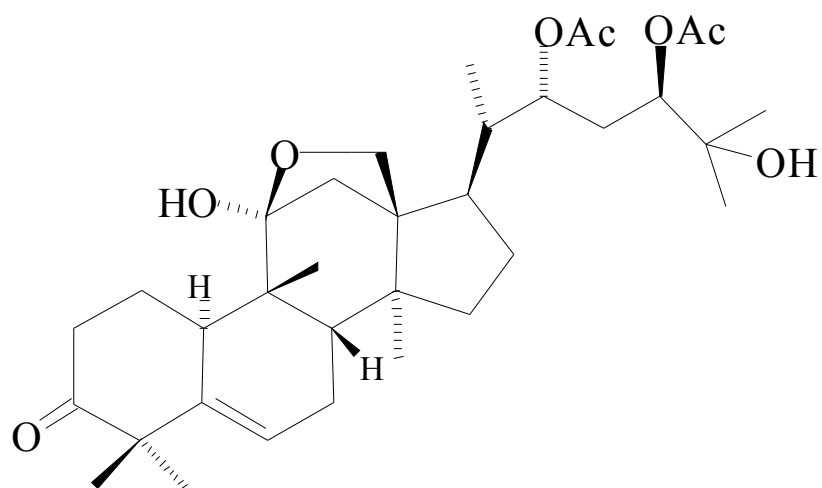


Fig. 3



Composto 1

Fig. 4a



Composto 2

Fig. 4b

Una terza molecola è stata isolata in quantità molto ridotta, ed il suo spettro ^1H NMR ha mostrato che si tratta sempre di un triterpenoide, ma a struttura assai differente da **1** e **2**: a questo metabolita è stato dato il "running name" di G2. L'isolamento di una quantità assai maggiore di G2, e la sua completa caratterizzazione strutturale, sono l'argomento di questo lavoro di tesi.

Prima di passare alla parte sperimentale, abbiamo ritenuto utile riportare una breve introduzione sulla biosintesi dei triterpeni, e sulla loro presenza nei funghi superiori.

I metaboliti di tipo terpenico

I terpeni sono molecole composte da unità C-5 dette isopreniche. Il precursore biologico dei terpeni è l'acido mevalonico, la cui formazione è la seguente: l'acetilCoA si lega al gruppo solfidrilico presente nel sito attivo dell'enzima e condensa con acetoacetilCoA per formare, dopo idrolisi, 3-idrossi-3-metilglutaril CoA che dopo riduzione con NADPH forma l'acido 3-mevalonico, l'unico enantiomero utilizzato dagli organismi viventi. Dopo reazioni di fosforilazione, decarbossilazione ed eliminazione di fosfato si ottiene isopentenil pirofosfato, l'unità isoprenica attiva nella fase di polimerizzazione, che in seguito è isomerizzato a β,β -dimetilallil pirofosfato, l'unità di partenza per la biosintesi di terpeni (fig. 5).

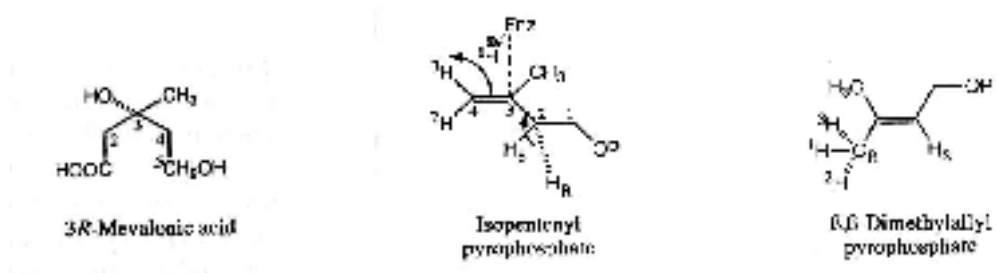


Fig. 5

I triterpeni

I triterpeni sono molecole C-30 che derivano dalla condensazione di sei unità C-5 secondo uno specifico percorso: due unità C-5 si uniscono per formarne una C-10, geranyl pirofosfato, che unendosi ad un'ulteriore unità C-5 ne forma una C-15, il farnesil pirofosfato. A questo punto due molecole di farnesil pirofosfato condensano testa-coda per dare un'unità C-30, lo squalene, che è il precursore dei triterpeni (fig. 6). Questa molecola fu isolata in una specie di squalo, *Squalus sp.* .

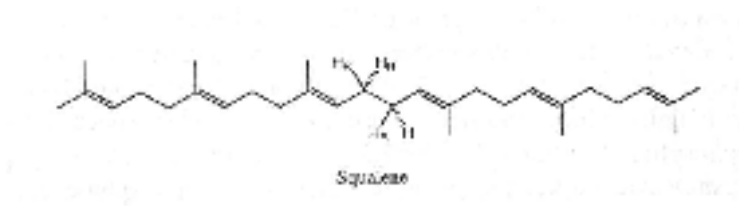


Fig. 6

E' da notare come nello squalene i doppi legami siano tutti in configurazione *trans*. Dall'opportuno piegamento della struttura squalenica è possibile ottenere lo scheletro base dei triterpeni con i gruppi metilici angolari e le catene laterali in posizione corretta. La maggior parte dei triterpeni è costituita da tre anelli a sei atomi ed uno a cinque atomi, disposti come in fig. 7 ;

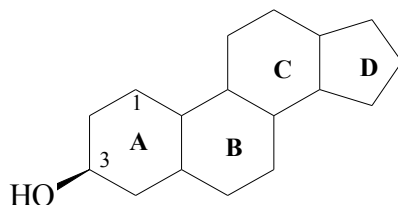


Fig. 7

Il meccanismo che porta a questa ciclizzazione è l'apertura di un epossido via catalisi acida: la formazione di un epossido dello squalene è la reazione chiave nella formazione di tutti i triterpenoidi. Questa reazione è mediata da un'epossidasi che richiede NADPH, FAD e ossigeno molecolare; lo squalene, in particolare, è epossidato a uno dei doppi legami terminali.

La struttura iniziale dell'eossido di squalene, la sua apertura enzimatica, il meccanismo e la stereochimica di ciclizzazione sono tali da imporre una serie di constraints strutturali nella struttura triterpenica. P. es., la posizione 3 è sempre ossigenata, e l'ossidrilie iniziale è sempre in configurazione β . Esistono comunque molti triterpenoidi a struttura "irregolare", ma si tratta sempre di modificazioni successive all'interno della struttura triterpenica iniziale.

La conformazione dell'ossido di squalene sulla superficie dell'enzima e l'ampiezza del riarrangiamento dello scheletro che segue la ciclizzazione, danno luogo ad un certo numero di tipi di triterpeni. Il **lanosterolo**, sostanza molto diffusa, deriva dal 2,3-ossido di squalene in conformazione sedia-barca-sedia-barca attraverso un ipotetico carbocatione protosterolico e uno shift di Wagner-Meerwein a quattro stadi con eliminazione di C⁹-H. Dal lanosterolo derivano i triterpeni **lanostanici**. Un riarrangiamento più profondo del carbocatione protosterolico porta ai **cucurbitani**, i principi tossici delle Cucurbitacee (fig. 8); si tratta un gruppo di triterpeni tetraciclici altamente ossigenati (1).

