

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”



FACOLTA' DI FARMACIA

DOTTORATO DI RICERCA

IN

“SCIENZA DEL FARMACO”

XX CICLO

2004-2007

**ISOLAMENTO E DETERMINAZIONE
STRUTTURALE
DI METABOLITI BIOATTIVI DA INVERTEBRATI
MARINI**

TUTOR

Prof. Orazio Tagliatela–Scafati

DOTT.SSA

Adriana Romano

COORDINATORE

Prof.ssa Maria Valeria D’Auria

INDICE

I. CAPITOLO I: INTRODUZIONE - LA CHIMICA DELLE SOSTANZE NATURALI.....	1
II. CAPITOLO II: GLI ORGANISMI MARINI	
II. A. <i>Le spugne</i>	7
II. B. <i>Gorgonie e soft corals</i>	13
III. CAPITOLO III: TECNICHE PER LA DETERMINAZIONE STEREOSTRUTTURALE	
III. A. TECNICHE DI DETERMINAZIONE STRUTTURALE....	17
III. A. 1 <i>Spettrometria di massa</i>	17
III. A. 2. <i>Spettroscopia NMR</i>	18
III. B. TECNICHE PER LA DETERMINAZIONE DELLA STEREOCHIMICA.....	23
III. B. 1. <i>Metodo di Murata</i>	25
III. B. 2. <i>Tecniche computazionali</i>	26
III. B. 3. <i>Metodo di Mosher</i>	28
III. B. 4 <i>Metodo di Nakanishi</i>	30
III. C. <i>Bibliografia</i>	33

IV. CAPITOLO IV: ANALISI DELLA SPUGNA <i>PLAKORTIS SIMPLEX</i>	34
IV. A. <i>Estrazione ed isolamento di polichetidi da P. simplex</i>	38
IV. B. <i>Determinazione strutturale dei composti isolati</i>	40
IV. C. <i>La malaria</i>	46
IV. D. <i>Attività antimalarica</i>	52
V. CAPITOLO V: STUDI SUL MECCANISMO D'AZIONE DELLA PLAKORTINA.....	54
V. A. <i>Modificazioni semisintetiche della plakortina</i>	54
V. B. <i>Attività contro P. falciparum dei derivati semisintetici della plakortina</i>	60
V. C. <i>Reazioni con lo ione ferroso</i>	66
V. D. <i>Parte sperimentale</i>	73
V. E. <i>Dati spettroscopici</i>	88
V. F. <i>Bibliografia</i>	105
VI. CAPITOLO VI: ANALISI DELLA SPUGNA <i>COELOCARTERIA SINGAPORENSIS</i>	107
VI. A. <i>Diterpeni isocopalanici</i>	108
VI. B. <i>Estrazione ed isolamento</i>	110
VI. C. <i>Determinazione strutturale</i>	110
VI. D. <i>Parte sperimentale</i>	116

VI. E. <i>Dati spettroscopici</i>	120
VI. F. <i>Bibliografia</i>	124
VII. CAPITOLO VII: ANALISI DEL SOFT CORAL <i>UMBELLULIFERA SP</i>	127
VII. A. <i>Estrazione ed isolamento</i>	130
VII. B. <i>Determinazione strutturale dei composti isolati</i>	130
VII. C. <i>Modifiche semisintetiche del decariolo</i>	139
VII. D. <i>Attività farmacologica</i>	143
VII. E. <i>Parte sperimentale</i>	144
VII. F. <i>Dati spettroscopici</i>	151
VII. G. <i>Bibliografia</i>	164
VIII. CAPITOLO VIII: ANALISI DEL SOFT CORAL <i>XENIA SP</i>	166
VIII. A. <i>Estrazione ed isolamento</i>	171
VIII. B. <i>Determinazione strutturale dei composti isolati</i>	172
VIII. C. <i>Parte sperimentale</i>	177
VIII. D. <i>Dati spettroscopici</i>	181
VIII.E. <i>Bibliografia</i>	187

I. INTRODUZIONE

Tutti gli organismi hanno bisogno di sintetizzare e trasformare un gran numero di composti organici per poter vivere, crescere e riprodursi.

In contrasto con le vie del metabolismo primario, che sintetizzano, degradano, e, più in generale trasformano composti presenti in tutti gli organismi, esiste anche una parte del metabolismo che riguarda molecole con una distribuzione in natura molto più limitata. Questi composti, chiamati metaboliti secondari, si trovano solo in specifici organismi o gruppi di organismi e sono espressione della individualità della specie.

E' noto che le piante sono particolarmente ricche di metaboliti secondari le cui proprietà sono sfruttate da tempo per la cura di malattie, ma negli ultimi decenni si è scoperto che anche gli organismi marini animali producono una serie di composti con spiccate attività farmacologiche.

In passato prodotti secondari erano considerati tutte quelle sostanze, come ad esempio gli alcaloidi, i tannini e i terpeni, che, prima di studi sul significato fisio-ecologico di questi metaboliti, si riteneva non fossero coinvolte nei processi metabolici essenziali per l'organismo. Tra i metaboliti secondari i terpenoidi ad esempio rappresentano il più vasto gruppo di composti sia terrestri che marini. Queste sostanze sono caratterizzate dall'aver una comune unità strutturale, l'isoprene, e comprendono ormoni ed altre sostanze che rivestono un ruolo fondamentale nel metabolismo dell'organismo.

I metaboliti secondari non sono necessariamente prodotti in tutte le condizioni, e nella maggioranza dei casi, non sono ancora noti né la funzione di questi composti, né i vantaggi che apportano all'organismo che li produce. Alcuni sono indubbiamente biosintetizzati per ragioni facilmente comprensibili, per esempio composti tossici che forniscono protezione contro la predazione, composti volatili che servono come attrattori verso la stessa o altre specie, o composti che fungono da coloranti, ma è logico assumere che tutti i metaboliti secondari hanno qualche ruolo vitale per il benessere dell'organismo che li produce. I prodotti del metabolismo secondario sono in pratica gli intermediari con cui gli esseri viventi comunicano con l'ambiente che li circonda, incluso quello animale, con lo scopo di trovare le condizioni più adatte per poter vivere.

Molti terpeni o composti derivati sono tossici per le cellule dell'organismo stesso che li produce; tale tossicità costituisce un vero e proprio schermo biochimico contro l'attacco di agenti patogeni.

E' proprio l'area del metabolismo secondario che fornisce la maggior parte delle sostanze naturali farmacologicamente attive, pertanto, se è vero che viene definito farmaco un composto chimico in grado di prevenire e curare le malattie, è ipotizzabile che sia statisticamente più probabile trovare tra i metaboliti secondari, sia vegetali che animali, costituenti chimici che posseggano queste proprietà.

Attualmente, nonostante la crescente introduzione di farmaci di sintesi, circa il 45% degli agenti terapeutici monomolecolari riportati nelle farmacopee, sono di origine naturale o derivano direttamente da molecole naturali. La diversità chimica che caratterizza le molecole naturali rende l'esplorazione delle loro caratteristiche biologiche, non solo una delle principali fonti di nuovi composti potenzialmente utilizzabili per la realizzazione di nuovi farmaci, ma anche uno strumento utile per la scoperta di nuovi meccanismi d'azione.

Per i motivi su citati la chimica delle sostanze naturali ha avuto dei grandi progressi negli ultimi decenni, con il risultato di una migliore conoscenza dei processi enzimatici e lo sviluppo delle teorie biogenetiche e biosintetiche in una classificazione logica che collega insieme una grande varietà di composti. E' di fondamentale importanza capire come la natura elabora una gran numero di sostanze, il ruolo delle molecole biosintetizzate e soprattutto l'eventuale applicazione delle stesse in campo medico.

In effetti le piante si sono rivelate le uniche risorse medicamentose che l'uomo abbia potuto utilizzare praticamente per quasi tutto il percorso della sua storia. Le sostanze naturali sono state infatti utilizzate per secoli dall'uomo come agenti terapeutici. E' per tale motivo che le piante sono da sempre di grande interesse per i chimici delle sostanze naturali. Negli ultimi decenni invece, il progresso in alcune tecnologie ha reso possibile l'estensione della ricerca anche agli organismi marini e ciò ha portato all'isolamento di migliaia di nuove molecole con strutture mai trovate nel mondo terrestre e dotate di una vasta gamma di attività farmacologiche. Un'ulteriore spinta a favore degli studi sui metaboliti secondari provenienti dall'ambiente marino è stata data dall'osservazione che almeno il 10% degli organismi marini produce sostanze citotossiche o con spiccate proprietà antimicrobiche e/o antivirali.

I dati attualmente disponibili sui prodotti naturali marini mettono in evidenza due aspetti interessanti: (a) le strutture molecolari testimoniano la presenza di caratteristiche biochimiche che non hanno equivalenti in organismi terrestri e (b) rispetto a quanto si riscontra sulla terra, nel mare esiste un maggior numero di organismi ed una minore omogenità genetica in popolazioni distinte della stessa specie che, a livello molecolare, porta ad una maggiore diversità strutturale.

Tra gli organismi marini, la probabilità di ritrovare composti bioattivi si è rivelata nettamente più alta in alcuni invertebrati marini, come coralli, tunicati e spugne, in quanto la maggior parte di queste sostanze hanno un ruolo di difesa chimica, fondamentale per la sopravvivenza di questi organismi, privi di difese fisiche contro l'attacco dei predatori. Le spugne, tra gli organismi marini, rappresentano la fonte dominante di metaboliti che presentano una spiccata attività farmacologica.

Un esempio è dato dalle spugne perforanti che hanno sempre incuriosito i chimici del mare, inizialmente interessati ad una comprensione completa del meccanismo con cui questi organismi perforano i substrati calcarei. Un altro aspetto che sembrava estremamente interessante era il sistema adottato da queste spugne per difendere le piccole parti non protette dalla roccia. In questo caso, il sistema di difesa deve essere molto efficiente in quanto le parti esposte costituiscono l'unico sistema di comunicazione con l'ambiente esterno e, soprattutto, l'unica via per l'approvvigionamento di cibo. Le spugne perforanti sono, quindi, dei potenziali produttori di metaboliti tossici, che utilizzano per proteggere le proprie strutture esterne.

Finora sono stati isolati circa 15000 nuovi composti da organismi marini, sono stati registrati centinaia di brevetti di sostanze marine bioattive e oltre 20 prodotti sono attualmente in avanzata fase di sperimentazione, principalmente come farmaci antitumorali.

Alla luce dello sviluppo delle tecniche della moderna biotecnologia, è lecito aspettarsi un rapido progresso nella comprensione del metabolismo secondario in organismi marini, tale da permettere un controllo dei processi biochimici e consentire la preparazione su larga scala dei composti di interesse applicativo.

Un problema è che numerosi prodotti isolati da organismi marini, pur avendo delle notevoli, specifiche ed interessanti attività farmacologiche, molto spesso non vengono

presi in considerazione dalle industrie farmaceutiche per la difficoltà ad ottenere i prodotti in quantità sufficienti per l'eventuale commercializzazione.

Per superare questi ostacoli si potrebbe mettere a punto la sintesi totale, con tutte le difficoltà derivanti dalla presenza di numerosi centri chirali, che in molti casi rendono economicamente non utilizzabile la via sintetica. In questo caso, la fonte naturale è la strada migliore da percorrere. Per evitare i notevoli danni ambientali derivanti da un massiccia raccolta di organismi marini, produttori di molecole di interesse industriale, si possono utilizzare due vie alternative: la crescita massiva degli organismi in bacini controllati (acquacoltura), e la bioproduzione, in laboratorio, di metaboliti utilizzando colture cellulari, che, d'altra parte, potrebbero essere utilizzate anche come fonte del materiale di partenza per acquacoltura in quei casi in cui gli organismi sono di difficile reperimento.

Il progresso della chimica delle sostanze naturali negli ultimi quaranta anni è da attribuire principalmente agli sviluppi nelle tecniche strumentali di purificazione (quali i sempre più perfezionati sistemi di HPLC o tecniche come la cromatografia a goccia contro corrente ecc.) e di determinazione strutturale. Tra queste sicuramente la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare gioca la parte più importante insieme alle preziose informazioni fornite dalla spettrometria di massa, che pure in questo periodo sta attraversando una fase di intenso sviluppo. Infatti è attualmente possibile evidenziare molecole presenti nell'organismo vivente anche solo dell'ordine di qualche milligrammo e, attraverso nuovi saggi in vivo e in vitro, è diventato sempre più semplice determinare l'attività farmacologica delle nuove molecole isolate in maniera tale che anche il chimico possa accedere facilmente a tali saggi ed utilizzarli allo scopo di indirizzare con la farmacologia le separazioni da effettuare. In particolare nel corso dei miei studi ho potuto effettuare diversi esperimenti su piccole quantità di campione grazie all'ausilio dello spettrometro Varian NMR (700 MHz) con cryoprobe.

Nell'ambito della chimica delle sostanze naturali, durante il periodo di dottorato di ricerca in "Scienza del Farmaco", mi sono occupata dell'isolamento e della determinazione strutturale di metaboliti secondari da organismi marini. Lo scopo del progetto di ricerca non è tanto volto all'utilizzo terapeutico dei composti naturali in quanto tali, ma è per lo più indirizzato verso un loro impiego come composti modello (*lead-compounds*) per la progettazione di nuovi farmaci. Tale ricerca prevede un

approfondito studio sulla natura delle interazioni molecolari fra la sostanza bioattiva ed il *target* biologico, al fine di ottenere indicazioni sulla porzione della molecola responsabile dell'attività.

Nuove classi di farmaci possono presentare numerosi vantaggi rispetto alle molecole naturali utilizzate come modello. E' infatti possibile progettare strutture molecolari chimicamente "semplificate" rispetto ai composti naturali con conseguente disponibilità di una via sintetica per il farmaco, che riduce i costi rispetto a quelli per il suo isolamento da fonti naturali; aumentano le possibilità di ottenere una più elevata affinità recettoriale con una ottimizzazione dell'attività farmacologica ed infine è realizzabile un miglioramento dei parametri farmacocinetici connessi alla somministrazione *in vivo* del farmaco, come la riduzione degli effetti tossici o l'ottimizzazione della biodisponibilità. In particolare mi sono occupata del proseguimento degli studi sulla plakortina, polichetide cicloperossidico ad attività antimalarica isolata dalla spugna *Plakortis simplex*^{1,2} e dell'analisi chimica della spugna *Coelocarteria singaporensis*³ e dei soft corals *Umbellulifera sp.* e *Xenia sp.*

L'attività di ricerca che ho svolto durante il periodo di dottorato è risultata nella pubblicazione dei seguenti lavori scientifici:

1. C. Fattorusso, G. Campiani, B. Catalanotti, M. Persico, N. Basilico, S. Parapini, D. Taramelli, C. Campagnolo, E. Fattorusso, A. Romano e O. Tagliatatela-Scafati; "Endoperoxide Derivates from Marine Organisms: 1,2-dioxanes of the Plakortin Family as Novel Antimalarial Agents". *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 7088-7094.
2. C. Campagnolo, E. Fattorusso, A. Romano, O. Tagliatatela-Scafati, N. Basilico, S. Parapini e D. Taramelli; "Antimalarial Poliketide Cycloperoxides from the Marine Sponge *Plakortis simplex*". *Eur. J.Org. Chem.* **2005**, 5077-5083.
3. E. Fattorusso, A. Romano, O. Tagliatatela-Scafati, G. Bavestrello, P. Monelli e B. Calcinaï; "Coelodiol and coeloic acid, ent-isocopalane diterpenes from the

Indonesian sponge Coelocarteria singaporensis". *Tetrahedron Letters* **2006**, 47, 2197-2200.

4. E. Fattorusso, A. Romano, O. Tagliatela-Scafati, M. J. Achmad, G. Bavestrello, C. Cerrano; "*Xenimanadins A-D, a family of xenicane diterpenoids from the Indonesian soft coral Xenia sp.*" *Tetrahedron Letters*, in press.