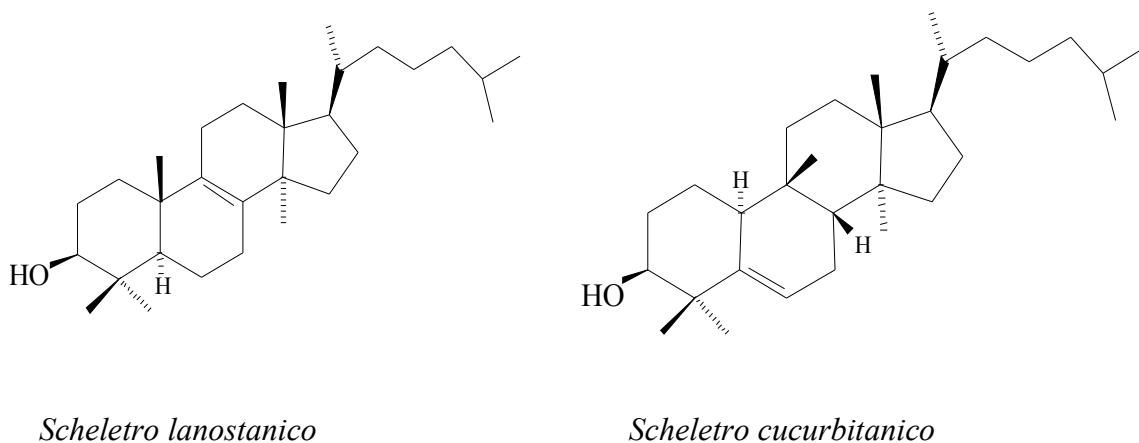


Fig. 8

E' da notare come nelle strutture lanostaniche, tutte le fusioni tra gli anelli siano *trans*, mentre in quelle cucurbitaniche la fusione tra l'anello B e C sia *cis*: ciò conferisce ai triterpeni cucurbitanici una forma assai più compatta, più ripiegata (convessa) che non quelli lanostanici.

Nei funghi superiori (Basidiomiceti) si sono trovati metaboliti triterpenici appartenenti ad entrambe le classi, con una dominanza di quelli a scheletro lanostanico.

Triterpeni lanostanici da funghi:

- Gli acidi hebelomici B dall' *Hebeloma senescens* (2) (fig. 9):

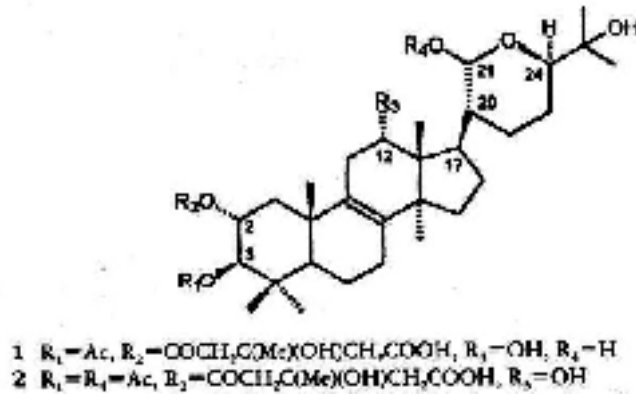


Fig. 9

- I fasciculoli dal *Naematoloma sublateritium* (3) (fig. 10):

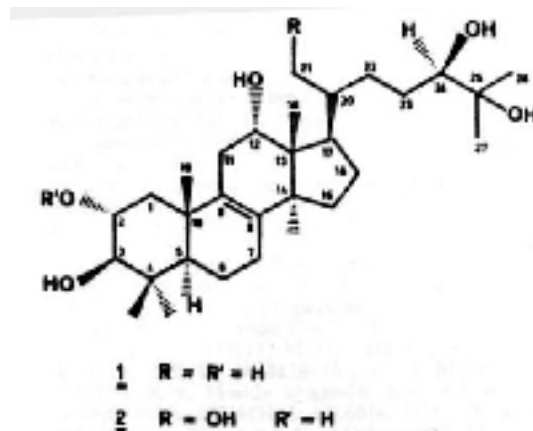


Fig.10

Triterpeni a scheletro cucurbitaceo:

- Gli hebevinosidi dall' *Hebeloma vinosophilum* (4) (fig. 11):

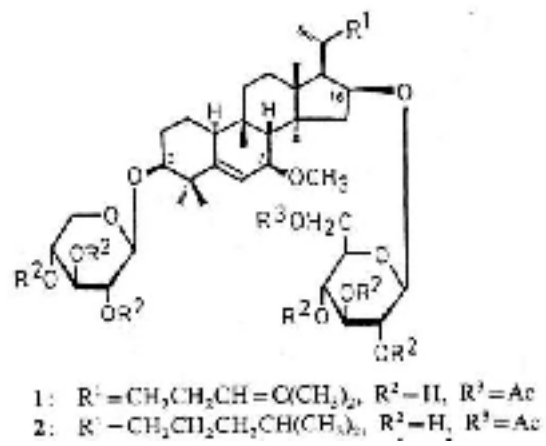


Fig. 11

Questi interessanti composti glicosidici sono risultati essere i principi tossici del fungo.

PARTE SPERIMENTALE

La procedura sperimentale seguita in questa tesi, è schematizzata nella figura 12:

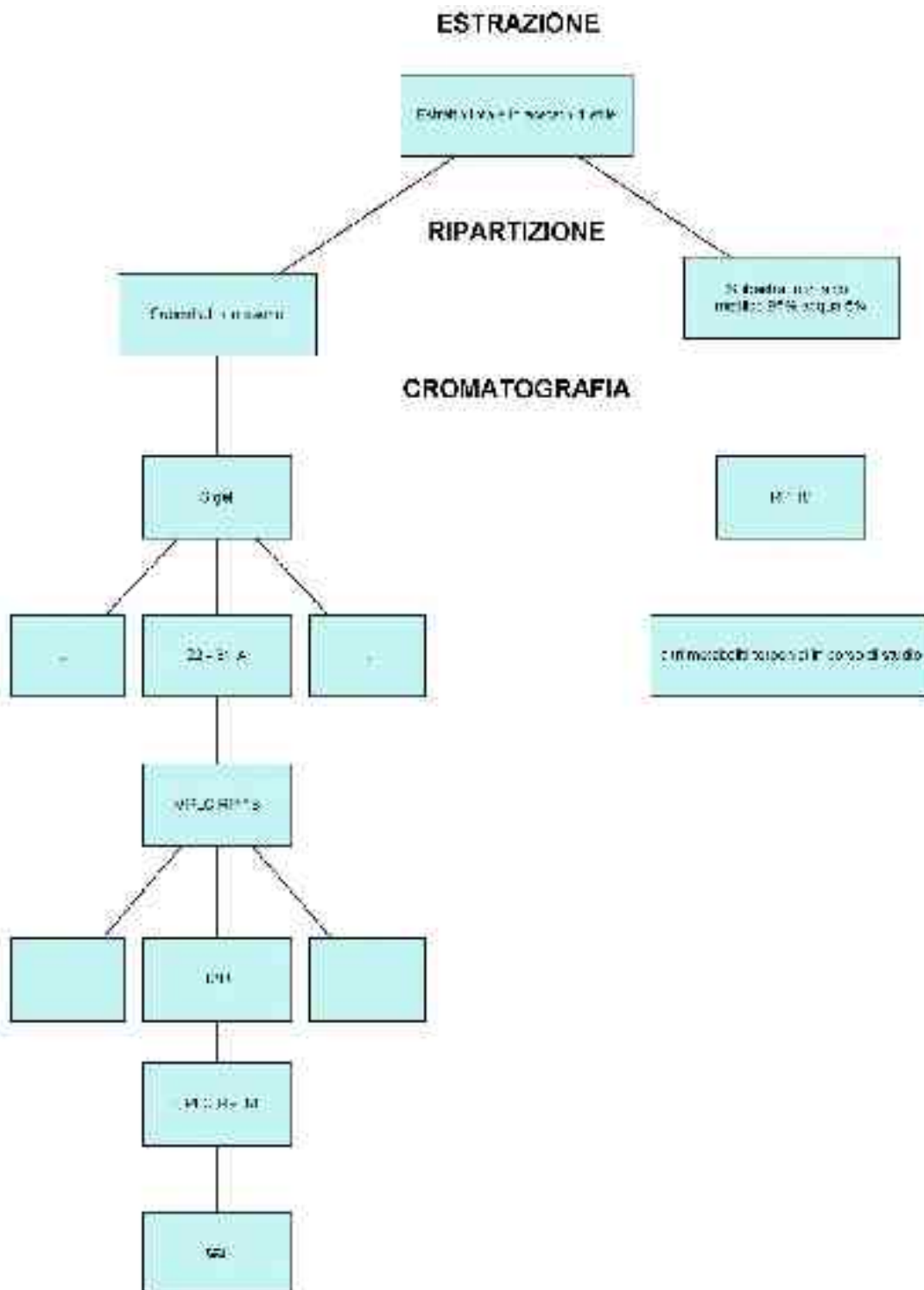


Fig. 12

L'estrazione

I carpofori di *L. amarus* (circa 5 kg) sono stati estratti con acetato di etile per 6-8 h.

La soluzione è stata portata a secco in rotavapor, ottenendo così circa 10 g di estratto grezzo.

La ripartizione

L'estratto grezzo è stato ripartito tra due fasi mutualmente immiscibili, costituite da esano e metanolo acquoso (al 95% di metanolo). In questo modo è possibile separare da una parte le molecole più lipofile (che di preferenza migrano nella parte esanica) e dall'altra quelle più polari (di preferenza nella fase metanolica).

La separazione

L'analisi TLC (usando il campione precedentemente ottenuto come confronto) ha mostrato che il composto G2 è interamente contenuto nel substrato esanico.

Si decide di effettuare una prima separazione su silica gel: precedenti esperienze ci hanno sconsigliato l'uso dell'allumina come fase stazionaria, in quanto foriera di artefatti. Per questa separazione si è usato un rapporto di miscela grezza : silicagel di ca. 1 : 100 in peso. L'eluizione è stata eseguita con una miscela di etere di petrolio e acetato di etile, variandone i rapporti da 8:1 sino a 3:1 e infine con una miscela di toluene e acetato di etile in rapporto 1,5:1.

Per verificare il contenuto delle varie frazioni sono state eseguite delle TLC con varie miscele eluenti, a seconda della polarità delle frazioni. In particolare, la lastrina di fig. 13, contenente G2, è stata eluita con una miscela di toluene e acetato di etile in rapporto 1,5:1 a cui si è aggiunto un 5% ca. di metanolo. Come metodi generali di rivelazione si sono utilizzati la lampada UV (a 254 e 366 nm), e la rivelazione a caldo per reazione con solfoanisaldeide (SA).

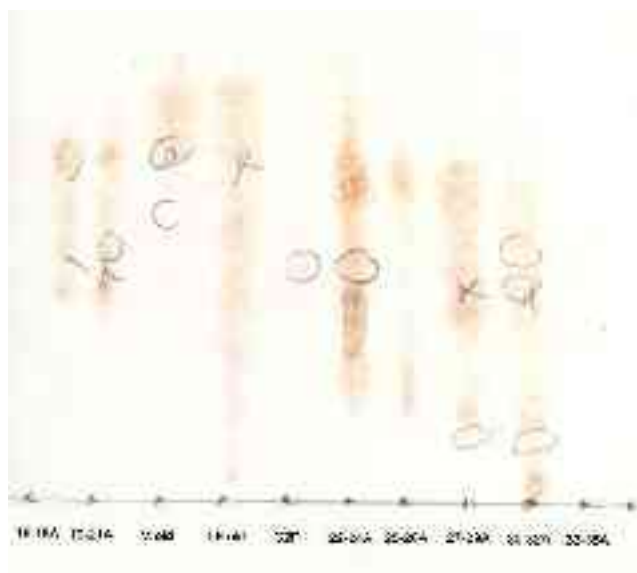


Fig. 13

G2 è individuato da una macchia UV attiva (a 254 nm), colorantesi in bruno-porpora non intenso alla SA.

Quindi le frazioni da 22A a 32A sono state unite e portate a secco, ottenendo ca. 120 mg. Il composto grezzo è stato sottoposto ad un'ulteriore separazione di tipo MPLC (Medium Pressure) in fase inversa su RP-18, utilizzando una pompa della KNF Laboport, operando ad una pressione di 0.8-1.0 bar. Come eluente si è usata una miscela composta da 40% di acqua, 30% metanolo e 30% isopropanolo; il gradiente di forza eluotropa crescente è stato realizzato aumentando la frazione organica, fino ad eluire la colonna con 100% di organico (vedi fig. 14).



Fig. 14

L'analisi ^1H NMR della frazione 13B, mostra la presenza del nostro triterpenoide in forma ancora non sufficientemente pura, mescolato a vari derivati degli acidi grassi, soprattutto gliceridi. Si effettua quindi un'ultima separazione con HPLC in fase inversa utilizzando una colonna semipreparativa (250 x 10 mm) con fase stazionaria RP-18 $5\ \mu$ di tipo Zorbax. L'eluente è una miscela di acqua e fase organica, quest'ultima è costituita da 3 parti di metanolo e 1 di acetonitrile, al solito in gradiente di organico crescente. Il flusso è stato mantenuto intorno ai 3,6 ml/min., e la rivelazione è stata eseguita con uno spettrofotometro operante a quattro differenti lunghezze d'onda simultaneamente. Questa separazione ha portato all'isolamento di G2 puro (ca. 35 mg), sotto forma di un olio di color giallo chiaro.

Caratterizzazione spettroscopica di G2

Sulla nostra molecola sono stati eseguiti i seguenti spettri:

- ◆ NMR: monodimensionali ^1H , ^{13}C , DEPT; bidimensionali COSY, HETCOR, HETCOR long-range (HETCOR = eterocorrelata ^1H - ^{13}C).
- ◆ IR come film sottile
- ◆ UV
- ◆ MS in introduzione diretta con ionizzazione APCI (Ionizzazione chimica con desorbimento da plasma).

L'analisi NMR è quella che fornisce il maggior numero di informazioni.

Iniziando dagli spettri monodimensionali, al protone (fig. 15) si nota il sistema AX di due doppietti a campi bassi (6.4 -7.0 ppm). Questa figura di risonanza è tipica di protoni olefinici mutuamente accoppiati, spostati a campi bassi dalla coniugazione diretta con un carbonile (carbonile α,β insaturo). La presenza di un tale gruppo funzionale è confermata dagli spettri ^{13}C e DEPT (fig. 116a,b e 17a,b), dove si hanno risonanze di carboni metinici (CH) a 152.3 e 119.2 ppm. Inoltre il carbonile α,β insaturo è anche responsabile del massimo di assorbimento UV che si ha negli spettri UV e CD (non riportati) a ca. 250 nm. La costante di accoppiamento ^3J protonica di ca. 14 Hz indica una stereochimica trans per il doppio legame, e quindi lo forza ad una posizione extra-annulare.

Altre informazioni utili provenienti dall'NMR sono:

- ◆ La presenza di tre carbonili di tipo chetonico è indicata dalle risonanze a 212.8, 211.5 e 200.7 nello spettro ^{13}C (carboni quaternari). I primi due appartengono a chetoni saturi, ed il terzo è il chetone insaturo di cui sopra.

- ◆ Vi sono quattro risonanze di carboni ossigenati sp^3 , a 79.0 (quaternario), 77.6 (quat.), 73.2 (CH), e 71.5 (CH) ppm; questa informazione, unita alla presenza di due carbonili acilici a 173.0 e 169.4 ppm, ed a altri dati dallo spettro protonico, consente di determinare la presenza di due esteri, uno su di un alcol secondario, l'altro su di un alcol terziario. Gli altri due carboni ossigenati appartengono ad un alcol secondario e ad uno terziario.

L'analisi dello spettro IR, riportato in fig. 18, conferma i dati osservati all'NMR. In particolare si nota:

- ◆ A 3456 cm^{-1} si ha la tipica banda larga dello stretching O-H
- ◆ Intorno a 1730 cm^{-1} vi è una banda larga e composita di stretching C=O, indicativa di diversi tipi di carbonili
- ◆ A ca. 1240 cm^{-1} si ha la presenza di due bande di assorbimento, assegnate allo stretching C-O delle due funzioni esteree.

Tutte queste informazioni consentono di assegnare a G2 una struttura triterpenica molto simile a quella precedentemente trovata in letteratura per le cucurbitaceine estratte dalla pianta *Ecballium elaterium* (5). Come già detto nell'introduzione, queste molecole sono ricche di attività biologiche, fra cui quella, assai interessante, di regolatrici della crescita delle piante. I dati spettroscopici di G2 però, non corrispondono esattamente a nessuna delle specie precedentemente descritte; si tratta quindi, con tutta probabilità, di una molecola nuova.