Altra pubblicazione del triennio su un argomento diverso da quelli riportati nella presente tesi:

5. C. Fattorusso, E. Stendardo, G. Appendino, E. Fattorusso, P. Luciano, A. Romano e O. Tagliatela-Scafati. "*Artarborol, a nor-Caryophyllane Sesquiterpene Alcohol from Artemisia arborescens. Stereostructure Assignment through Concurrence of NMR Data and Computational Analysis.*". *Organic Letters* **2007**, Vol. 9, No.12, 2377-2380.

II. GLI ORGANISMI MARINI

Da tempo numerosi invertebrati marini, principalmente le spugne e, in secondo luogo gorgonie e soft corals, rappresentano organismi di grande interesse dal punto di vista farmaceutico. Molte specie possono contenere sostanze tossiche la cui funzione è quella di scoraggiare eventuali predatori; a questo proposito altri organismi marini traggono vantaggio da questa caratteristica “caricandosi” sul proprio corpo spugne e coralli. Alcune di queste sostanze chimiche prodotte sono utili per alcune patologie umane (respiratorie, cardiovascolari, etc.). Per tale motivo, l’analisi del metabolismo secondario di tali organismi, che ha rappresentato l’oggetto del mio lavoro di dottorato, risulta essere di particolare interesse.

II. A. LE SPUGNE

I poriferi, comunemente noti come spugne, rappresentano uno dei più primitivi organismi pluricellulari. Le spugne presentano, infatti, un’organizzazione con diversi tipi di cellule immerse in una matrice gelatinosa (mesoglea), ciascuna specializzata per una specifica funzione, ma cellule simili non sono organizzate a formare strutture assimilabili a tessuti; di conseguenza non possiedono organi, capo o cavità gastrale e si ipotizza una loro origine filogeneticamente indipendente dagli altri animali.

Il phylum *Porifera* è composto esclusivamente da specie acquatiche filtratrici, che conducono vita sessile ancorandosi ad altri organismi come conchiglie e granchi. Presentano forma variabile (incrostante, mammellonata, arborea) e dimensioni comprese fra pochi millimetri e un metro e sono specie in prevalenza marine, diffuse in tutti i fondali, dai tropici ai poli, fino a profondità abissali. Le spugne d’acqua dolce, rappresentate dalle Demospongiae appartenenti alla famiglia Spongillidae, abitano i fiumi ed i laghi di tutti i continenti escluso l’Antartide, fino ad altitudini di 2000 metri.

I poriferi possono avere vita solitaria o costituire dense colonie che diventano importanti habitat per animali e vegetali. Infatti, le loro cavità possono ospitare numerosi organismi simbiotici come piccoli crostacei, larve di insetti, alghe unicellulari,

cianobatteri ecc. e molti sono gli animali che si nutrono di essi (pesci, molluschi, echinodermi).

Alcune spugne, le cosiddette “spugne perforanti” trascorrono la loro vita nel perforare, tritare e disgregare tutto ciò sia fatto di carbonato di calcio, in processi che possono durare anni e causare la morte di organismi quali molluschi e madrepora. Esse hanno la capacità di bucare i substrati carbonatici e minerali presenti nell’ambiente marino. Il substrato può essere costituito, oltre che da fondali rocciosi, anche da conchiglie di molluschi, alghe corallinacee e scheletri calcarei di madrepora e coralli. La perforazione avviene per mezzo di secrezioni acide che permettono alla spugna di creare una complessa rete di camere e gallerie all’interno delle quali avviene lo sviluppo. Dopo essersi fissata al substrato calcareo, la larva di spugna inizia a scavare una serie di gallerie, di forme e dimensioni variabili nelle diverse specie, aderendo molto fortemente con i suoi tessuti alle pareti calcaree.



Alcuni esemplari di spugne.

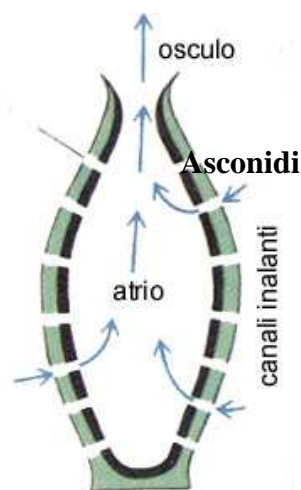
La struttura base delle spugne è un sacco con un'apertura principale, l'*osculo*, e numerosi pori chiamati *ostii*, canali e camere attraverso i quali scorre l'acqua.

Questi organismi non possiedono veri tessuti, ma rappresentano piuttosto un assemblamento di cellule uguali che tendono ad avere metabolismo comune e sono prive di un sistema nervoso. In effetti, la parete delle spugne è formata da due strati cellulari simili a tessuti: il *coanoderma* e il *pinacoderma*. Il coanoderma è lo strato interno costituito da cellule flagellate (coanociti) che svolgono un ruolo fondamentale, sia per la riproduzione sessuale che per l'alimentazione, la quale avviene per filtrazione di microrganismi e particelle alimentari sospese nell'acqua. Lo strato esterno è invece costituito dal *pinacoderma*, formato dai *pinacociti*, cellule appiattite e strettamente pressate, che svolgono un ruolo di protezione e rivestimento.

Tra i due strati è presente uno strato acellulare gelatinoso, il *mesoilo*, in cui si trovano cellule ameboidi, le cellule che producono i gameti e l'endoscheletro.

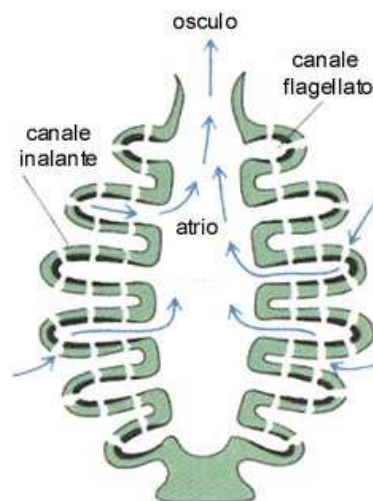
L'endoscheletro può essere costituito da calcare, silice o da un materiale corneo detto spongina, un composto organico affine alla chitina, al collagene ed anche alla cheratina, le cui fibre sono prodotte dagli spongioblasti e conferiscono all'organismo una notevole elasticità e deformabilità che consente loro di adattare la propria forma a quelle del substrato su cui vivono.

Le spugne calcaree, più semplici (*Asconidi*), presentano piccoli vasi o tubi, la cui cavità interna (*spongocele*) si apre all'esterno tramite un'ampia apertura apicale detta *osculo* ed una fitta serie di pori (da cui deriva il loro nome di poriferi) lungo la superficie esterna.



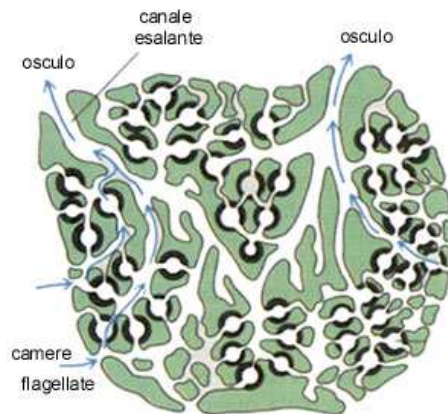
Asconidi

La suddetta struttura impone, tuttavia, delle limitazioni nelle dimensioni della spugna: infatti, se il volume dello spongocoele aumenta, la superficie flagellata non aumenta in modo proporzionale e, come risultato, una grossa spugna asconide conterrebbe più acqua di quanto i suoi coanociti potrebbero filtrare. Pertanto, nel corso dell'evoluzione di questo gruppo, il problema è stato risolto con la comparsa di numerose evaginazioni esterne dello strato flagellato (canali flagellati) in modo da aumentarne la superficie di assorbimento, ed invaginazioni della superficie esterna (canali inalanti). La prima tappa di questo processo si riscontra nelle spugne "Siconidi", con endoscheletro siliceo. Si tratta di spugne anch'esse con corpo tubulare, con un singolo "osculo", rivestito di coanociti con cavità spongocelica più ristretta del caso precedente ed attraversato da pori che penetrano più in profondità, formando un sistema di numerosi, semplici canali (canali inalanti e canali flagellati).



Siconidi

Le spugne cornee hanno una struttura ancora più complessa, detta *leukon*. Sono infatti di grandi dimensioni e costituite da una superficie dello strato flagellato ulteriormente accresciuta per la formazione di un elevato numero di camerette flagellate, all'interno delle quali sono localizzati i coanociti. In questo tipo di spugne il numero di camerette flagellate è molto elevato e consente una elevata capacità di filtrazione.



Leuconidi

Lo scheletro delle spugne calcaree e silicee è formato da *spicole* prodotte da speciali cellule, gli scleroblasti, e distinte in macrosclere e microsclere. Le macrosclere hanno una forma molto varia e costituiscono un elemento molto utile per il riconoscimento delle varie specie; formano inoltre l'apparato di sostegno vero e proprio. Le microsclere assolvono funzioni secondarie come la protezione della superficie e la coesione delle macrosclere. La forma più semplice di spicola è quella a bastoncino (monoassona), ma ve ne sono di complessità via via crescente, da quelle a forma di Y a quelle a forma di stelle, asterischi e così via.



Spicole al microscopio

Le spugne si riproducono sia sessualmente che asessualmente. Molti poriferi sono ermafroditi, altri possono essere dioici. La riproduzione asessuale avviene mediante produzione di gemme esterne o interne (gemmule) che possono sopravvivere anche a condizioni molto sfavorevoli, impedendo alla spugna di morire.

I Poriferi si suddividono in quattro classi:

- Calcarea (Calcispongiae)
- Hexactinellida (Hyalospongiae)
- Demospongiae
- Sclerospongiae

Le Calcispongiae (spugne calcaree) sono spugne esclusivamente marine, con scheletri calcarei. Le loro spicole sono costituite da carbonato di calcio, sono strutturalmente semplici e possono presentare al massimo quattro raggi (tetractine). I rappresentanti di questa classe sono di piccole dimensioni, hanno forma tubulare o di piccoli vasi e presentano organizzazione interna di tipo ascon, sycon o leucon.

Le Hexactinellida (Hyalospongiae), dette anche “spugne vetrose” a causa del loro scheletro siliceo, sono tutte marine, di acque profonde, e caratterizzate da un corpo cilindrico o imbutiforme. Le loro spicole, riunite a formare un reticolo complesso, sono del tipo esactina (sei punte), l'organizzazione è del tipo sycon o leucon. Numerose spugne vetrose hanno forma di coppa o di vaso e possono raggiungere un'altezza compresa tra i 10 e i 100 cm. La maggior parte si rinviene a profondità comprese tra i 200 e i 2000 metri.

Le Demospongiae comprendono la maggior parte delle specie di spugne (circa il 90%) ed includono sia forme marine che dulciacquicole. Il loro scheletro è composto di spicole silicee (non esactine), in alcune forme parzialmente o completamente sostituite da elementi scheletrici costituiti di spongina. L'organizzazione interna, molto evoluta, è del tipo leucon. Numerose Demospongiae sono vivacemente colorate. Le poche specie di acqua dolce (*Ephydatia*, *Spongilla*), come pure le più comuni spugne marine (*Haliclona*, *Verongia*, *Cliona*, *Microciona*), appartengono a questa classe.

Le Sclerospongiae, da alcuni autori incluse nelle Demospongiae, presentano massicci scheletri carbonatici basali, spicole silicee e fibre di spongina come nelle Demospongiae. Il loro corpo è appiattito, con organizzazione leuconide. Si rinvencono in ambiente marino, di preferenza in cavità marine, gallerie o associate alle barriere coralline.

II. B. GORGONIE E CORALLI MOLLI

Le gorgonie sono animali che caratterizzano l'ambiente delle scogliere profonde, un elemento dominante nelle acque del Nord Sulawesi come in molte altre zone del mondo. Con il termine generico di gorgonie, si indicano tutti gli ottocoralli dotati di uno scheletro corneo; si tratta di animali con una struttura di base molto semplice, primitiva, con due caratteristici stadi di crescita: polipo e medusa. Il tipico polipo ha una colonna cilindrica che termina con una bocca circondata da otto tentacoli pinnati.

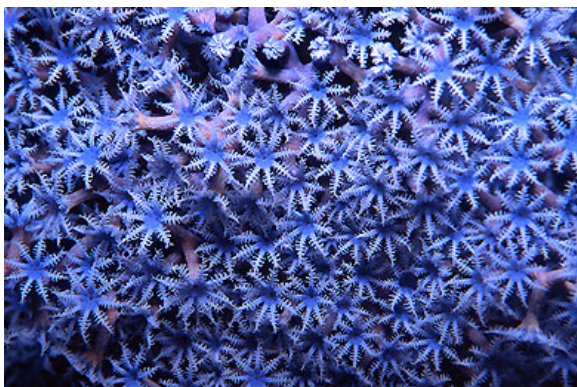
L'anatomia interna è ridotta a una cavità intestinale (mesenterio), con una tipica apertura (la bocca). Lo scheletro con un asse di consistenza cornea è formato in prevalenza da una proteina detta gorgonia; esso è rivestito di un tessuto molle detto cenenchima, nel quale i polipi possono ritrarsi. Il cenenchima ha una consistenza più o meno fibrosa per la presenza di scleriti calcarei. La struttura scheletrica è di solito nera all'interno, ma assume vivacissime colorazioni sulla corteccia. L'architettura tipica delle grandi colonie di gorgonie è a ventaglio, con tutte le ramificazioni su un unico piano e la colonia può raggiungere dimensioni di 3 m di diametro e oltre. In una colonia esiste una comunicazione tra i diversi polipi, che scambiano tra loro sostanze nutritive, ma anche informazioni; se una punta di un ramo viene disturbata, l'intera colonia reagisce chiudendo i polipi.

Le gorgonie appartengono alla classe Anthozoa, sottoclasse Octocorallia, ordine Alcyonacea, anche se in precedenza erano considerate appartenere ad un ordine diverso (Gorgonacea); anche la maggior parte di quegli organismi chiamati coralli molli appartengono all'ordine Alcyonacea.

Le varie specie possono differenziarsi anche molto: la gorgonia bianca (*Eunicella singularis*) ha corpo molle, ruvido e gibboso e preferisce l'ombra; la muricea (*Paramuricea camaleon*) forma colonie vistosissime (violacee, rossastre e a volte gialle), grandi e robuste e vive in acque profonde oltre i 20 metri; la gorgonia rossa (*Paramuricea clavata*) forma colonie a ventaglio alte fino ad un metro ed è esclusiva del Mar Mediterraneo; la gorgonia verrucosa (*Eunicella verrucosa*), abbastanza rara, è bianco-candida e arborescente.

Il corallo rosso del Mediterraneo, *Corallium rubrum*, è una gorgonia.

Le gorgonie vivono in maggioranza fissate alle rocce sfruttando le correnti marine per cibarsi e per disseminare le larve, che non hanno lo stadio di medusa e vivono un po' in tutti gli ambienti, anche se sono predominanti e raggiungono la massima diversità lungo il reef profondo. In maggioranza sono organismi sciafili, con l'eccezione di alcune specie zooxantellate. Queste ultime, per trarre vantaggio dall'attività di fotosintesi delle alghe simbiotiche, vivono in acque poco profonde e ben illuminate. Si nutrono da filtratori passivi, catturando con i tentacoli particelle dall'acqua. La colonia cresce di solito estendendo le proprie ramificazioni a formare un ventaglio planare perpendicolare alle correnti dominanti. La rete formata dalle ramificazioni intercetta le correnti, le smorza determinando dei vortici di acqua a valle della colonia, che riportano ai polipi le particelle di cibo.



Alcuni esemplari di gorgonie

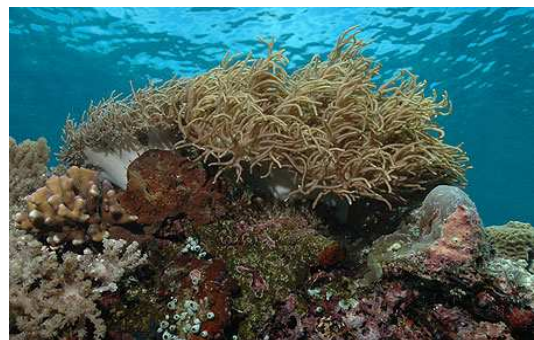
La maggior parte delle gorgonie ha colonie a sessi separati (colonie maschio e colonie femmina). In alcuni casi uova e spermatozoi sono emessi simultaneamente e la fecondazione è esterna, ma nella maggior parte delle specie, la femmina capta gli spermatozoi, e le uova sono incubate nella colonia femminile. Dall'uovo fecondato si sviluppa in tutti i casi una larva natante, che si allontana dalla colonia madre, si fissa e dà origine a un nuovo polipo fondatore.