Un più approfondito esame degli spettri NMR si rende necessario, innanzitutto per chiarire la natura dei due esteri presenti. Si individua così una unità di acetato (metile a ca. 2.0 ppm e carbonio metilico a ca. 22 ppm), gruppo funzionale comune nelle cucurbitaceine. Per quanto riguarda il secondo estere, la presenza di un picco NMR ad area elevata a ca. 1.30 ppm (confermata da una serie di picchi metilenici a 30 ppm ca.), e quella di un tripletto metilico a 0.87 ppm (confermata da un carbonio metilico a 14 ppm), indicano la presenza di un acido grasso a lunga catena. Vista la presenza di una insaturazione (^1H : multipletto a 5.3 ppm; ^{13}C : due CH a ca. 120 ppm), l'acido in questione è con tutta probabilità l'acido oleico.

Lo spettro di massa si rivela quindi di grande importanza. Lo spettro eseguito (a ionizzazione chimica) è riportato in fig. 19. Il picco pseudomolecolare del nostro composto ($M + H$) è probabilmente quello a 819 uma, corrispondente ad un PM di 818. I picchi a 879 e 880 uma sono con tutta probabilità dovuti ad impurezze (il campione utilizzato non aveva subito l'ultimo passaggio di purificazione in HPLC). Il picco a 481 uma corrisponde alla

parte terpenica priva degli acidi oleico e acetico, e a seguito di una doppia disidratazione (a partire dagli ossidrili alcolici).

Per ultimo c'è da stabilire la posizione dei due esteri. I nostri dati NMR, ed il confronto con i dati di letteratura (5) permettono di assegnare la posizione dei due ossidrili alcolici liberi in 2 e 20, mentre le posizioni 16 e 25 sono quelle esterificate. Per la posizione esatta dell'acetato e dell'oleato si ricorre all'NMR bidimensionale di tipo HETCOR long-range, che permette di visualizzare le 2J e 3J 1H - ^{13}C (mostrato in fig. 20). A seguito dell'osservazione della 2J CH_3 -CO (acetato) e della 3J CH-O-CO (oleato), la posizione dell'acetato è stabilita essere in 25, e quella dell'oleato in 16.

Per le stereochimiche relative, si ricorre all'analisi delle 3J 1H - 1H , e per quella assoluta all'analisi dello spettro di dicroismo circolare (non mostrato). In questa maniera è possibile assegnare, a G2, la formula finale riportata qui sotto (fig. 21):

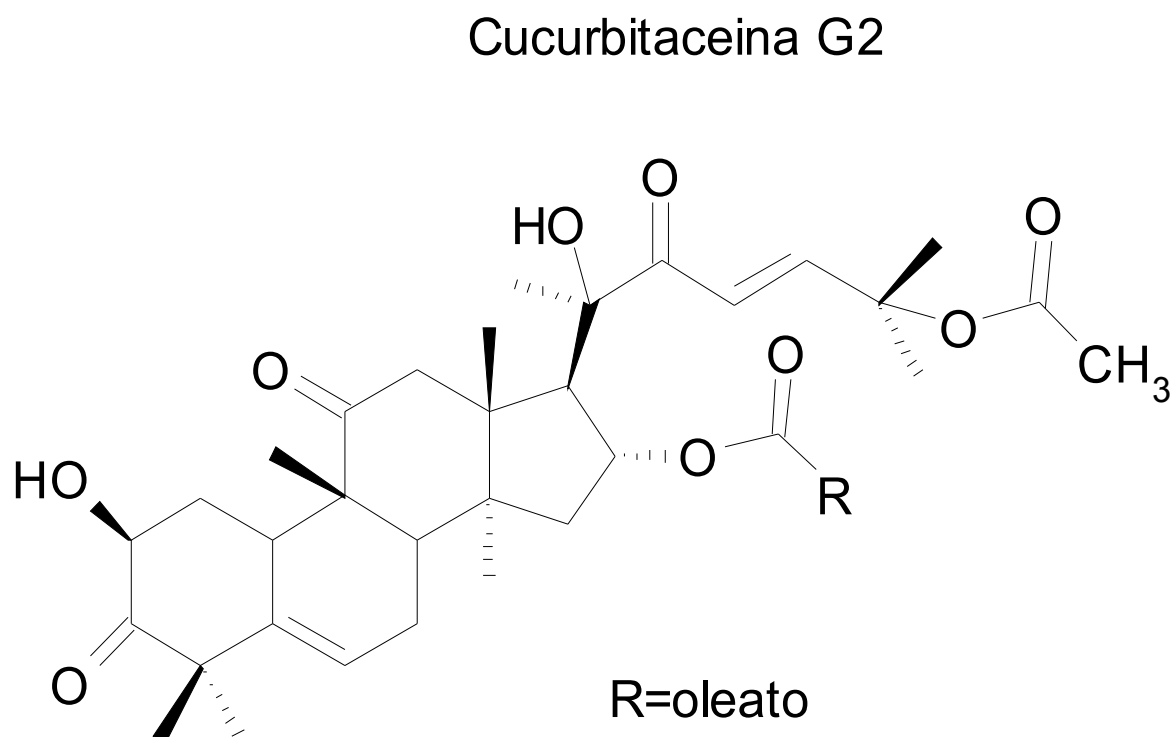


Fig. 21

Ad una prova di assaggio, G2 non risulta di sapore amaro, per cui la molecola o le molecole responsabili del gusto del *L. amarus* sono ancora da scoprire.

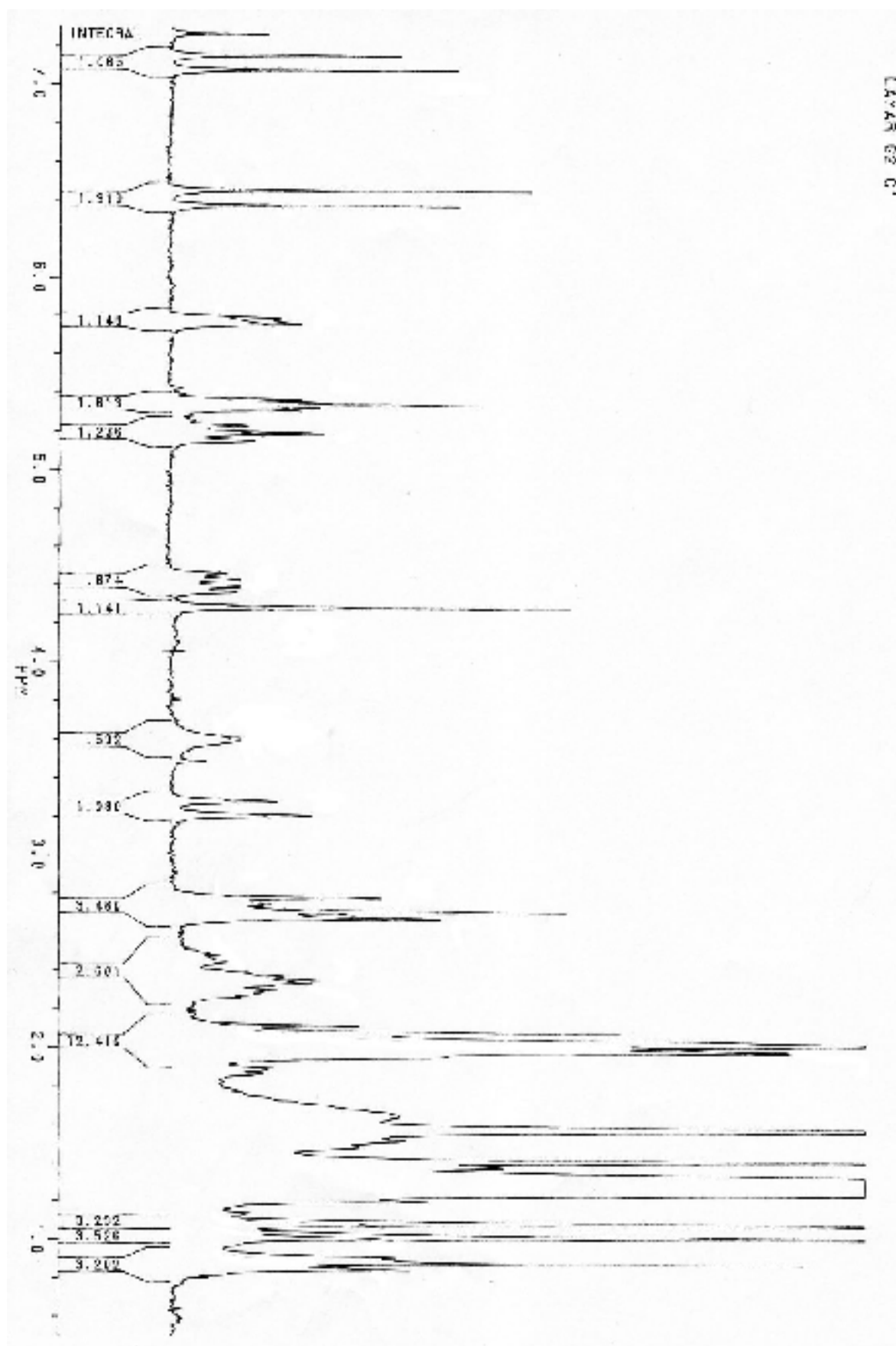


Fig. 15

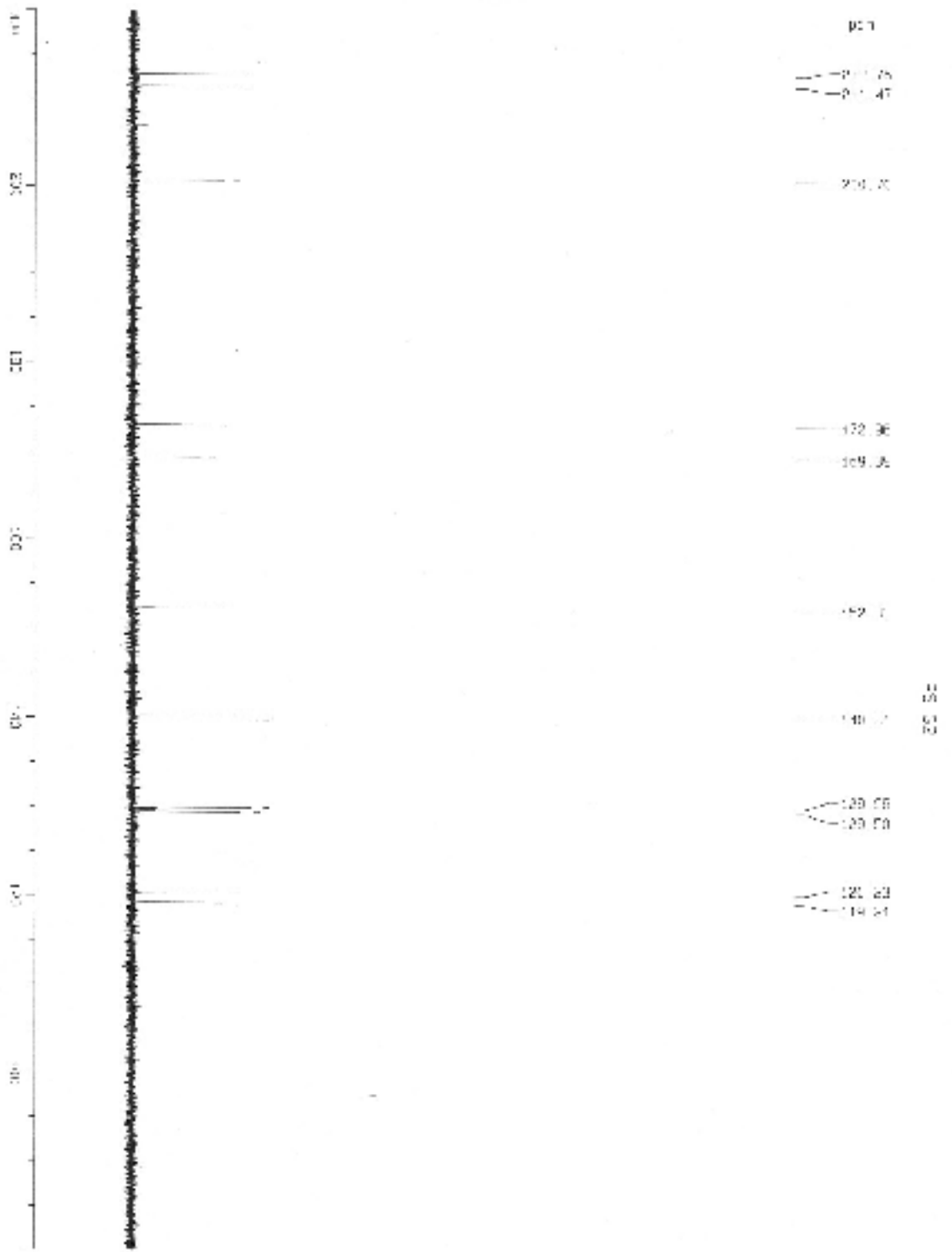


Fig. 16a