La propagazione asexuale, per frammentazione delle colonie, non è molto comune tra le gorgonie.

Tuttavia, ad esempio *Junceella fragilis*, amputa la parte terminale della ramificazione che si fissa in fondo e cresce in una nuova colonia.

I coralli molli, che secondo la sistematica moderna appartengono allo stesso ordine delle Gorgonie (Alcyonacea), si distinguono per avere scheletro sprovvisto di una struttura assile proteica, e quindi che si tiene in piedi solo grazie all'impalcatura degli scleriti e alla pressione interna dell'acqua.

A dispetto dell'importanza che questi animali hanno nell'ambiente del reef profondo, la loro sistematica è pochissimo conosciuta.



Alcuni esemplari di soft corals.

Le specie più conosciute sono le *Dendronephtya* e la *Scleronephtya*. La loro struttura è arborea ed hanno il corpo traslucido che permette di vedere spicole calcaree all'interno. Altre specie molto presenti alle Maldive, ad esempio, sono il *Litophytum arboreum*, simile alle specie precedenti tranne per il fatto che il corpo non è traslucido, ed il *Sarcophyton* che è invece simile ad una spugna e di colore grigio-verde.

III. TECNICHE PER LA DETERMINAZIONE STEREOSTRUTTURALE

III. A. TECNICHE DI DETERMINAZIONE STRUTTURALE

III. A.1 SPETTROMETRIA DI MASSA

La spettrometria di massa è una tecnica analitica di delucidazione strutturale basata sulla ionizzazione di una molecola e sulla sua successiva frammentazione in ioni di diverso rapporto massa / carica (M/z).

A differenza delle tecniche spettroscopiche, però, questo è un metodo d'analisi distruttivo (la molecola non rimane intatta dopo l'analisi) e soprattutto non si basa sull'interazione tra radiazioni e materia.

Il principio su cui si basa è il seguente: una molecola è ionizzata per espulsione di un elettrone; il catione radicalico che si forma (*ione molecolare*) in parte si frammenta dando molecole e/o radicali neutri (che lo strumento non rileva), in parte generando cationi e/o radicali cationi (*ioni frammento*). Lo ione molecolare e i vari ioni che si originano per frammentazione (cationi e radicali cationi), vengono discriminati sulla base del loro rapporto massa/carica e rivelati da un detector.

L'esperimento di spettrometria di massa consiste dunque nella *ionizzazione* di molecole in fase gassosa, nella *separazione* dei diversi ioni prodotti e nella loro *rivelazione*.

Il risultato dell'esperimento è lo spettro di massa, che rappresenta l'abbondanza relativa degli ioni in funzione del loro rapporto massa/carica.

Questa tecnica consente di misurare le masse molecolari (sia nominali che esatte) e di ottenere dei profili di frammentazione che sono specifici per ciascun composto, di cui costituiscono quindi un'impronta digitale.

Si può così individuare la formula molecolare di composti sconosciuti, anche avendone a disposizione piccole quantità.

Il FAB (*Fast Atomic Bombardment*) e l'ESI (*ElectroSpray Ionization*) sono tra le tecniche di spettrometria di massa più utilizzate.

Le molecole polari con pesi molecolari fino a 10000 Da possono essere analizzate mediante la tecnica FAB. La frammentazione è provocata mediante “bombardamento con atomi veloci”: il fascio che bombarda è costituito da atomi di xenon ad elevata energia traslazionale. Questo fascio è prodotto da una prima ionizzazione di atomi di xenon mediante elettroni, a dare radicali cationi di xenon. I radicali cationi vengono accelerati a 6-10 keV, generando radicali cationi ad alta energia traslazionale che attraversano lo xenon. Durante questo passaggio lo xenon carico ad alta energia acquista elettroni dagli atomi di xenon trasformandosi in xenon neutro ad alta energia e i cationi radicali di xenon vengono rimossi da un campo elettrico. Il composto in esame viene disciolto in un solvente viscoso altobollente e viene ionizzato dal fascio di atomi di xenon ad alta energia. Con questa tecnica di solito lo ione molecolare non viene osservato, ma gli addotti come $[M + H]^+$ sono pronunciati. Altri ioni addotti possono formarsi da impurezze saline, o per aggiunta di sali come NaCl o KCl, che producono i picchi $[M + Na]^+$ e $[M + K]^+$.

La ionizzazione elettrospray (ESI) prevede l'applicazione di una tensione ionizzante lungo l'ago nebulizzatore. Si ha la formazione di una nebulizzazione molto fine, da cui il solvente può essere facilmente rimosso. A questo punto le particelle vengono ionizzate da una scarica a corona a pressione atmosferica e trascinate da un piccolo potenziale elettrico attraverso un minuto orifizio verso il magnete analizzatore.

Questa tecnica è ampiamente utilizzata per biomolecole idrosolubili come peptidi, proteine e carboidrati, ma attualmente il suo uso sta diventando sempre più universale. Il risultato è uno spettro i cui picchi maggiori sono dovuti allo ione molecolare recante diverse cariche. La ESI è una delle molteplici varianti dell' *atmospheric pressure ionization* (API) applicata tra l'uscita di una unità HPLC e l'ingresso di uno spettrometro di massa.

III. A. 2 SPETTROSCOPIA NMR

La Spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare è basata sulla perturbazione del livello di energia del nucleo della materia sotto l'effetto di un campo magnetico esterno. In dettaglio, l'energia è assorbita dalla sostanza quando è soggetta ad una azione combinata di due campi magnetici, uno forte e costante e l'altro debole e variabile, in

particolare di una radiofrequenza. Poichè l'effetto combinato dei due campi causa una perturbazione nello stato di energia dei nuclei, che dipende sia dal tipo dei nuclei atomici contenuti nella sostanza che dal loro stato chimico, la risonanza magnetica nucleare è un valido mezzo per lo studio delle interazioni tra nucleo e substrato.

La Spettroscopia NMR offre innumerevoli possibilità di utilizzo ed è considerata uno dei più importanti attrezzi fisici a disposizione del chimico organico; nella sua evoluzione si è anche rivelata un valido aiuto nei campi della biologia, biochimica e farmacologia soprattutto per l'analisi strutturale di importanti molecole.

La possibilità di osservare, oltre a ^1H , altri nuclei come ^{13}C , ^{15}N e ^{31}P , fa della spettroscopia NMR, la tecnica più potente e versatile a disposizione dei chimici e dei biochimici per ottenere informazioni sulla struttura dei composti, anche con elevato peso molecolare, e per comprendere in profondità i processi biologici ed i meccanismi di reazione.

Strumenti tecnologicamente molto sofisticati ed ad alto campo, l'impiego di sequenze bi- e tridimensionali, consentono lo studio di biomolecole strutturalmente molto complesse come proteine e polisaccaridi. Le informazioni ottenute mediante la spettroscopia NMR, insieme a studi di modellistica molecolare, consentono sia l'analisi conformazionale dettagliata di tali molecole in soluzione, sia la determinazione delle loro conformazioni bioattive.

La spettroscopia NMR permette di distinguere i diversi nuclei atomici sulla base delle loro proprietà magnetiche mediate dall'intorno chimico; permette di misurare distanze inter-protoniche e di misurare gli angoli diedri dei legami covalenti. Lo scopo dell'NMR è sostanzialmente ricavare informazioni sulla frequenza di risonanza dei nuclei attivi. Esistono due metodi per ricavare quest'informazione. Nella spettroscopia NMR *ad onda continua*, una elettrocalamita genera il campo magnetico necessario ad indurre lo *splitting* tra i livelli energetici degli atomi attivi nel campione in esame. Contemporaneamente, un emettitore di onde elettromagnetiche lo bombarda ad una frequenza ben precisa. Il campo magnetico della calamita viene quindi incrementato passo passo: un rivelatore registra l'assorbanza del campione ad ogni intensità di campo, ovvero quanta parte della radiazione incidente si perde al passaggio attraverso il mezzo.

La frequenza di risonanza di un nucleo attivo è direttamente proporzionale al campo applicato: mano a mano che il campo aumenta, crescono anche le frequenze di

risonanza. Quando le frequenze di risonanza diventano pari a quella incidente (che invece è costante), allora tutti gli atomi capaci di farlo, assorbiranno quanti di energia, e l'assorbanza misurata sarà più alta.

Il secondo metodo, usato dagli spettrometri più moderni, consiste nel mantenere costante il campo, incrementando invece la frequenza della radiazione incidente.

La maggior parte degli spettri utili per la determinazione strutturale dei composti isolati ricade nella categoria dell'NMR bidimensionale.

Lo spettro ^1H NMR è un grafico dell'intensità contro la frequenza; si tratta di un grafico a due dimensioni ma è chiamato esperimento monodimensionale 1-D, in quanto esiste un'unica dimensione (asse delle frequenze). L'asse delle frequenze deriva dall'asse dei tempi (tempo di acquisizione) del FID attraverso il processo matematico detto "trasformata di Fourier". Quindi, da un punto di vista sperimentale, la variabile dell'ascissa in un esperimento 1-D è il tempo. Il cosiddetto spettro NMR bidimensionale 2-D è in realtà un grafico a tre dimensioni; in tutti gli esperimenti NMR la dimensione omessa è sempre l'intensità. Le due dimensioni a cui si fa riferimento in un esperimento 2D NMR sono entrambe assi delle frequenze. Un esperimento di questo tipo richiede due trasformate di Fourier ortogonali tra di loro su due assi dei tempi indipendenti, per arrivare a due assi delle frequenze perpendicolari. Nell'esperimento a singolo impulso vi è un unico fattore tempo che influenza lo spettro, e cioè il tempo di acquisizione t_2 . In una sequenza multi-impulso invece, il periodo di equilibrizzazione è seguito da due impulsi (tra i quali è interposto un intervallo di tempo) l'ultimo dei quali è l'impulso di acquisizione a $\pi/2$. Viene pertanto inserito un periodo di "evoluzione" tra gli impulsi. Facendo variare questo intervallo di tempo (t_1) in una serie di esperimenti diversi ed unendo i FID risultanti in un unico esperimento complessivo, si hanno le basi di un esperimento bidimensionale. La prima serie di trasformate di Fourier produce il secondo asse delle frequenze derivato dal tempo di acquisizione t_2 di ciascun FID. I dati vengono ruotati di 90° e viene condotta una seconda trasformata di Fourier che risulta essere ortogonale alla prima serie di trasformazioni. Questa seconda serie di trasformate di Fourier produce il primo asse delle frequenze, una funzione del tempo di evoluzione t_1 . La sequenza di impulsi consiste in un impulso a $\pi/2$, un intervallo di tempo t_1 , un secondo impulso di acquisizione a $\pi/2$ e l'intervallo di acquisizione t_2 . Questa sequenza di impulsi viene ripetuta un certo numero di volte con intervalli t_1 crescenti.

COSY SPECTRUM (CORrelation SpectroscopY)

Una delle più importanti tecniche NMR bidimensionali è l'esperimento ^1H - ^1H COSY¹, esperimento che consente di osservare accoppiamenti scalari tra i protoni. Esso è un esperimento di correlazione omonucleare di *chemical shift* attraverso l'accoppiamento scalare spin-spin a due ($^2J_{\text{H-H}}$) o tre legami ($^3J_{\text{H-H}}$).

Nello spettro COSY appaiono due tipi principali di segnali: 1) I picchi diagonali che rappresentano lo spettro originale, così come ottenuto in un esperimento monodimensionale; 2) I picchi fuori diagonale chiamati "picchi di correlazione", che dimostrano la presenza di accoppiamenti scalari (attraverso i legami) tra i nuclei. I segnali accoppiati possono essere individuati tracciando linee orizzontali e verticali a partire dal picco di correlazione fino ad intersecare la diagonale.

La sequenza ordinata delle correlazioni è utilizzata per definire sistemi di spin, ovvero strutture parziali della molecola in esame, i cui termini sono costituiti da atomi di carbonio quaternari o da eteroatomi.

TOCSY (Relayed Coherence Transfer)

E' possibile far propagare la magnetizzazione al di là degli spin direttamente accoppiati attraverso un esperimento TOCSY, così da permettere l'osservazione di correlazioni tra i nuclei che non sono direttamente accoppiati, ma che fanno parte dello stesso sistema di spin. La sequenza di impulsi per un esperimento 2D-TOCSY somiglia al prototipo di un normale esperimento 2-D, ma in luogo di un secondo impulso a $\pi/2$, viene inserito un periodo di mescolamento (mixing time) durante il quale la magnetizzazione è bloccata (spin locked) sull'asse y. Durante questo periodo la magnetizzazione si propaga da uno spin al suo vicino, poi al vicino successivo e così via. Più è lungo il periodo di mescolamento, maggiore sarà, almeno in teoria, la propagazione attraverso l'intero sistema di spin. L'aspetto di un esperimento TOCSY è simile al COSY. La differenza consiste nel fatto che i picchi di correlazione COSY sono prodotti da spin accoppiati, mentre i corrispondenti picchi di un TOCSY traggono origine da un trasferimento di coerenza di spin propagato. In un esperimento TOCSY, per periodi di mescolamento piuttosto lunghi, tutti gli spin all'interno di un sistema sembrano essere accoppiati.

Ciascun esperimento bidimensionale possiede un analogo monodimensionale. Nel TOCSY 1-D (chiamato HOHAHA²: *HO*monuclear-*HA*rtmann-*HA*nn) viene irradiata una risonanza protonica selezionata; viene concesso un periodo di mescolamento appropriato, affinché la magnetizzazione possa propagarsi e, durante questo periodo, viene applicato lo spin-locking. Dopo aver acquisito lo spettro monodimensionale, i soli segnali che saranno registrati saranno quelli relativi ai nuclei su cui è stata trasferita la magnetizzazione e pertanto tutti i segnali che saranno al di fuori del sistema di spin non appariranno.

HSQC e HMQC

Gli esperimenti HSQC³ (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*) ed HMQC⁴ (*Heteronuclear Multi Quantum Correlation*) correlano i nuclei ¹³C con i protoni direttamente legati ad essi, cioè accoppiati. Si tratta di un accoppiamento tramite un solo legame (¹J_{CH}). In questo tipo di esperimenti, l'asse F1, che deriva dal nostro intervallo di tempo incrementale t_1 , è l'asse dei protoni. L'asse F2, che deriva da t_2 , è l'asse del carbonio. Durante l'acquisizione viene applicato un disaccoppiamento a banda larga nel canale del protone, in modo che i segnali del carbonio ottenuti in ciascun FID siano dei singoletti. Essendo esperimenti di accoppiamento eteronucleari non esiste una diagonale, né simmetria.

L'inconveniente di HSQC ed HMQC è che, a causa della bassa abbondanza isotopica del ¹³C (1,1 %), solo la piccola percentuale di protoni legati direttamente ad un carbonio ¹³C fornisce informazioni utili, mentre vanno eliminati tutti i segnali relativi ai protoni legati a carboni ¹²C. Tuttavia, poiché quest'ultimo rappresenta la gran parte del segnale totale, la sua completa eliminazione è piuttosto difficile, ed anche una eliminazione incompleta può lasciare un segnale residuo sufficiente a coprire tutti i picchi di correlazione.

L'esperimento HMBC⁵ (*Heteronuclear Multi Bond Correlation*) si basa su accoppiamenti ¹H-¹³C attraverso due o tre legami (*long range*) offrendo uno spettro estremamente diagnostico che consente di connettere tra di loro le subunità della struttura molecolare individuate attraverso l'analisi degli altri spettri bidimensionali. In sintesi è possibile ottenere indirettamente delle correlazioni carbonio-carbonio e, per di

più, tale esperimento consente di correlare carboni quaternari (non visibili negli esperimenti HSQC e HMQC) con protoni ad essi vicini.