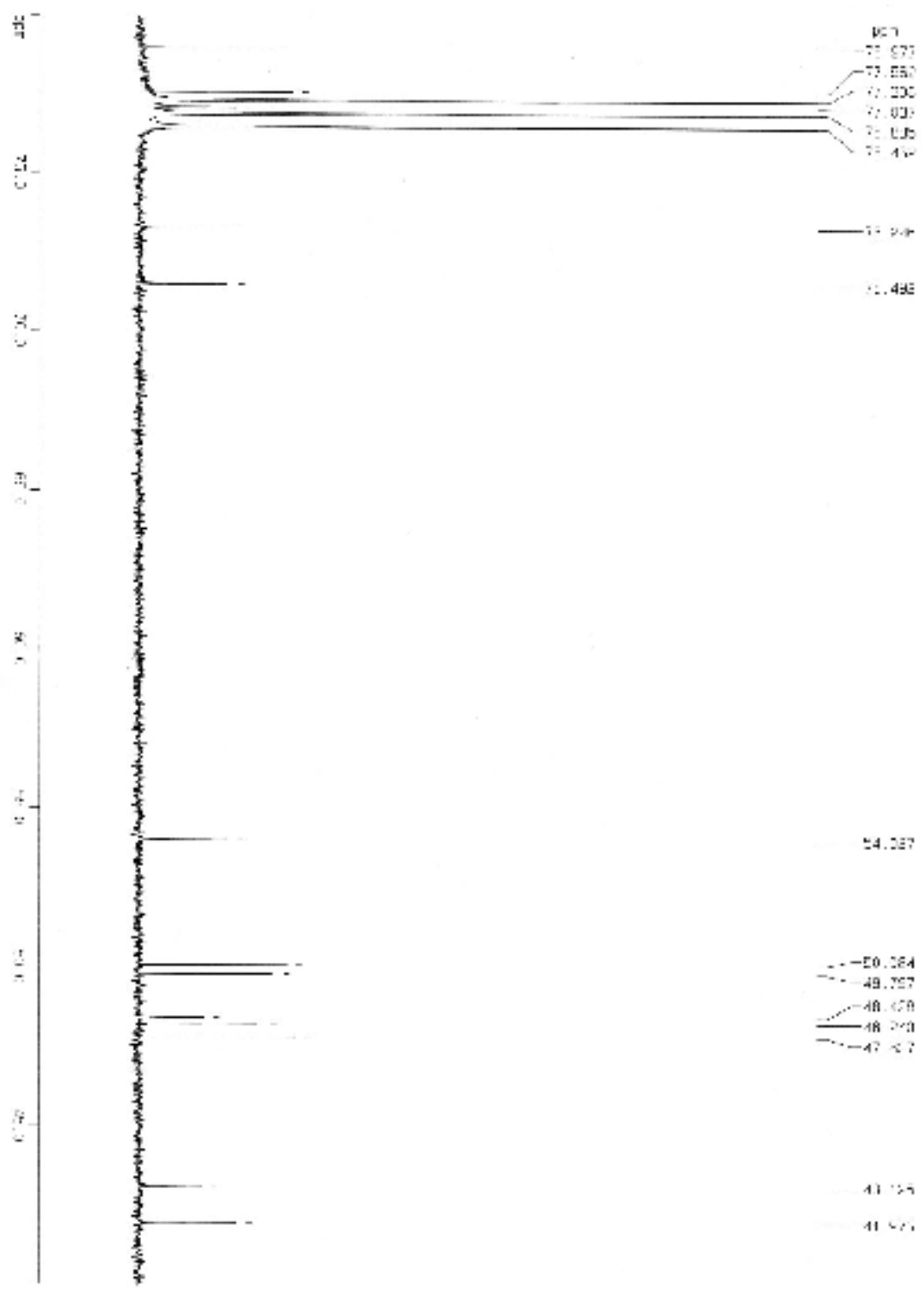
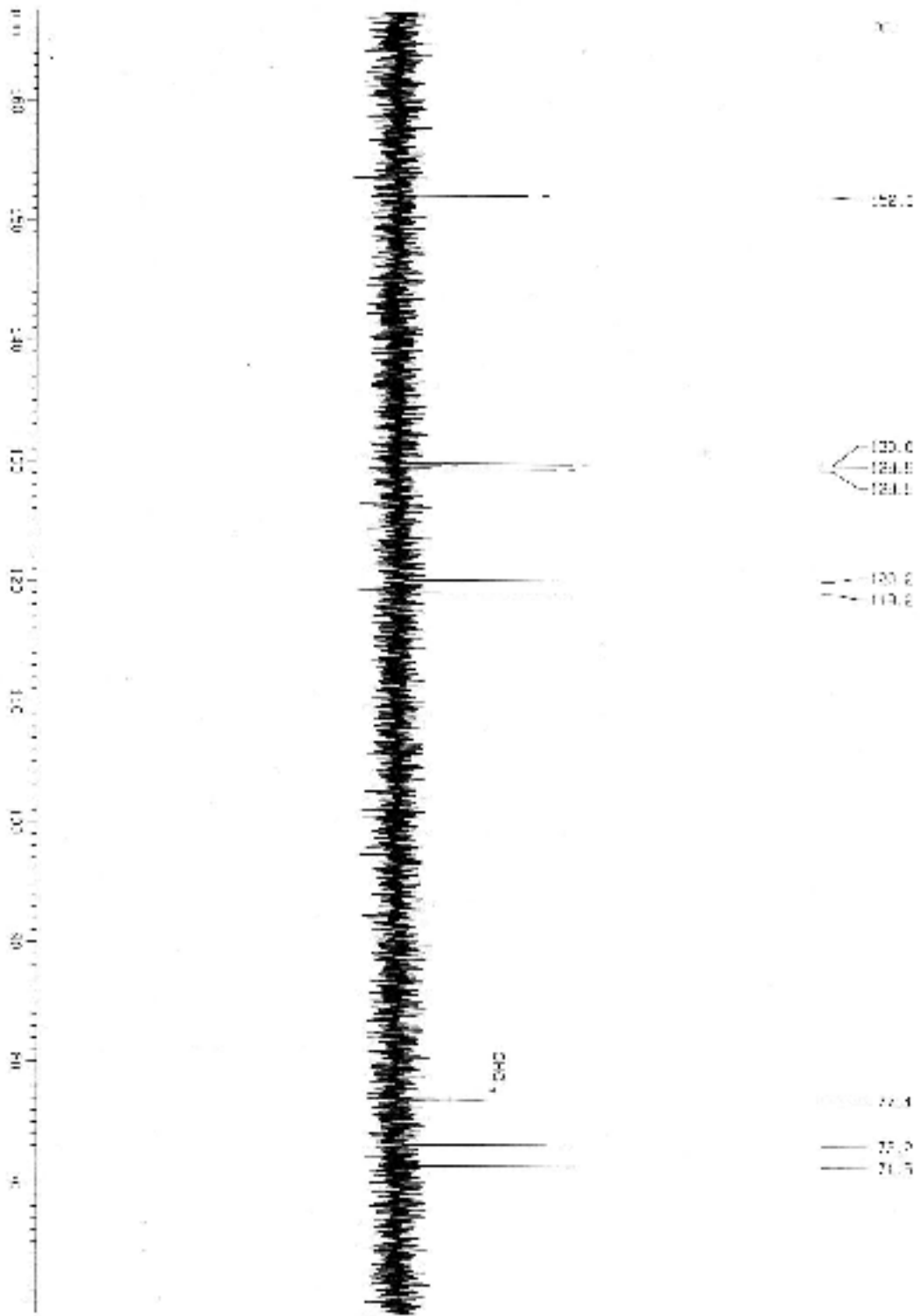
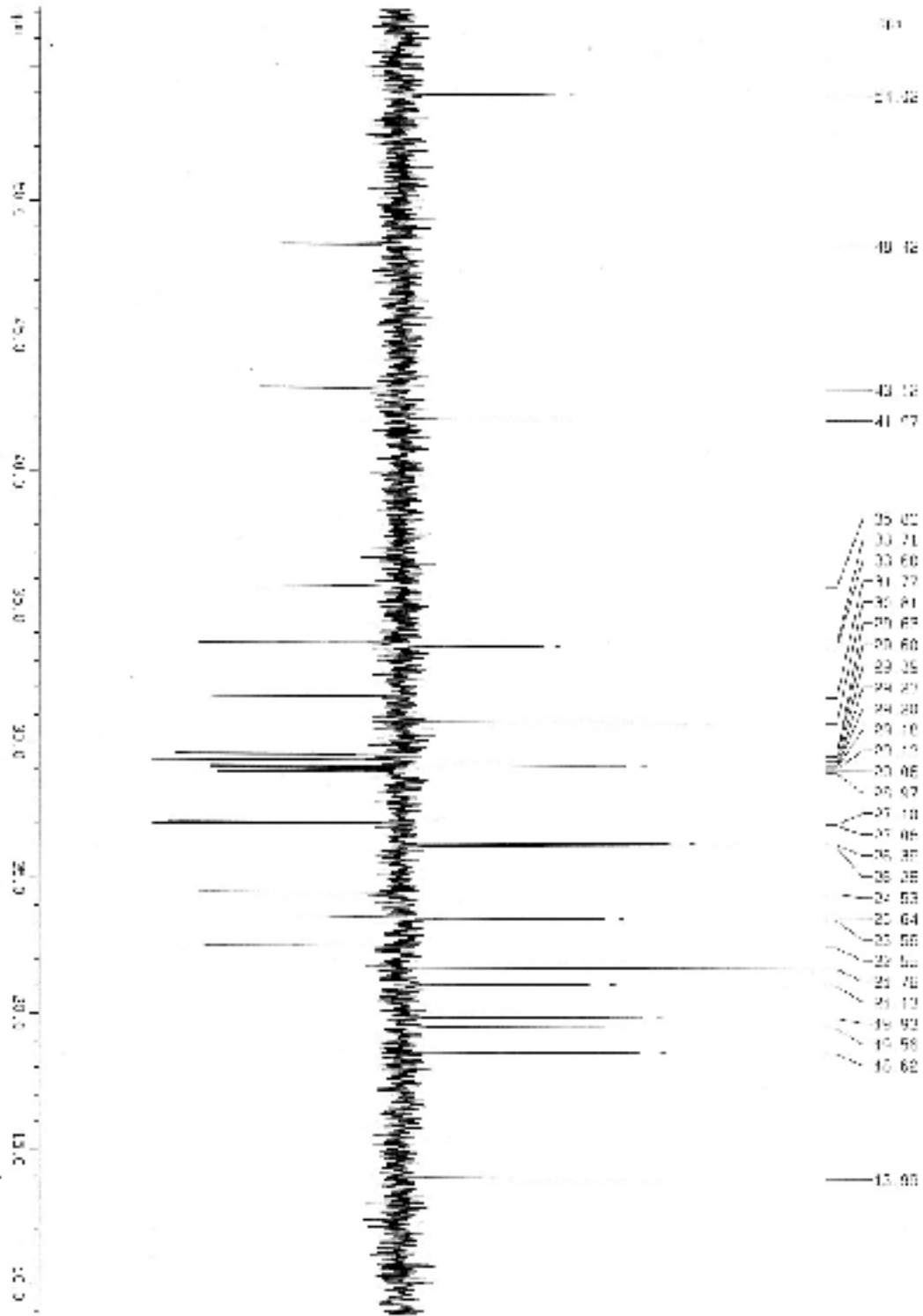