III. B. TECNICHE PER LA DETERMINAZIONE DELLA STEREOCHIMICA

La determinazione della configurazione relativa ed assoluta di una sostanza naturale rappresenta una tappa chiave nel processo di caratterizzazione strutturale della stessa. Solo conoscendo la stereochimica di una molecola è possibile risalire al suo assetto tridimensionale ed approcciare studi di tipo biologico, come ad esempio studi di interazione farmaco-recettore, o di tipo chimico, come gli studi relativi alla sintesi totale di molecole complesse con una buona attività farmacologica.

La maggior parte dei composti di origine naturale presenta uno o più centri stereogenici. Di solito, nella determinazione della stereochimica, si procede prima con lo stabilire la configurazione relativa dei centri chirali. Se, applicando specifiche metodologie, si riesce a stabilire una stereochimica relativa unica, mettendo in relazione tutti i centri chirali della molecola, è sufficiente la determinazione di un solo centro stereogenico per ottenere la configurazione assoluta di tutta la struttura. Se, invece, sono state determinate n stereochimiche relative, non correlabili tra loro, per ciascuna substruttura bisognerà assegnare indipendentemente la configurazione assoluta.

Attraverso la spettroscopia NMR è possibile ottenere importanti informazioni sull'assetto tridimensionale delle molecole, soprattutto in sistemi rigidi.

I parametri più significativi nella determinazione della configurazione relativa attraverso l'NMR sono: i valori dei chemical shifts (δ), le costanti di accoppiamento (J) e gli effetti NOE.

I chemical shifts dei protoni sono influenzati dal loro intorno chimico, pertanto i protoni di due diastereoisomeri risentono di un intorno chimico differente.

Nell'ambito della spettroscopia NMR, possono essere ottenute numerose informazioni sulla stereochimica relativa di una molecola organica dallo studio dei valori delle costanti di accoppiamento (J_{H-H}). Infatti la legge di Karplus⁶:

$${}^3J = A\cos\theta^2 + B\cos\theta + C$$

evidenza che il valore di tali costanti, sia omonucleari, ${}^3J_{\text{H-H}}$, che eteronucleari, ${}^3J_{\text{C-H}}$, dipende dall'angolo diedro θ tra gli atomi accoppiati. I valori di ${}^3J_{\text{H-H}}$ sono molto piccoli, circa 0-1,5 Hz, quando θ è circa 90° , mentre essi sono generalmente piuttosto grandi quando θ è intorno a 0° o 180° , generalmente J_{180° è maggiore di J_{0° . Di conseguenza è possibile distinguere facilmente una relazione assiale-assiale tra due protoni di un ciclo a sei termini, ${}^3J_{\text{a-a}} \sim 7-9$ Hz, rispetto a quella assiale-equatoriale e a quella equatoriale-equatoriale, ${}^3J_{\text{a-e}} \sim {}^3J_{\text{e-e}} \sim 2,5$ Hz. Inoltre è possibile discriminare facilmente la relazione *cis-trans* tra i protoni di un doppio legame, ${}^3J_{\text{cis}} \sim 6-12$ Hz, ${}^3J_{\text{trans}} \sim 14-20$ Hz.

Altre importanti informazioni riguardanti la stereochimica, in particolare la configurazione relativa dei centri stereogenici di una molecola, possono essere ottenute dallo studio degli accoppiamenti omonucleari tra protoni spazialmente vicini (accoppiamento dipolare) e non necessariamente accoppiati attraverso i legami (accoppiamento scalare).

Mentre si registra lo spettro si può irradiare un segnale con una radiazione corrispondente alla sua frequenza di risonanza. Se l'intensità della radiazione è sufficientemente alta, il segnale si "satura", scomparendo dallo spettro. La saturazione del segnale ha due conseguenze notevoli:

- a) gli accoppiamenti degli altri protoni presenti sulla molecola con il protone irradiato scompaiono (tecnica di disaccoppiamento); questa tecnica permette di semplificare i multipletti complessi determinati da più accoppiamenti.
- b) La velocità di rilassamento di protoni spazialmente vicini a quello irradiato aumenta (l'aumento diminuisce con la distanza alla sesta potenza). Questo effetto favorisce il ripristino della popolazione di Boltzmann, cioè favorisce il ritorno dei nuclei allo stato fondamentale, e si traduce in un aumento dell'intensità del segnale⁷ (**effetto n.O.e.:** "Nuclear Overhauser Enhancement"). L'effetto può essere utilizzato per stabilire una relazione spaziale tra i sostituenti di una molecola, a patto che la molecola abbia una certa rigidità.

Le intensità delle interazioni dipolari NOE sono fortemente dipendenti dalla dimensione della molecola, infatti al crescere delle dimensioni della molecola gli accoppiamenti NOE sono prossimi allo zero, e quindi difficilmente evidenziabili. Per superare questo limite si può utilizzare l'esperimento ROESY (Rotating-frame Overhauser Effect

SpettroscopY) un esperimento bidimensionale di correlazione omonucleare, basato sul fenomeno ROE (Rotating-frame Overhauser Effect). Il ROE è un fenomeno simile al NOE, che però può essere messo in evidenza solo con esperimento 2D e, al contrario del NOE, è sempre positivo.

III. B.1 METODO DI MURATA

L'impiego delle costanti di accoppiamento $^3J_{\text{H-H}}$ e delle correlazioni ROESY è limitato generalmente a sistemi rigidi, ciclici o in cui l'elevato numero di interazioni deboli limita la possibilità di movimenti conformazionali, per i quali gli angoli diedri e le distanze interatomiche tra i protoni sono rigidamente fissati. Tuttavia numerosi prodotti naturali biologicamente attivi, spesso possiedono strutture lineari o macrocicliche flessibili cui l'applicazione di questi parametri fornirebbe dati di ambigua interpretazione.

E' stato proposto recentemente da Murata e collaboratori⁸ un semplice metodo, basato sulle costanti di accoppiamento omo ed eteronucleari, che può, in casi specifici, come quelli in cui i centri chirali sono costituiti da carboni metinici leganti atomi di ossigeno, essere utilizzato per determinare la stereochimica relativa dei sistemi flessibili. Tale metodo si basa sulla teoria che, nei sistemi aciclici, la conformazione dei centri asimmetrici adiacenti è rappresentata da rotameri sfalsati preferenziali, e la loro stereochimica relativa può essere determinata usando le costanti di accoppiamento protone-carbonio, $^{2,3}J_{\text{H-C}}$, e le costanti di accoppiamento protoniche vicinali, $^3J_{\text{H-H}}$. Infatti l'uso combinato dei valori di tali costanti, rende possibile l'identificazione del rotamero sfalsato predominante dalle possibili conformazioni *eritro* e *treo*.

Un'accurata misura delle costanti di accoppiamento eteronucleari in esame può essere realizzata con esperimenti NMR bidimensionali. In molti casi è tuttavia sufficiente una valutazione qualitativa delle costanti, realizzata attraverso esperimenti HMBC phase sensitive, che consentono di discriminare tra costanti grandi (large), e costanti piccole (small). Il set di costanti così ottenuto, applicato al modello proposto da Murata, è impiegato per identificare la stereochimica relativa del composto in analisi.

III. B. 2 TECNICHE COMPUTAZIONALI

I dati NMR permettono spesso la determinazione della stereochimica relativa di una molecola organica, sia valutando i valori delle costanti di accoppiamento, sia attraverso esperimenti NOESY e ROESY, che forniscono dati importanti sulle distanze tra i diversi protoni della molecola. Tuttavia può accadere che i risultati ottenuti non permettano una interpretazione semplice ed univoca, rendendo quindi impossibile la determinazione configurazionale, senza sfruttare prima i metodi basati sullo studio conformazionale. I metodi basati su effetti NOE e sui valori delle costanti di accoppiamento sono infatti limitati a sistemi rigidi, ciclici e policiclici, in cui è ridotta la possibilità di movimenti conformazionali. Nel caso di molecole che possiedono strutture lineari o macrocicliche flessibili tali metodi non forniscono un'univoca interpretazione.

Il crescente miglioramento dei computer e la messa a punto di metodi e algoritmi sempre più avanzati ed efficienti, ha portato alla nascita della chimica computazionale, cioè una disciplina che, basandosi su principi quantomeccanici, permette la rappresentazione realistica della struttura tridimensionale di una molecola. Per determinare la conformazione di una molecola, mediante l'uso di un computer e secondo un processo chiamato "minimizzazione", si spostano gli atomi dalle loro posizioni valutando le conseguenti variazioni dell'energia totale del sistema. La geometria che corrisponde alla minima energia è quella più favorita e, quindi, la più rappresentativa della struttura in soluzione. È così possibile confrontare le distanze tra i protoni in diversi stereoisomeri e verificare quali di questi corrisponda ai dati spettroscopici precedentemente ottenuti.

La meccanica molecolare fornisce per ogni molecola l'energia potenziale (detta force field o campo di forze) in funzione della posizione degli atomi.

Il fine di un campo di forza è quello di riuscire a descrivere la conformazione e il comportamento delle molecole, infatti permette di calcolare l'energia di ogni riarrangiamento di atomi in un sistema e permette di valutare come essa cambia al variare della posizione degli atomi. È possibile, così, trovare il punto di minimo di questa funzione, determinando sia la conformazione che l'energia minima. Questo processo è noto come minimizzazione, anche se non porta ad un minimo assoluto, ma solo ad un minimo relativo. La conformazione risultante dal processo di

minimizzazione dipende dalla conformazione di partenza e, di conseguenza, rappresenta il punto di minimo relativo più vicino alla conformazione di partenza. Per trovare il minimo assoluto, in casi semplici, è possibile utilizzare processi noti come ricerche conformazionali (systematic search, random search, simulated annealing). Le informazioni sperimentali sulla conformazione della molecola, principalmente derivanti da esperimenti NMR (effetti NOE), possono essere incluse nel campo di forza per “aiutarlo” a determinare la reale conformazione a bassa energia. È anche possibile studiare il movimento dei nuclei, cioè studiare non solo le conformazioni staticamente, ma anche il movimento che porta al passaggio da una conformazione all'altra, le vibrazioni molecolari; questo tipo di processo è chiamato *dinamica molecolare*, e può essere utile per effettuare ricerche conformazionali, per studiare molecole flessibili, o per produrre strutture tridimensionali in accordo con i dati dedotti da studi NMR. La dinamica molecolare simula il comportamento reale della molecola: essa tende a sistemarsi in conformazioni a bassa energia, ma avendo un certo moto termico, è in grado di superare la barriera di energia che separa una conformazione dall'altra. Tuttavia ci sono dei limiti dato che i computer attuali permettono di effettuare simulazioni lunghe al più qualche nanosecondo, mentre molti cambiamenti conformazionali possono avvenire molto più raramente. Un metodo per superare questa difficoltà è effettuare un esperimento di *simulated annealing*, cioè si sottopone la molecola ad una simulazione di dinamica molecolare iniziando ad alta temperatura e abbassandola gradualmente aspettando del tempo tra una diminuzione e l'altra, fino ad arrivare allo zero assoluto. Nella simulazione ad alta temperatura, la molecola ha modo di muoversi agevolmente tra conformazioni molto diverse tra loro; man mano che la temperatura diminuisce la molecola rimane sempre più bloccata in una stessa conformazione, cioè quella a più bassa energia (o una di quelle a più bassa energia) tra conformazioni molto simili.

Un metodo alternativo e complementare rispetto alla dinamica molecolare per ottenere informazioni dettagliate sulla stereochimica di composti strutturalmente complessi per flessibilità o numero di stereoisomeri, è l'applicazione di metodi basati su calcoli quantomeccanici *ab initio* che permettono la previsione dei chemical shift di protoni e carboni dai valori delle costanti di accoppiamento. Si effettua un confronto tra i dati

sperimentali e quelli teorici ottenuti per confermare l'ipotesi di una struttura o scegliere tra due strutture alternative possibili.

III. B.3 METODO DI MOSHER

Un metodo molto efficiente per la determinazione della configurazione assoluta di composti organici in soluzione, è basato proprio sulle tecniche NMR. Il metodo consiste nella derivatizzazione di un substrato chirale del quale si vuole determinare la configurazione assoluta o la purezza enantiomerica, con i due enantiomeri di un agente derivatizzante chirale e nell'analisi NMR dei due risultanti diastereoisomeri. La configurazione del composto è stabilita sulla base di un modello conformazionale che mette in correlazione tale configurazione con il segno delle differenze osservate per i chemical shifts protonici ($\Delta\delta = \delta_S - \delta_R$) dei sostituenti direttamente legati al centro stereogenico. Di solito la reazione di derivatizzazione utilizzata è una reazione di acilazione e quindi il substrato chirale è un alcol secondario nella maggior parte dei casi, o, un alcol primario con un centro stereogenico in α , un'ammina o un acido carbossilico.

L'agente derivatizzante chirale deve contenere un gruppo funzionale in grado di reagire quantitativamente con il gruppo funzionale del composto da analizzare; deve possedere un sostituente a forte carattere anisotropico e dovrebbe contenere un gruppo polare che possa fissare una conformazione preferenziale. L'agente derivatizzante chirale di gran lunga più utilizzato è il reattivo di Mosher (cloruro dell'acido 2-metossi-2-fenil-2-trifluorometilacetico o MTPA) (**Figura 1**).

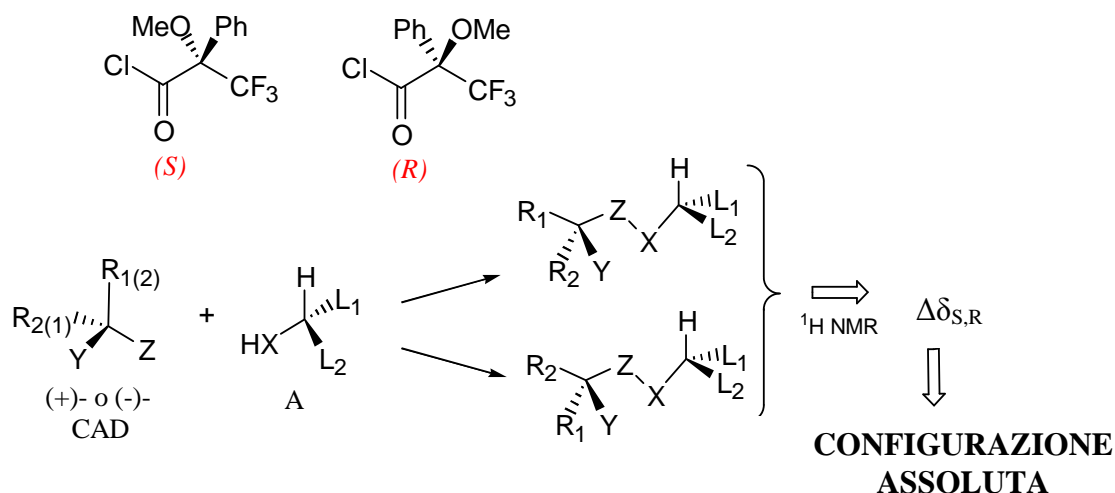


Figura 1. Metodo generale di determinazione della configurazione assoluta attraverso l’NMR.

Sulla base delle osservazioni sperimentali accumulate su una serie di alcoli secondari a configurazione nota, Mosher⁹ osservò che c’era un andamento sistematico dei valori dei chemical shift protonici dei corrispondenti esteri derivatizzati con il reattivo di Mosher. I dati potevano essere razionalizzati ammettendo l’esistenza in soluzione di una conformazione preferenziale, in cui il protone carbinolico, il carbonile estereo ed il gruppo trifluorometilico si trovano sullo stesso piano dell’MTPA.

Se l’MTPA estere si trova nella conformazione ipotizzata, Mosher osservò che i valori dei protoni H_A vicino al centro carbinolico chirale, nell’(S)-MTPA devono essere più alti dei corrispondenti valori osservati per l’(R)-MTPA.

Una revisione del metodo di Mosher da parte di Kakisawa e Kashman,¹⁰ indicato come metodo di Mosher modificato, è quella che viene utilizzata attualmente per la determinazione della configurazione assoluta di alcol secondari chirali. I principi guida del metodo di Mosher modificato sono gli stessi proposti originariamente da Mosher, solo che, grazie alle moderne tecnologie, si cerca di assegnare il maggior numero possibile di risonanze protoniche dei gruppi adiacenti al centro carbinolico. Una volta assegnate le risonanze, per ciascuno dei due esteri diastereoisomerici, si calcolano i valori di $\Delta\delta$, per convenzione riportati come $\delta_S - \delta_R$. Se l’estere assume la conformazione preferenziale riportata (**Figura 2**), si osserva che tutti i protoni localizzati alla sinistra del piano dell’MTPA avranno valori $\Delta\delta < 0$, mentre quelli a destra avranno valori $\Delta\delta > 0$.

Se questa condizione è rispettata, la configurazione assoluta sarà indicata dal modello A.

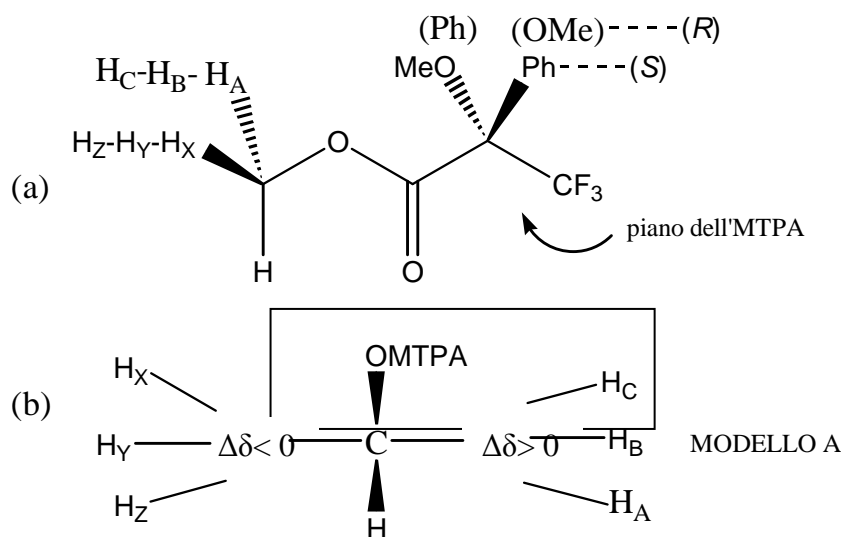


Figura 2. a) Conformazione preferenziale dell'estere di Mosher. b) Modello empirico proposto da Mosher per la determinazione della configurazione assoluta di alcoli secondari.

Questo metodo presenta alcuni svantaggi: alcuni alcoli stericamente impediti non si esterificano, in alcuni casi l'estere non assume la conformazione ideale prevista dal modello A o non si verifica un andamento sistematico dei valori di $\Delta\delta$.

III. B. 4 METODO DI NAKANISHI

Harada e Nakanishi hanno sviluppato un metodo non empirico (che non richiede la correlazione con composti a configurazione nota) detto "regola del dibenzoato chirale" che consente la determinazione della configurazione assoluta di 1,2-glicoli dall'analisi dello spettro CD (dicroismo circolare) dei corrispondenti derivati dibenzoati.

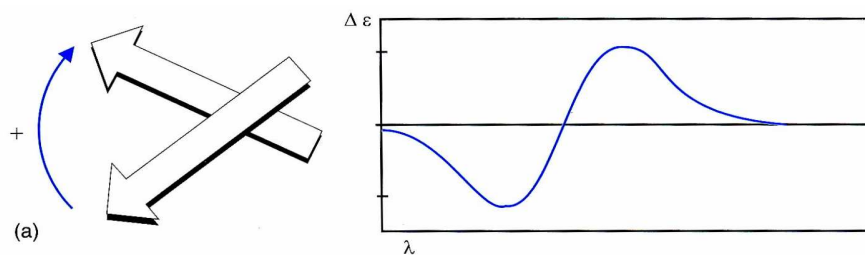
Nell'"exciton chirality CD method" o metodo di Nakanishi,¹¹ il segno dell'effetto Cotton alla più alta lunghezza d'onda, viene correlato con la chiralità dei legami carbinolici C-O leganti il benzoato. Questa tecnica sfrutta le proprietà chirottiche delle sostanze chirali, proprietà derivanti dall'interazione non distruttiva delle molecole con radiazione anisotropia, e che consentono la differenziazione tra enantiomeri.

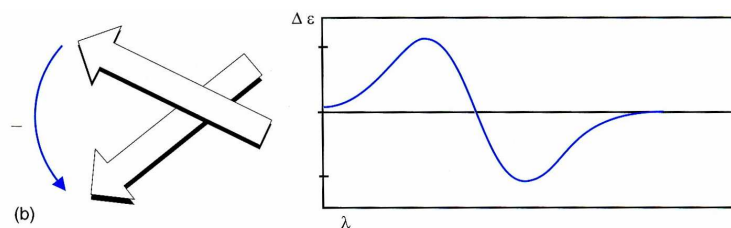
La luce è una radiazione elettromagnetica a cui sono associati un vettore campo elettrico e un vettore campo magnetico. In un fascio di luce ordinaria il vettore campo elettrico oscilla in tutte le direzioni perpendicolari alla direzione di propagazione; tale luce è detta isotropa.

Di contro, la luce linearmente polarizzata è caratterizzata da un vettore campo elettrico che oscilla in un'unica direzione e può essere considerata come derivante dalla combinazione di due fasci di luce circolarmente polarizzata destra e sinistra. La luce linearmente polarizzata rappresenta quindi un mezzo anisotropico; le due componenti circolarmente polarizzata destra e sinistra interagiscono in maniera differente con un composto chiale. Il dicroismo circolare (CD) deriva da un non uguale coefficiente di estinzione dei due fasci di luce circolarmente polarizzata destra e sinistra da parte di un mezzo chirale. Tale fenomeno è osservato in una regione dello spettro UV o visibile in cui si osserva anche assorbimento di luce isotropica. Una transizione elettronica, associata ad un cromoforo con proprietà chirottiche in una molecola chinale, causa un differente assorbimento dei due fasci di luce circolarmente polarizzati sinistro e destro. Ne risulta che i due fasci di luce, dopo l'interazione con il composto chirale, risultano di intensità diversa. La luce linearmente polarizzata è quindi convertita in luce ellitticamente polarizzata in cui il vettore campo elettrico associato traccia un percorso ellittico.

Nell'analisi di uno spettro CD si tiene conto delle regole di elicità che si applicano ai cromofori chirali la cui disposizione spaziale è di tipo elicoidale.

La regola generale come si può vedere in **Figura 3** è che, in tali sistemi, ad una elicità destrorsa (a) corrisponde un CD positivo, mentre ad una elicità sinistrorsa (b) corrisponde un CD negativo.



**Figura 3**

Il metodo dell' "exciton chirality" si basa sul principio che quando due cromofori sono spazialmente vicini e disposti in modo tale da avere una disposizione chirale, l'interazione tra i due singoli cromofori determina uno split dello stato eccitato in due stati energetici non degeneri (exciton split). L'eccitamento a due livelli energetici non degeneri genera due curve CD di segno opposto: la combinazione di tali curve porta a una curva CD con due effetti Cotton di segno opposto separati da un $\Delta \lambda$. Il segno dell'effetto Cotton a λ più elevata designa il tipo di chiralità e corrisponde alla chiralità ricavabile dalle regole di elicITÀ prima enunciate.

III. C. Bibliografia

1. Bax, A.; "Two Dimensional Nuclear Magnetic Resonance in Liquidis", Delf University Press, Dordrecht, **1982**.
2. Davis, D. G.; Bax, A.; "Assignment of complex ^1H NMR spectra via two dimensional Hartmann-Hann spectroscopy", *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 2821.
3. Palmer III, A. G.; Cavanagh, J.; Wright P. E.; Rance, M.; *J. Magn. Reson.*, **1991**, 151-170.
4. Davis, D. G.; Bax, A.; *J. Magn. Reson.*, **1986**, 565.
5. Bax, A.; Summers, M. F.; " ^1H and ^{13}C assignments from sensitivity-enhanced detection of heteronuclear multiple bond connectivity by 2D multiple quantum NMR", *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 2093.
6. Karplus, M.; "Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments", *J. Chem. Phys.*, **1959**, 11.
7. Sanders, J., K., M.; Mersh, J., D.; "Nuclear magnetic double resonance: the use of difference spectroscopy", *Prog. NMR Spectrosc.*, **1982**, 353.
8. Matsumori, N.; Kaneno, D., Murata, M., Nakamura, H., Tachibana, K.; "Stereochemical determination of acyclic structures based on carbon-proton spin coupling constants. A method of configuration analysis for natural products", *J. Org. Chem.*, **1999**, 866.
9. Dale, J., A.; Mosher, H., S.; "Nuclear magnetic resonance non-equivalence of diastereomeric esters of α -substituted phenylacetic acids for determination of stereochemical purity", *J. Am. Chem. Soc.*, **1968**, 3732. Dale, J., A.; Dull, D., L., Mosher, H., S.; " α -Methoxy- α -trifluoromethylphenylacetic acid, a versatile reagent for determination of enantiomeric composition of alcohols and amines", *J. Org. Chem.*, **1969**, 2543.
10. Ohtani, I.; Kusumi, T., Kashman, Y., Kakisawa, H.; "High-field FT NMR application of Mosher's method. The absolute configurations of marine terpenoids", *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 4092.

11. (a) Nakanishi, K.; Harada, N. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 3989-3991. (b) Harada, N.; Nakanishi, K. *Circular Dichroic Spectroscopy-Exciton Coupling in Organic Stereochemistry*; Univ. Sci. Books: Mill Valley, USA, 1983.

IV. ANALISI DELLA SPUGNA *PLAKORTIS SIMPLEX*

Una parte del lavoro di dottorato si è basato sul proseguimento dello studio del metabolismo secondario dalla spugna *Plakortis simplex*, già iniziato presso il mio gruppo di ricerca.

La spugna *Plakortis simplex* (Demospongiae, ordine Homosclerophorida, famiglia Plakinidae), è una specie piuttosto comune della barriera corallina dei Caraibi ed è, insieme ad altri poriferi del genere *Plakortis*, da numerosi anni oggetto di approfondite indagini da parte di chimici delle sostanze naturali di tutto il mondo (**Figura 1**). Tali studi hanno portato all'isolamento di un gran numero di nuovi metaboliti secondari derivanti da diversi pathway biosintetici.

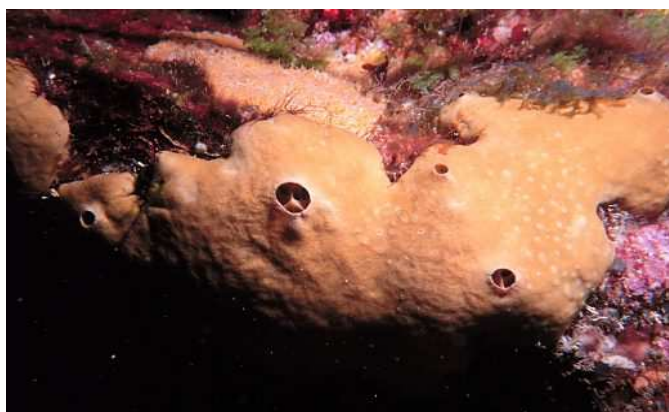
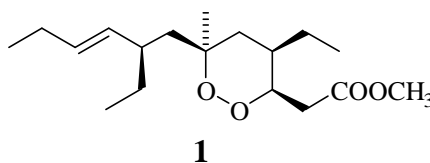


Figura 1

Nel 1978 Faulkner isolò dalla porzione solubile in etere dell'estratto etanolicò di *Plakortis halichondrioides*,¹ la plakortina (**1**), un composto appartenente alla via biogenetica dei polichetidi, che presenta un insolito raggruppamento cicloperossidico. Per tale composto fu riportata un'attività antibiotica, inibendo la crescita di *Escherichia coli* e di *Staphylococcus aureus*.



In seguito a successive analisi di estratti della stessa spugna e conseguente isolamento di molecole con interessante attività biologica, come la plakorina,³ furono isolati e strutturalmente determinati una serie di composti. Tra questi ci sono alcuni derivati con nuclei perossidici a 5 termini come gli acidi plakinici A e B³ che hanno mostrato una moderata attività antimicotica (**Figura 2**).

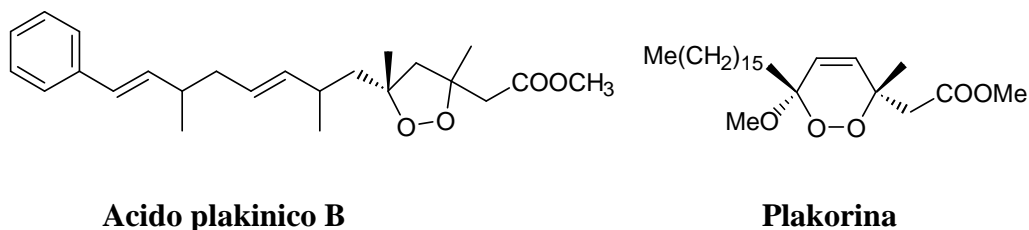
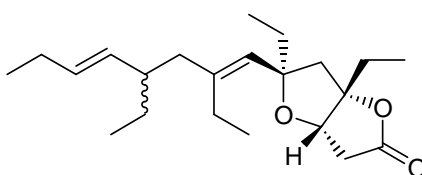


Figura 2

Dalle spugne del genere *Plakortis* sono stati isolati in particolare due classi di composti in cui la funzione cicloperossidica è riarrangiata in maniera articolata: i) i furanoesteri,⁴ con un singolo atomo di ossigeno che connette C-3 e C-6 (per i quali è stata ipotizzata un'origine biogenetica dai corrispondenti cicloperossidi), che hanno mostrato attività citotossica e antiprotozoaria; ii) e i plakortoni, lattoni biciclici riportati da *P. halichondrioides*.⁵ I plakortoni presentano un legame γ -lattonico che connette C-1 e C-4, come si può vedere nel plakortone A (**Figura 3**).



Plakortone A

Figura 3

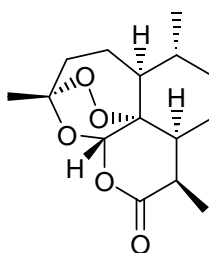
I plakortoni sono dotati di interessanti proprietà farmacologiche: sono infatti in grado di aumentare l'attività della ATPasi calcio-dipendente del reticolo sarcoplasmatico cardiaco. Questa pompa svolge un ruolo chiave nella rimozione degli ioni calcio dai

miofilamenti, contribuendo in questo modo al rilassamento del miocardio, e costituisce quindi un bersaglio ideale per il trattamento di alcuni disturbi cardiaci.

Sino ad oggi solo poche sostanze naturali, come il gingerolo, la penaresina e l'acido tannico hanno dimostrato di possedere un'attività simile.

Da spugne del genere *Plakortis* sono stati isolati anche una serie di alcaloidi,⁶ ma gran parte delle molecole isolate da queste spugne hanno una struttura riconducibile alla via biosintetica dei polichetidi e, a parte quelle sopra riportate, presentano un insolito raggruppamento cicloperossidico. Esse differiscono tra loro per la dimensione dell'anello perossidico, a cinque o a sei termini, per la lunghezza, la funzionalizzazione della catena carboniosa e per la stereochimica dei centri asimmetrici.

In seguito all'isolamento della plakortina su citata, è iniziata la ricerca sui derivati di natura cicloperossidica dalle spugne del genere *Plakortis* da parte di molti studiosi e, anche il mio gruppo di ricerca è impegnato da anni nello studio del metabolismo secondario di *Plakortis simplex*, una delle spugne più interessanti appartenenti al genere *Plakortis*. Dall'analisi di tale specie, nei nostri laboratori, è stata isolata la plakortina in grosse quantità e, in seguito alla valutazione di test farmacologici, è stata riscontrata per tale cicloperossido anche una buona attività antimalarica in vitro, oltre a quelle già note. Tali test sono stati effettuati data la similarità strutturale tra la plakortina e l'artemisinina antimalarica.