Fig. 16b



TR 02 LEI 132

Fig. 17a



78 02 SEP 1950

Fig. 17b

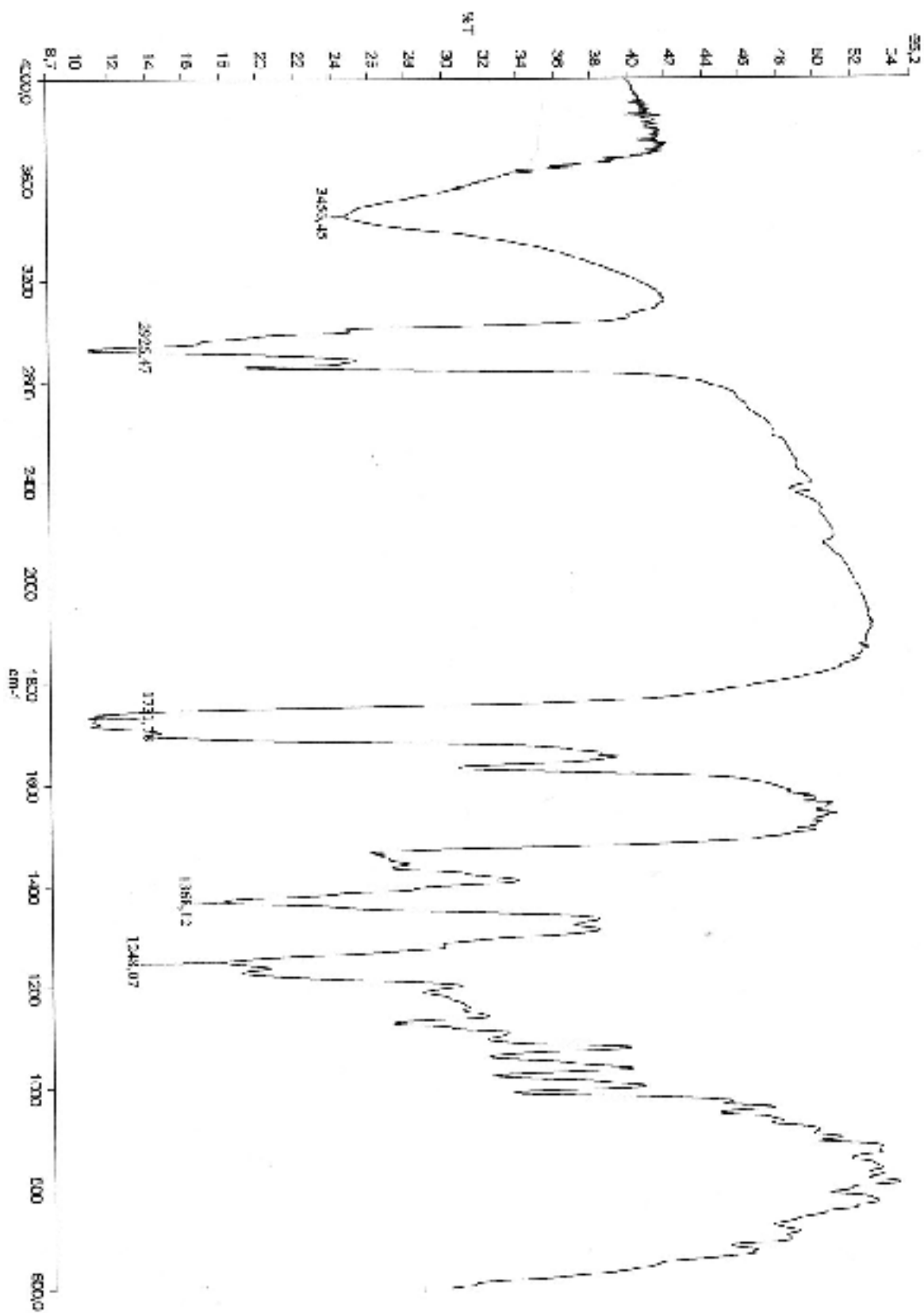


Fig. 18

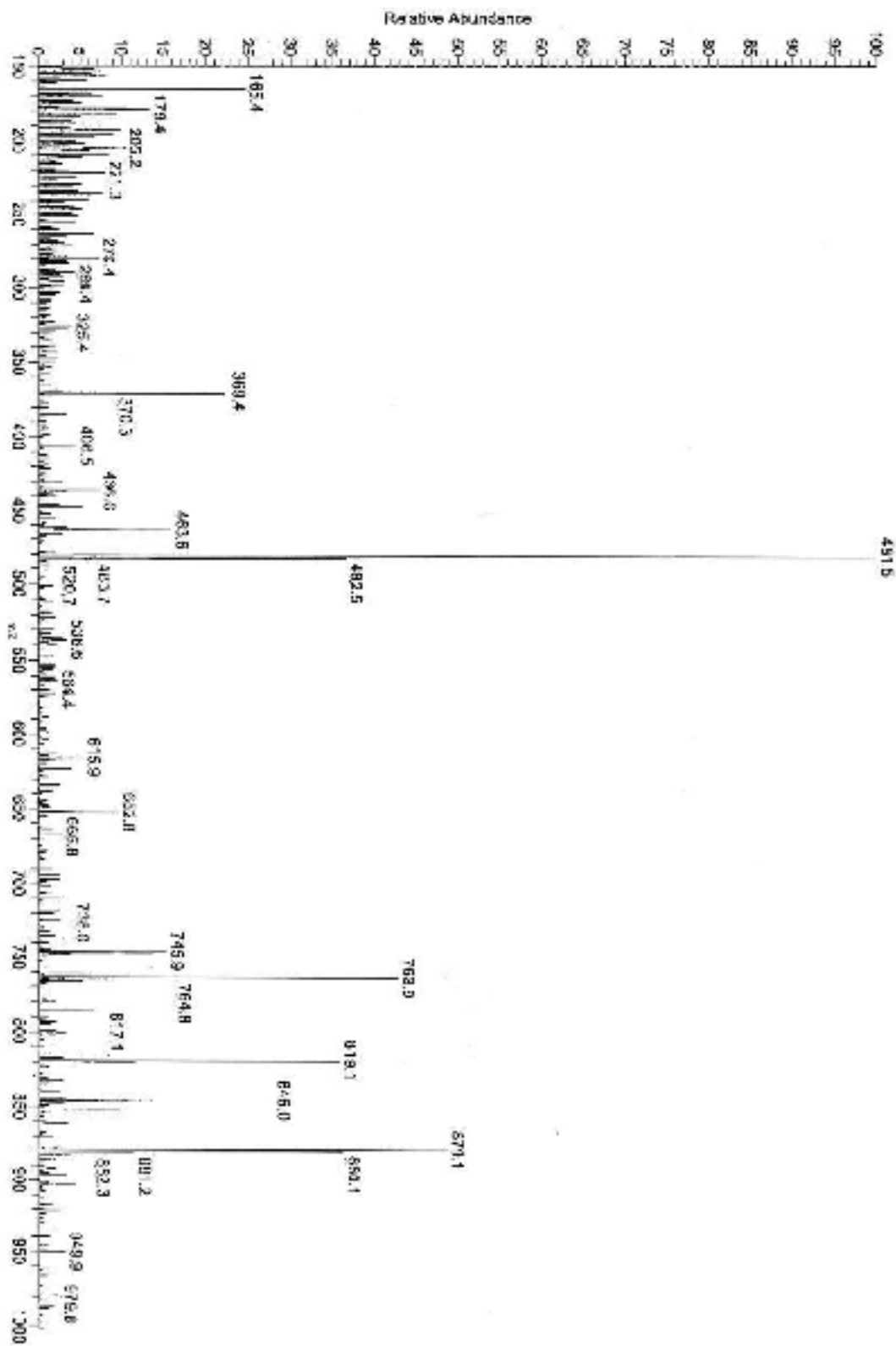


Fig. 19

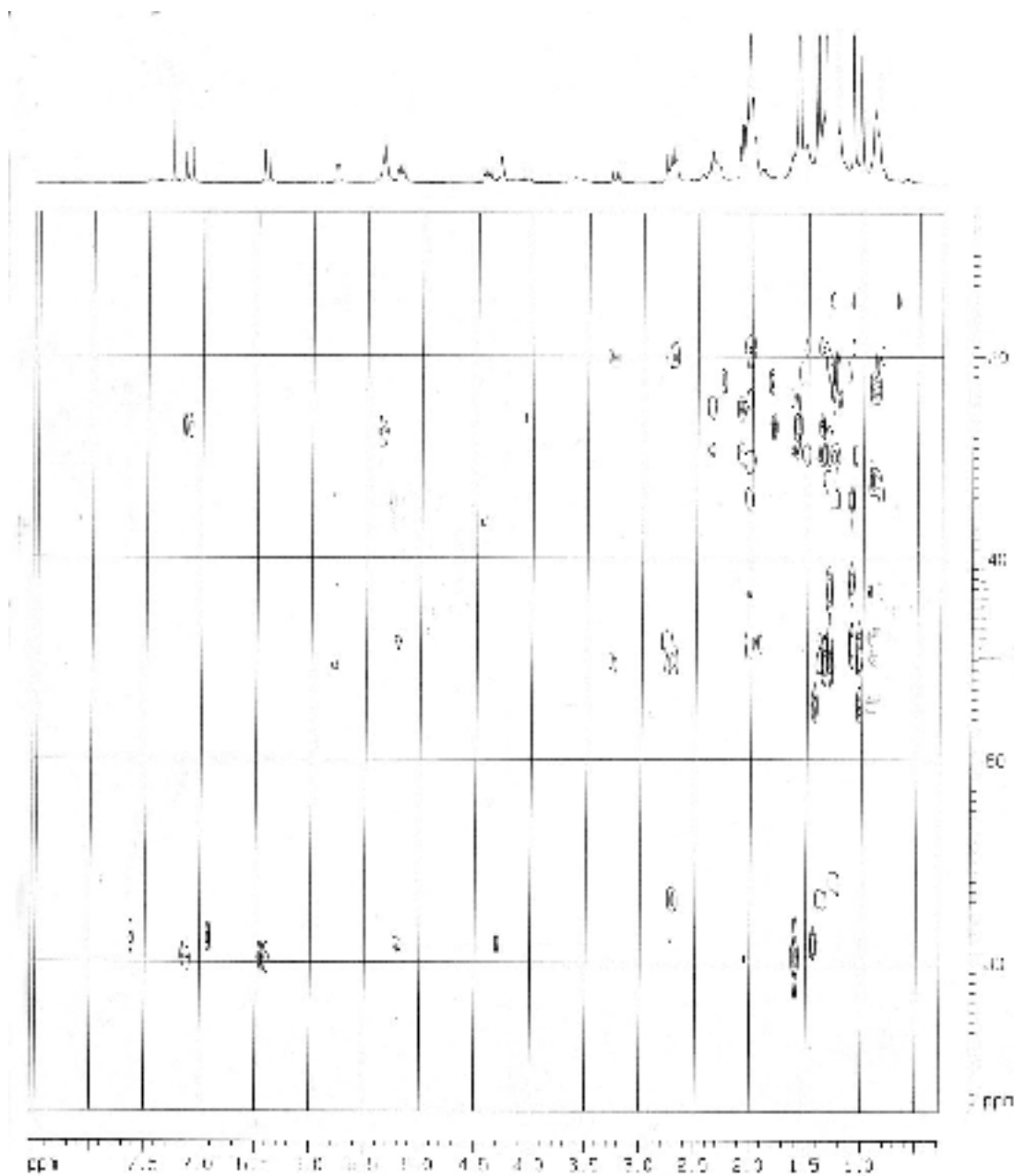


Fig. 20

Tabella 1 - Assegnazioni ^1H e ^{13}C NMR della molecola G2. Solvente: CDCl_3 .

Numero atomo	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	35.8	2.70, 1.32
2	71.5	4.41
3	212.8	-
4	50.1	-
5	140.3	-
6	120.2	5.78
7	24.5	1.52
8	42.0	1.97
9	48.2	-
10	33.6	2.69
11	211.5	-
12	48.4	2.75
13	47.8	-
14	49.8	-
15	43.1	1.94, 1.48
16	73.2	5.19
17	54.0	2.68
18	19.6	1.03
19	19.9	1.09
20	77.6	-
21	23.5	1.41
22	200.7	-
23	119.2	6.41
24	152.3	7.10
25	79.0	-
26*	26.3	1.58
27*	26.2	1.58
28	21.1	1.26
29	29.2	1.31
30	18.6	1.28
OH	-	4.25, 3.59
Acetato C=O	169.4	-
Acetato CH₃	21.7	2.03
Oleato C=O	173.0	-
Oleato CH=CH	130.0, 129.5	5.32
Oleato CH₂	31.8	2.10
Oleato CH₃	14.0	0.87

* = assegnamenti intercambiabili

BIBLIOGRAFIA

1. K. B. G. Torssell, **Natural Product Chemistry**, Kristianstads Bktryckeri AB, Sweden 1997.
2. A. Dossena, A. Lunghi, L. Garlaschelli, G. Vidari **Fungal metabolites 40. The structure and absolute configuration of two novel triterpene depsipetides from the fruiting bodies of *Hebeloma senescens***, *Tetrahedron: Asymmetry*, Vol. 7, No. 7, pp. 1911-1914, 1996; L. Garlaschelli, G. Vidari, M. Virtuani, P. Vita-Finzi **The structures of new lanostane triterpenes from the fruiting bodies of *Hebeloma senescens***, *Journal of Natural Products*, Vol. 58, No. 7, pp. 992-1002, July 1995.