Artemisinina

La plakortina (1) e il suo analogo diidroplakortina⁷ (2) (Figura 4), isolato dalla stessa *P. simplex*, sono risultati entrambi egualmente attivi su ceppi di *Plasmodium falciparum*, sia sensibili alla cloroquina che resistenti al farmaco; la presenza di un doppio legame nella catena laterale della plakortina si è quindi dimostrata irrilevante per l'attività del composto, come indicato dall'identica potenza della plakortina e del suo 9,10-diidroderivato.

Derivati cicloperossidici a 5 termini isolati dalla stessa spugna, come il plakortide E (**3**) sono risultati completamente inattivi (Fig. 4), indicando l'importanza di un anello cicloperossidico a sei termini.

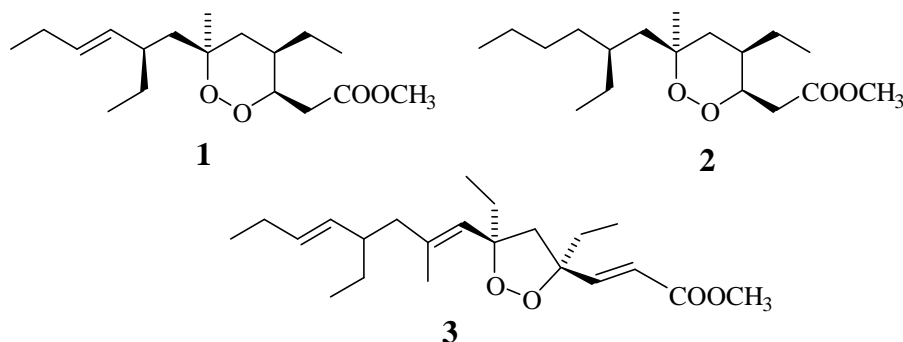


Figura 4

Il meccanismo d'azione della plakortina non è noto, ma si suppone che, per la presenza del cicloperossido, possa essere simile a quello dell'artemisinina. Quindi la plakortina, grazie alla sua buona attività antimalarica e ad una struttura molecolare più semplice dell'artemisinina, potrebbe essere un buon punto di partenza per la progettazione razionale di nuovi farmaci.

Allo scopo di ottenere informazioni circa le relazioni struttura-attività della plakortina è possibile seguire due strade. La prima prevede l'isolamento di metaboliti analoghi da spugne del genere *Plakortis*, la determinazione della loro struttura e la verifica, attraverso i saggi farmacologici, di quali variazioni strutturali e configurazionali influiscono sull'attività antimalarica. Queste informazioni sono state in parte ottenute con l'isolamento di plakortide Q e 3-epiplakortina (**Figura 5**).

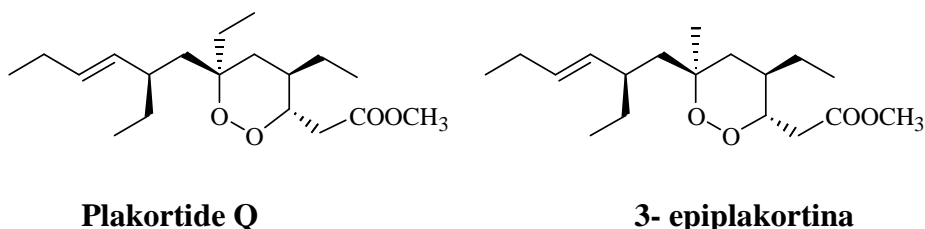


Figura 5

Dai test effettuati su queste molecole naturali plakortina-simili, è stato dedotto che un cambiamento configurazionale al C-3 della plakortina induce effetti negativi sull'attività antimalarica, ma non in maniera significativa. Questo dato è in accordo con l'ipotesi che la plakortina, come pure l'artemisinina, possa agire come antimalarico grazie all'interazione con il gruppo eme planare.

Un'altra strategia è quella di testare derivati semisintetici ottenuti mediante delle piccole modificazioni sulla struttura originaria, come riportato in seguito. Nei capitoli successivi saranno descritti l'isolamento, la determinazione strutturale e l'attività antimalarica sia dei composti naturali che dei composti semisintetici ottenuti.

Un altro punto importante del mio lavoro di dottorato è consistito in un approfondimento del meccanismo d'azione dei derivati plakortinici.

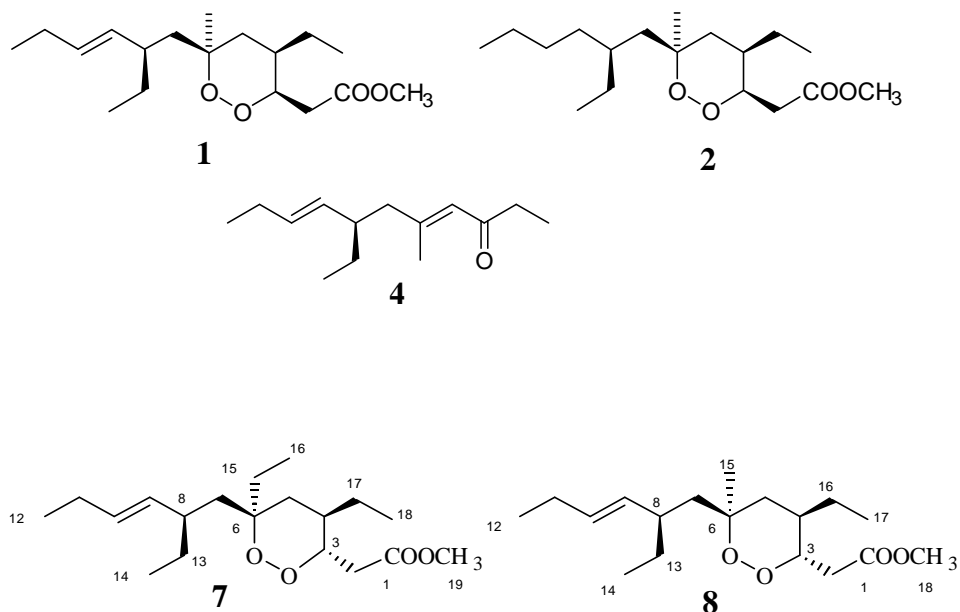
La conoscenza del meccanismo d'azione della plakortina e dei suoi derivati è un aspetto essenziale nello sviluppo di questa classe di composti allo scopo di realizzare dei farmaci antimalarici. Infatti, una conoscenza dettagliata del comportamento di queste molecole in prossimità del target biologico, può consentire di guidare la progettazione di analoghi semplificati della molecola naturale, da ottenere possibilmente grazie a pochi passaggi sintetici.

Come è facilmente comprensibile, la conoscenza del meccanismo d'azione di una classe di farmaci può solo derivare da un approccio multidisciplinare che integri le competenze ed i risultati della farmacologia con quelli della chimica organica. A questo proposito, il nostro gruppo di ricerca ha affrontato lo studio del meccanismo d'azione dei derivati plakortinici grazie ad un approccio computazionale (meccanica/dinamica molecolare e calcoli *ab initio*) coadiuvato e supportato da esperimenti di laboratorio.

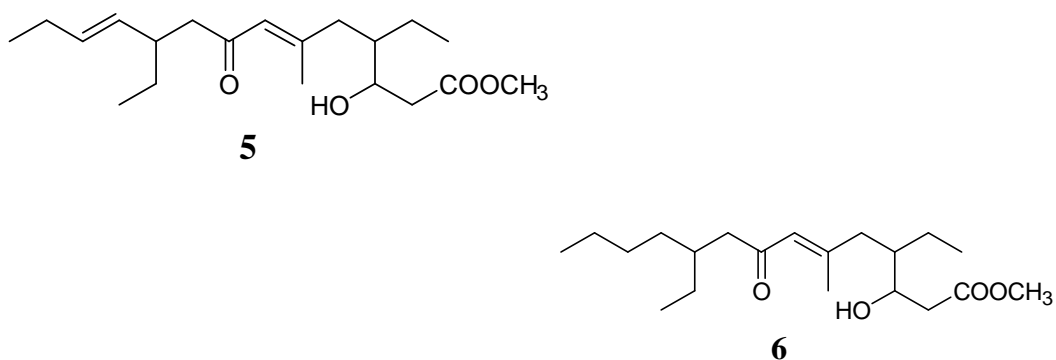
IV. A. ESTRAZIONE ED ISOLAMENTO DI POLICHETIDI DA *P. SIMPLEX*

La spugna *Plakortis simplex* (ordine Homosclerophorida, famiglia Plakinidae) è stata raccolta durante l'estate 2002, lungo le coste delle Bahamas e immediatamente congelata. Dopo omogeneizzazione, l'organismo è stato estratto in maniera esaustiva con metanolo e successivamente con cloroformio. La fase metanolica è stata ripartita con *n*-BuOH e acqua e la fase organica, combinata con la fase cloroformica, è stata sottoposta a cromatografia su colonna MPLC, utilizzando un sistema di eluizione a

gradiente di polarità crescente da *n*-esano 100% a MeOH 100%. Le frazioni eluite con *n*-esano/EtOAc 9:1 sono state purificate più volte mediante HPLC, portando all'isolamento di plakortina (**1**, 1.18 g), diidropalakortina (**2**, 5.5mg), composto **4** (3.0 mg), 3-epiplakortina (**8**) (4.2 mg) e plakortide Q (**7**, 2.8 mg) allo stato puro.



Le frazioni eluite con *n*-esano/EtOAc, 8:2, sono state ricromatografate mediante HPLC portando al composto **5** allo stato puro (1.8 mg) e al composto **6** (0.9 mg). La struttura del composto noto **4** è stata identificata per confronto dei suoi dati spettroscopici con quelli riportati in letteratura.⁸



IV. B. DETERMINAZIONE STRUTTURALE DEI COMPOSTI ISOLATI

Il composto **5** presenta un picco dello ione pseudomolecolare a $m/z = 339$ $[M + H]^+$ nello spettro di massa FAB (ione positivo). La formula molecolare $C_{20}H_{34}O_4$, suggerisce la presenza di quattro insaturazioni, assegnate sulla base dello spettro HR-FABMS. L'analisi degli spettri 1H e ^{13}C NMR del composto **5** ($CDCl_3$, **Tabella 1**), con l'aiuto di un esperimento 2D HMQC, rivela la presenza di tre metini ibridati sp^3 (uno dei quali è ossigenato: $\delta_H = 4.09$ ppm, $\delta_C = 70.3$ ppm), sei metileni sp^3 , due doppi legami [uno trisostituito ($\delta_H = 6.03$ ppm, $\delta_C = 125.1$ ppm; $\delta_C = 158.5$ ppm) e uno disostituito ($\delta_H = 5.06$ ppm, $\delta_C = 134.4$ ppm; $\delta_H = 5.39$ ppm, $\delta_C = 131.2$ ppm)], e cinque metili (uno dei quali è un gruppo metossilico: $\delta_H = 3.72$ ppm, $\delta_C = 52.1$ ppm). I due rimanenti atomi di carbonio e i due rimanenti ossigeni e gradi di insaturazione, indicati dalla formula molecolare, confermavano tutti la presenza di due gruppi carbonilici. Le loro risonanze ^{13}C a $\delta_C = 201.0$ e 174.2 ppm suggeriscono la presenza di un carbonile chetonico coniugato (confermato dall'assorbimento UV a $\lambda_{max} = 235$ nm e dalla banda di assorbimento IR a $\nu_{max} = 1690$ cm^{-1}) e di un gruppo estereo (assorbimento IR a $\nu_{max} = 1735$ cm^{-1}) rispettivamente.

Lo spettro COSY del composto **5** mostra la presenza di due sistemi di spin (indicati in grassetto in **Figura 6**). Il primo coinvolge la catena laterale, includendo il doppio legame e la ramificazione etilica, mentre il secondo connette i metileni risonanti a campi relativamente bassi, la ramificazione etilica ed il metino ossigenato. Lo spettro 2D HMBC del composto **5** rivela che questi due sistemi di spin sono separati da un gruppo β -metilchetonico α,β -insaturo (le correlazioni $^{2,3}J_{CH}$ sono indicate in **Figura 6**). In particolare il sistema enonico è assegnato sulla base della correlazione del carbonio chetonico C-8 con il protone 7-H e delle correlazioni dei protoni 17-H₃ sia con C-7 ($\delta_C = 125.1$ ppm) che con il C-6 non protonato ($\delta_C = 158.5$ ppm). Le connessioni tra i due sistemi di spin e la porzione enonica sono state stabilite sulla base dei picchi di correlazione dei protoni H-9 e H-10 con C-8 e dei due protoni 5-H₂ sia con C-6 che con C-7. Inoltre la struttura del composto **5** è stata completamente definita in seguito alla sistemazione del carbonile estereo ($\delta_C = 174.2$ ppm) al C-1 sulla base delle sue correlazioni con 2-H₂ e con 3-H.

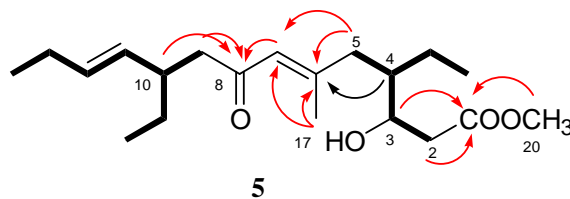


Figura 6.

La geometria *E* del doppio legame Δ^{11} è stata dedotta dalla grande costante di accoppiamento vicinale $J_{11-H/12-H} = 15.4$ Hz, mentre l'accoppiamento spaziale (evidenziato dallo spettro ROESY) tra 7-H e 5a-H ($\delta_H = 2.17$ ppm) indica la geometria *E* del doppio legame Δ^{6-7} . La determinazione delle configurazioni relative ed assolute dei tre centri chirali C-3, C-4 e C-10 del composto **5** non è apparsa semplice, pertanto, data la scarsa quantità di materiale a disposizione, questa non è stata determinata.

Insieme al composto **5** è stato isolato anche il suo analogo **6**, identificato come il suo 11,12-diidroderivato attraverso l'interpretazione dei seguenti dati: i) lo spettro di massa FAB (ione positivo) di **6** mostra un picco dello ione pseudomolecolare a $m/z = 341$; questo valore è di due unità di massa superiore a quello relativo al composto **5**. La formula molecolare $C_{20}H_{36}O_4$ del composto **6** è stata confermata dallo spettro HR-FABMS (trovato: $m/z = 341.2679$, calcolato: $m/z = 341.2692$). ii) lo spettro 1H NMR di **6** (Tabella 1) appare molto simile a quello del composto **5**, le principali differenze sono ristrette all'assenza dei segnali dei protoni olefinici assegnati a 11-H e 12-H (invece si osservano due segnali sovrapposti di metileni a $\delta_H = 1.20$ ppm circa) e significanti valori a campi alti dei segnali di 13- H_2 e di 10-H. La struttura del nuovo metabolita **6** è stata confermata attraverso la spettroscopia bidimensionale, e, in particolare sono stati utilizzati gli spettri COSY, HMQC e HMBC per assegnare tutte le sue risonanze 1H e ^{13}C NMR (Tabella 1). Come per il composto **5**, è stata indicata la geometria *E* del doppio legame Δ^{6-7} in base all'effetto NOE tra 7-H e 5a-H.

L'isolamento dei composti **4-6** da *Plakortis simplex* appare particolarmente interessante per quanto riguarda l'origine biogenetica di questa classe di derivati polichetidici aciclici. Higgs e Faulkner postularono che il composto **4** potrebbe essere derivato, attraverso una scissione ossidativa, dallo stesso 1,3-diene precursore che, più probabilmente da origine alla plakortina (**1**) attraverso l'aggiunta di ossigeno enzimata. (Figura 7).⁸ Interessante è che, nonostante la dozzina di polichetidi isolati da

spugne del genere *Plakortis*,⁹ lo scheletro carbonioso dei composti **5** e **6**, che contiene un'unità di acetato addizionale rispetto alla plakortina (**Figura 7**), è senza precedenti. Per di più, anche il pattern di ossidazione dei composti **5** e **6** appare unico.