3. M. De Bernardi, G. Mellerio, G. Vidari, P. Vita-Finzi **Fungal Metabolites. IX. Triterpenes from *Naematoloma Sublateritium***, *Journal of natural products*, Vol. 44, No 3, 1981.
4. V. V. Velde, D. Lavie **¹³C NMR Spectroscopy of cucurbitacins**, *Tetrahedron* Vol. 39, No 2, pp. 317 to 321, 1983. per quanto riguarda la struttura e le proprietà biologiche delle cucurbitaceine, vedi ancora: D. Lavie, E. Glotter **Progress in the chemistry of organic natural products**, Vol. 29, p. 307, Springer-Verlag, New York 1971; S. M. Kupchan, C. W. Sigel, L. G. Guttman, R. J. Restivo, R. F. Bryan *J. Am. Chem. Soc.* 94, 1353, 1972; B. Shohat, S. Gitter, D. Lavie *J. Nat. Cancer Instit.*, 38, 1, 1967; M. Cassady, M. Suffness *Medicinal Chemistry*, Vol. 16, **Anticancer agents based on natural products models**, Academic Press, New York 1980; B. Shohat, A. M. Beemer, S. Gitter, D. Lavie *Experientia*, 28, 1203, 1972; A. Shrotria *Botanica*, 26, 28, 1976; H. Fujimoto, K. Suzuki, H. Hagiwara, M. Yamazaki **New toxic metabolites from a mushroom *Hebeloma Vinosophilum*. I. Structures of Hebevinosides I, II, III, IV and V**, *Chem. Pharm. Bull.*, 34(1), 88-99, 1986.
5. A. Takahashi, G. Kusano, T. Ohta, Y. Ohizumi, S. Nozoe *S. Chem. Pharm. Bull.*, 32, 3247, 1989.
6. M. Ikeda, H. Watanabe, A. Hayakawa, K. Sato, T. Sassa, Y. Miura *Agric. Biol. Chem.*, 41, 1543, 1977; M. Ikeda, G-i. Niwa, K. Tohyama, T. Sassa, Y. Miura *Agric. Biol. Chem.*, 41, 1803, 1977.