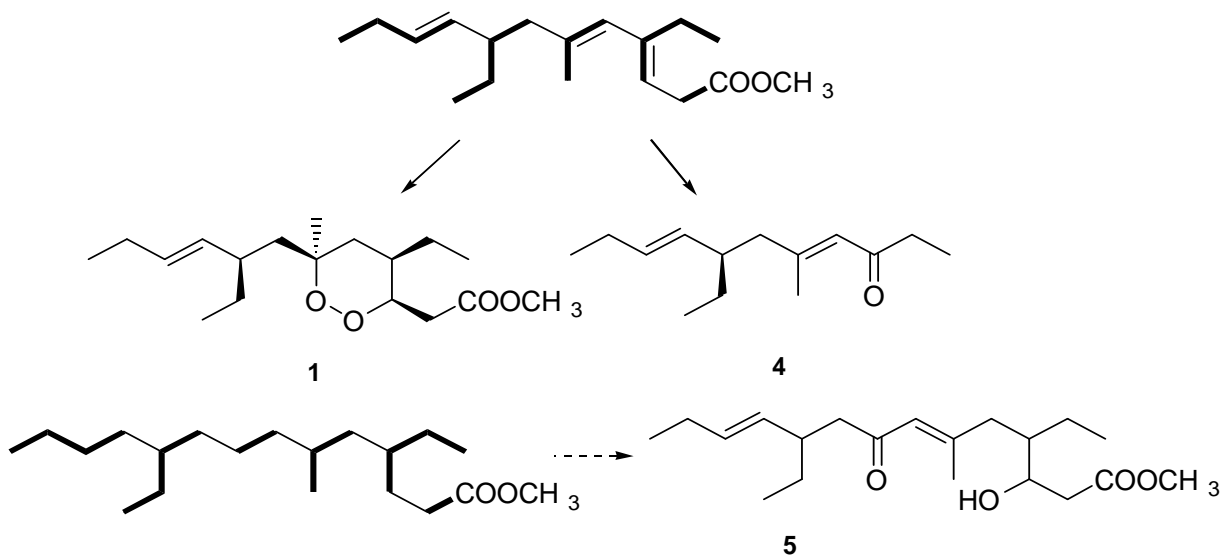


Figura 7.

Il plakortide Q (**7**) isolato come olio incolore, ha mostrato dati HR-FABMS in accordo con la formula molecolare $C_{19}H_{34}O_4$, implicando la presenza di tre insaturazioni, una delle quali può essere assegnata ad un gruppo carbonilico estereo, sulla base di una banda di assorbimento IR a ν_{\max} 17421 cm^{-1} . Lo spettro ^{13}C NMR del plakortide Q (**7**) ha mostrato la presenza di 19 carboni, i cui segnali, analizzati attraverso uno spettro DEPT, sono stati associati a 2 carboni non protonati (uno di questi, a $\delta_{\text{C}} = 170.8$, ha confermato la presenza di una funzione esterea) e a 17 atomi di carbonio protonati. Le correlazioni ^1H - ^{13}C sono state analizzate attraverso un esperimento 2D HMQC (**Tabella 2**). In particolare, sono stati identificati i segnali per tre carboni sp^3 ossigenati: due di essi [$\delta_{\text{C}} = 83.2\text{ ppm}$ (C) e 81.9 ppm (CH, $\delta_{\text{H}} = 4.11\text{ ppm}$)] risuonano a valori molto simili a quelli riportati per gli atomi di carbonio del gruppo cicloperossidico,⁸⁻¹¹ mentre quello a $\delta_{\text{C}} = 51.9\text{ ppm}$ può essere facilmente attribuito a un gruppo metossilico, presumibilmente quello della funzione esterea ($\delta_{\text{H}} = 3.69\text{ ppm}$). Inoltre, sono presenti le risonanze di un doppio legame disostituito ($\delta_{\text{C}} = 134.4\text{ ppm}$, $\delta_{\text{H}} = 5.10\text{ ppm}$; $\delta_{\text{C}} = 131.8$

ppm, $\delta_{\text{H}} = 5.39$ ppm) che hanno permesso di assegnare la rimanente insaturazione formale implicata dalla formula molecolare.

Lo spettro COSY del plakortide Q (**7**) ha indicato la presenza di un gruppo etilico isolato (H₂-15/H₃-16) e di due ampi sistemi di spin (**Figura 8**). Il primo connette H₂-2 ($\delta_{\text{H}} = 2.64$ e 2.37 ppm) a H₂-5 ($\delta_{\text{H}} = 1.46$ e 1.23 ppm) attraverso l'ossimetino a $\delta_{\text{H}} = 4.11$ ppm (H-3), la ramificazione etilica (H₂-17/H₃-18) e il segnale del metino a $\delta_{\text{H}} = 1.60$ ppm (H-4). Il secondo sistema di spin inizia da H₂-7 e si estende fino a H₃-12, includendo il suddetto doppio legame ed il C-8 allilico, che lega un gruppo etilico (H₂-13/H₃-14).

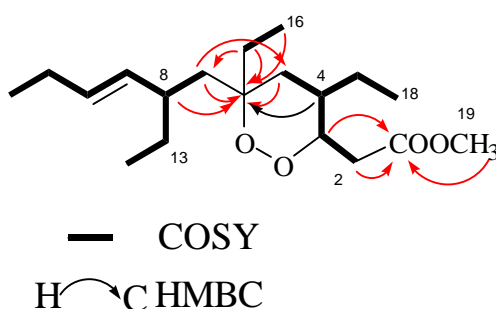


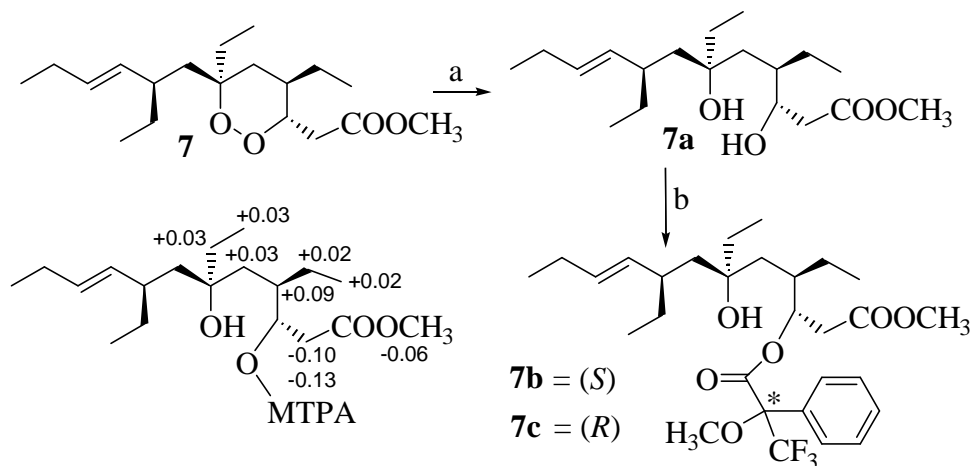
Figura 8

L'analisi dello spettro HMBC di **7** ha stabilito che il C-6 ossigenato è il punto di unione per i tre frammenti sopra determinati (**Figura 8**). In particolare, C-6 mostra picchi di correlazione con H-4, H₂-5, H₂-7, H-8, H₂-15, e H₃-16, mentre C-1 è correlato con H₂-2, H-3, e H₃-19. L'analisi spettroscopica ha così permesso di determinare completamente la struttura planare del plakortide Q (**7**), un nuovo polichetide cicloperossidico appartenente alla famiglia della plakortina.

La geometria *trans* del doppio legame è stata dedotta dal valore della costante di accoppiamento $J_{\text{H-9/H-10}}$ (15.6 Hz), mentre l'orientazione relativa dei sostituenti intorno all'anello diossanico del composto **7** è stata stabilita da alcune interazioni spaziali, evidenziate mediante un esperimento ROESY.

In particolare, i picchi di correlazione di H-3 con H₂-17 e H₃-18 hanno indicato la geometria 3,4-*trans*, che è stata anche dimostrata dal valore della costante di accoppiamento $J_{\text{H-3/H-4}}$ (8.8 Hz), in accordo con una relazione *trans*-diassiale. Inoltre, la vicinanza spaziale di H-4 e H₂-15 ha suggerito l'orientazione *trans* dei gruppi etilici legati rispettivamente a C-4 e C-6.

La configurazione assoluta dei centri chirali appartenenti all'anello cicloperossido di **7** è stata stabilita mediante la reazione riportata nello **Schema 1**.



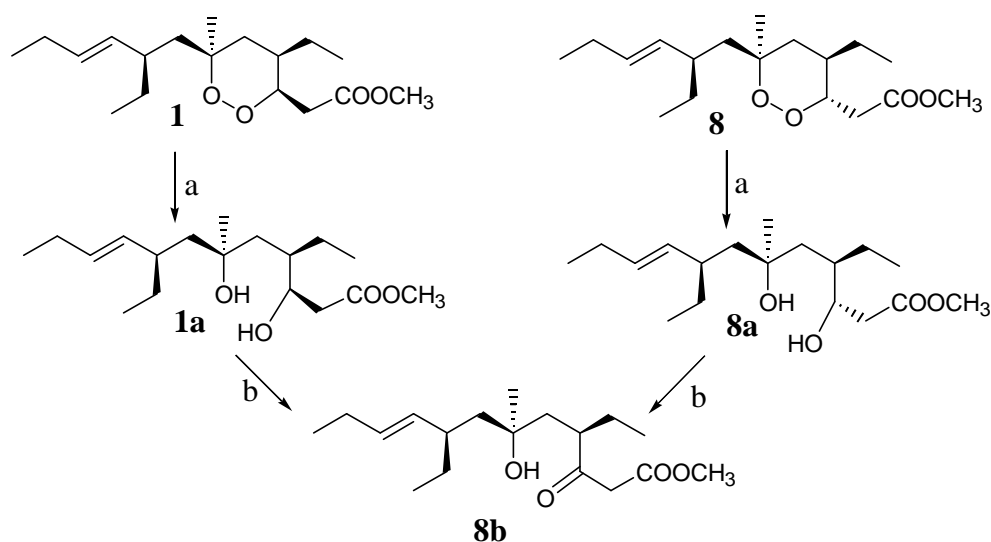
Schema 1

Il trattamento di **7** con Zn/AcOH ha fornito il diolo **7a**, il quale è stato poi esterificato al C-3 con (R) e (S)-MTPA cloruro in piridina anidra. L'analisi dei derivati MTPA ottenuti, **7b** (S) e **7c** (R), rispettivamente, in accordo con il metodo di Mosher modificato,¹²(**Schema 1**) ha consentito di assegnare la configurazione S al C-3. Di conseguenza, le configurazioni al C-4 (R) e C-6 (S) sono state stabilite in base della geometria relativa. Data la limitata quantità di plakortide Q (**7**) disponibile, in parte utilizzato anche per i test biologici, la configurazione assoluta del C-8 non è stata determinata. In ogni modo, in considerazione della quasi completa identità dei segnali di ¹H e ¹³C NMR per i nuclei appartenenti al frammento C-7/C-14 di **7** con i corrispondenti segnali della plakortina (**1**) e del composto **8**, la configurazione del C-8 può essere con buona approssimazione assegnata come R.

Lo spettro di massa FAB ad alta risoluzione ha indicato che il composto **8**, olio incolore, ha formula molecolare C₁₈H₃₂O₄ e manca di una unità metilenica, se confrontato con il plakortide Q (**7**). I segnali negli spettri ¹H e ¹³C NMR del composto **8** (**Tabella 2**) sono stati completamente assegnati attraverso l'interpretazione dei dati COSY, HMQC e HMBC. Si tratta di un analogo del plakortide Q (**7**) in cui il gruppo etilico al C-6 è stato sostituito con un gruppo metilico. Di conseguenza, la sola significativa differenza nei

dati NMR di **8** e quelli di **7** risulta nella mancanza dei segnali C/H attribuiti al gruppo etilico C-15/C-16, che sono sostituiti dalle risonanze del metile ($\delta_C = 21.3$ ppm, $\delta_H = 1.32$ ppm, singoletto). La presenza di questo gruppo metilico al C-6 è stata confermata dalle correlazioni HMBC dei suoi protoni (H₃-15) con C-5, C-6, e C-7.

La struttura planare del composto **8** è identica a quella della plakortina (**1**) di cui, conseguentemente, **8** deve essere diastereoisomero. Gli accoppiamenti spaziali (picchi di correlazione ROESY) di H-3 con H₂-16 e di H-4 con H₃-15, così come l'insieme delle costanti di accoppiamento tra i protoni dell'anello, hanno suggerito che il composto **8** ha la stessa configurazione relativa dei centri chirali del 1,2-diossano del plakortide Q (**7**). Per assegnare la configurazione assoluta di **8**, è stata effettuata la trasformazione chimica descritta nello **schema 2**.



Schema 2

Sia la plakortina (**1**) che il composto **8** sono state trattate con Zn/AcOH per ottenere i corrispondenti dioli **1a** e **8a**, rispettivamente. Quando i composti **1a** e **8a** sono stati separatamente ossidati usando periodinano di Dess-Martin,¹³ è stato ottenuto lo stesso derivato chetonico **8b** (confrontando dati NMR e $[\alpha]_D$). Questo risultato indica senza dubbio che la plakortina e il composto **8** differiscono solo per la configurazione al C-3 e, così, i quattro centri chirali di **8** sono stati assegnati come 3*S*, 4*R*, 6*S*, 8*R*.

Il composto **8** era stato precedentemente isolato da *Plakortis halichondrioides*,¹⁴ ma era stato riportato senza la determinazione della configurazione assoluta dei 4 carboni chirali, assegnando le risonanze solo di alcuni protoni.

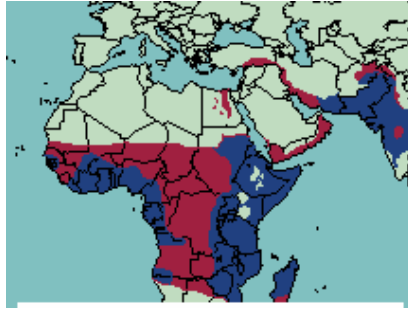
Andersen e Kubanek hanno dimostrato che alcuni polichetidi con ramificazioni etiliche di origine marina sono biosintetizzati per incorporazione di unità intatte di butirrato e hanno supposto che ciò possa essere applicato anche alla biogenesi della plakortina (**1**).¹⁵ La coesistenza nella stessa spugna di polichetidi di differente lunghezza (**1** e **5**), e di polichetidi cicloperossidici con scheletri carboniosi leggermente differenti (come **7** e **8**) o differenti solo per la sola stereochimica (come **1** e **8**) sembrano indicare l'esistenza di una via biogenetica polichetidica alquanto flessibile, capace di assemblare unità di butirrato, propionato e acetato, attraverso diverse combinazioni. Di conseguenza, i composti **7** e **8** probabilmente derivano dall'incorporazione, dopo due unità di butirrato, di una unità di butirrato o propionato, rispettivamente.

I composti **7** e **8** sono interessanti metaboliti sia dal punto di vista strutturale che biogenetico, ma, essi costituiscono anche strumenti preziosi per testare l'effetto di un singolo cambiamento configurazionale sull'attività antimalarica in vitro della plakortina.

IV. C. LA MALARIA

Le infezioni parassitarie colpiscono più di tre miliardi di persone in tutto il mondo e rappresentano un rilevante problema sanitario ed economico. I fattori che favoriscono queste infezioni sono numerosi e comprendono la scarsa applicazione di misure sanitarie, la malnutrizione, l'elevata densità di popolazione, l'aumento della migrazione delle popolazioni, la comparsa di resistenza ad agenti usati come chemioterapici o per il controllo dei vettori.

La malaria è una parassitosi causata da protozoi del genere *Plasmodium* (Regno Protista, Phylum Apicomplexa, Classe Sporozoa, Ordine Eucoccidiida). La malattia è presente in molte regioni del mondo, ma soprattutto nelle aree a clima tropicale e subtropicale (**Figura 9**).

**Figura 9**

Ogni anno si verificano almeno 500 milioni di casi gravi di malaria, che determinano più di 2,5 milioni di morti. A livello continentale la malaria costituisce il 10% delle cause complessive di malattia: assorbe il 40% della spesa per la salute pubblica, causa il 30-50% dei ricoveri ospedalieri e oltre il 50% delle visite ambulatoriali nelle aree più colpite. In particolare nei paesi in via di sviluppo l'incidenza di questa malattia raggiunge quasi l'80% della popolazione ed interessa prevalentemente bambini al di sotto dei 5 anni, donne in gravidanza e soggetti immunodepressi. La maggior parte delle infezioni malariche è dovuta a protozoi intracellulari obbligati del genere *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*), il più pericoloso dei quali è *P. falciparum*. Il veicolo dell'infezione è la zanzara femmina infetta del genere *Anopheles* (**Figura 10**).

**Figura 10**

I sintomi della malaria appaiono dopo 9-14 giorni dalla puntura, anche se il periodo varia in funzione della specie di *Plasmodium*. Solitamente la malaria causa febbre alta, emicrania, vomito, sudorazione e tremori. Tali sintomi si presentano a intervalli regolari e seguono il ciclo di riproduzione e moltiplicazione del parassita. Se non sono disponibili farmaci per il trattamento, o nel caso i parassiti abbiano sviluppato una farmacoresistenza, l'infezione progredisce rapidamente fino a mettere a rischio la vita del paziente.

Indipendentemente dalla specie a cui i plasmodi appartengono, essi presentano un complesso ciclo vitale, che si svolge in parte nell'organismo umano e in parte in quello della zanzara. L'uomo è infettato dagli sporozoi iniettati nel circolo sanguigno attraverso la puntura della zanzara. Dopo una breve permanenza nel circolo ematico, queste forme parassitarie invadono gli epatociti. Si ha quindi il primo ciclo di moltiplicazione asessuata (stadio eso-eritrocitario), con produzione di uno schizonte, plurinucleato, che si rompe e riversa in circolo nuovi merozoiti mononucleati, che infettano gli eritrociti. Il secondo ciclo asessuato (stadio eritrocitario) si svolge all'interno del globulo rosso: il merozoite si muta in trofozoite (forma vegetativa) e poi in schizonte, per produrre altri merozoiti (dai 6 ai 36 per ogni schizonte), che rompono l'eritrocita, si liberano in circolo e ne infettano altri. La distruzione sincrona e massiccia di una grande quantità di globuli rossi produce il tipico attacco febbrile. I merozoiti continuano il ciclo vitale che prosegue fino alla morte dell'ospite o fino alla somministrazione di farmaci adeguati. Dopo vari cicli alcuni trofozoiti si differenziano in forme eritrocitarie sessuate (gametociti). Sono queste le forme che permettono il mantenimento del ciclo del plasmodio nell'ambiente: l'uomo è il serbatoio dei gametociti da dove pescano le zanzare. Il microgametocita (maschio) e il macrogametocita (femmina) vengono ingeriti dall'*Anopheles* in seguito alla puntura di un individuo infettato, durante un nuovo pasto ematico. Il ciclo sessuato nella zanzara è detto sporogonico. Nello stomaco dell'insetto, i gametociti escono dal globulo rosso che li ospita: il nucleo del microgametocita subisce numerose divisioni mitotiche e forma tanti microgameti maschi, flagellati. Il macrogametocita matura nel gamete femminile e richiama i microgameti uno dei quali lo feconda e genera lo zigote, che poi diventa più lungo e mobile, invade la parete del medio intestino della zanzara, dove diventa oocisti. L'oocisti cresce, si rompe, e libera gli sporozoi, che raggiungono le ghiandole salivari della zanzara e vengono inoculati nell'uomo alla successiva puntura. Il ciclo poi si ripete (**Figura 11**).

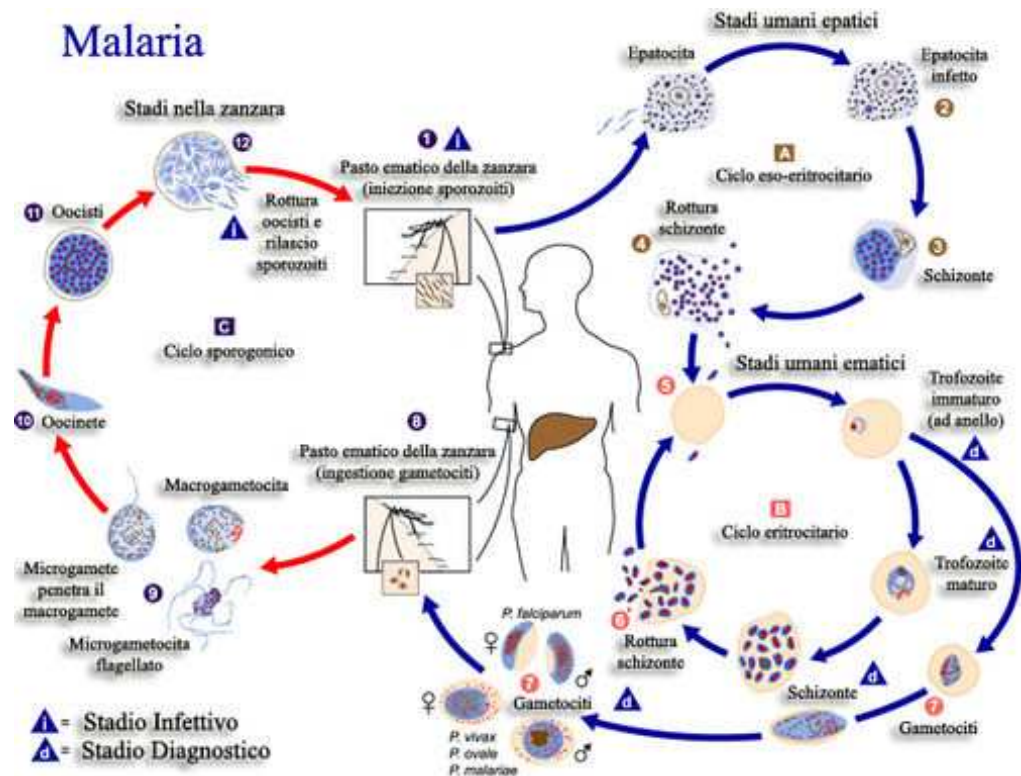


Figura 11
Modalità di trasmissione e ciclo vitale

Nella storia della medicina occidentale, il primo medicamento efficace, impiegato per il trattamento della malaria fu la corteccia della pianta di *Chincona*, scoperta in Perù nel 1600 e importata in Europa dai gesuiti. La corteccia di *Chincona* contiene alcaloidi anti-malarici (chinidina, cinconina, cinconidina), ma quello comunemente impiegato è la chinina. Per secoli, nonostante i suoi effetti collaterali, la chinina è rimasto l'unico farmaco anti-malarico. Il problema della sintesi di nuove molecole efficaci si pose durante la prima guerra mondiale, quando il blocco dei porti e gli attacchi dei sottomarini ostacolarono gli approvvigionamenti di chinina. Negli anni successivi furono scoperti la primachina e la mepacrina. Nel secondo dopoguerra furono scoperte la cloroquina, l'amodiachina, la pirimetamina e il proguanile (queste ultime due impiegate per la profilassi). Apparve subito ovvio che l'impiego su larga scala dei

farmaci per la profilassi avrebbe selezionato ceppi chemio-resistenti. Furono allora impiegati associazioni di sulfonamide con pirimetamina e di chinina con tetracicline. Più tardi la medicina occidentale attinse da quella tradizionale cinese e ripescò il *qing hao su*, un estratto dalla pianta *Artemisia annua* che da secoli veniva impiegato in Oriente, in forma di infuso, per il trattamento delle febbri. Nel 1971 dalla pianta fu estratta l'artemisinina, un sesquiterpene lattonico contenente un gruppo endoperossidico. *Artemisia annua* (*qing hao*) viene utilizzata da secoli come rimedio erboristico nella medicina popolare cinese. Il suo principio attivo, l'artemisinina, ed i suoi derivati semisintetici sia liposolubili (l'artemetere e l'artetere) che idrosolubili (l'artesunato sodico) (**Figura 12**), possiedono eccellenti proprietà contro *Plasmodium falciparum* in vitro.

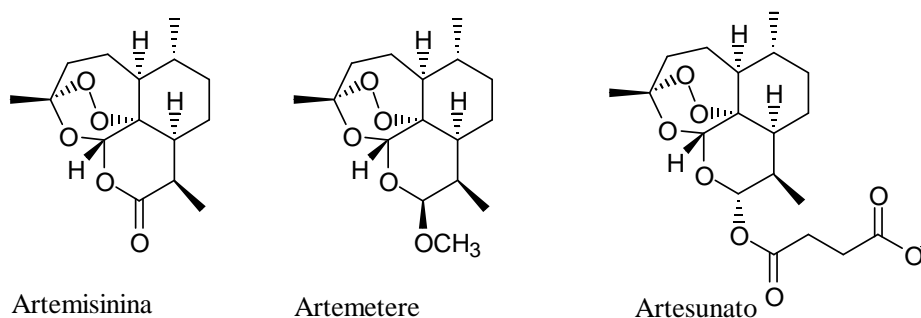
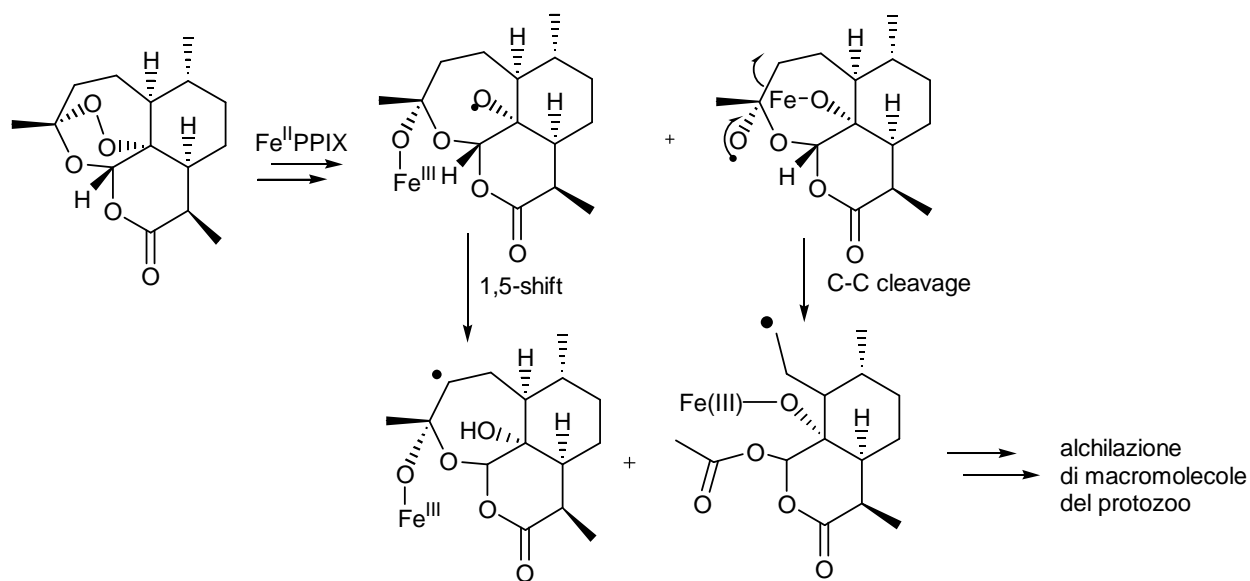


Figura 12

L'uso terapeutico della artemisinina si sta rapidamente diffondendo, soprattutto in combinazione con altri farmaci antimalarici classici come la meflochina.¹⁶ Tutti questi composti sono strutturalmente diversi dai precedenti farmaci antimalarici e sono caratterizzati dalla presenza di un farmacoforo costituito da un ponte perossidico incluso in una struttura di tipo 1,2,4-triossanica, ovvero un anello a sei termini che include tre atomi di ossigeno. Tale funzione è riconosciuta come fondamentale per la loro proprietà antimalarica e il dato è confermato dalla mancanza di attività contro il plasmodio dei corrispondenti composti aciclici in cui la funzione perossidica è persa.¹⁷

Il meccanismo d'azione dell'artemisinina non è ancora chiaro ed attualmente sono proposte due ipotesi, non completamente antitetiche. La prima prevede che il suo gruppo perossidico interagisca con lo ione ferro centrale dell'eme, portando alla

formazione di un ossi-radicale che si riarrangia in un radicale al carbonio. Quest'ultima specie radicalica sarebbe responsabile dell'attività contro il plasmodio, funzionando come agente alchilante per le macromolecole del protozoo. La presenza di un atomo di ossigeno non perossidico sembra giocare un ruolo essenziale nel favorire queste trasformazioni. Infatti l'analogo sintetico dell'artemisinina, che porta un carbonio al posto dell'ossigeno e possiede un farmacoforo perossidico, ha una attività 25 volte inferiore all'artemisinina stessa (**Schema 3**).



Schema 3

La seconda ipotesi, formulata più recentemente in un articolo apparso su *Nature*,³ prevede l'interazione dell'artemisinina con un target specifico posto fuori dal vacuolo digestivo del plasmodio, e quindi lontano dalle molecole di eme, il PfATP6. Questo è un canale del calcio il cui blocco causa la morte del parassita. Tuttavia, gli Autori, pur immaginando un ruolo non rilevante per l'eme, hanno comunque postulato l'esistenza di un meccanismo di attivazione per l'artemisinina grazie all'interazione con un metallo, o con un agente attivante, anche se non risulta ancora chiaro. Anche in questo caso, va sottolineato che il legame cicloperossidico deve essere essenziale per l'interazione con il target. Quindi, in questo momento ci troviamo nella situazione di una definizione grossolana del farmacoforo, mentre la conoscenza di dettagli maggiori è per il momento

ostacolata dalle incertezze sul meccanismo d'azione. In particolare, sarebbe di rilevante importanza sapere se l'artemisinina, o un derivato cicloperossidico in genere, deve prima reagire con una molecola planare come l'eme o deve direttamente interagire con un target tridimensionale come il PfATP6.

Le ricerche in questo settore sono per tali motivi ancora numerose e sono volte all'individuazione di nuovi derivati cicloperossidici sia strutturalmente più semplici dell'artemisinina, e quindi più facilmente sintetizzabili, sia dotati di minori effetti collaterali (neurotossicità, effetti teratogeni) e maggiore stabilità in condizioni fisiologiche rispetto all'artemisinina. Questa linea di ricerca può essere seguita attraverso l'isolamento da fonti naturali, come riportato sopra o attraverso reazioni di semisintesi di nuovi metaboliti secondari contenenti un ponte perossidico stabile a sei termini, come descritto di seguito.

IV. D. ATTIVITÀ ANTIMALARICA

Attraverso il saggio di pLDH, la plakortina (**1**), il plakortide Q (**7**) e il composto **8** sono stati saggiati contro linee cellulari di *Plasmodium falciparum* D10 (CQ-S, cloroquina sensibili) e W2 (CQ-S, cloroquina resistenti). I risultati sono riportati nella **Tabella A**. I tre derivati cicloperossidi **1**, **7** e **8** hanno dimostrato una buona attività antimalarica contro entrambi i ceppi CQ-R e CQ-S di *P. falciparum*, ma i valori di IC₅₀ sono più bassi (efficacia maggiore) per le linee CQ-R, come ci si aspettava per molecole appartenenti alla classe dell'artemisinina. Inoltre, l'attività dei composti **7** e **8** contro W2 (CQ-R) è risultata minore rispetto a quella della plakortina (**1**), e pertanto il cambiamento di configurazione al C-3 sembra esercitare un effetto negativo sull'attività antimalarica.

Tabella A. Attività antimalarica in vitro della plakortina(**1**), del plakortide Q (**7**), e della 3-epiplakortina (**8**) contro i ceppi D10 (CQ-S) e W2 (CQ-R) di *Plasmodium falciparum*.

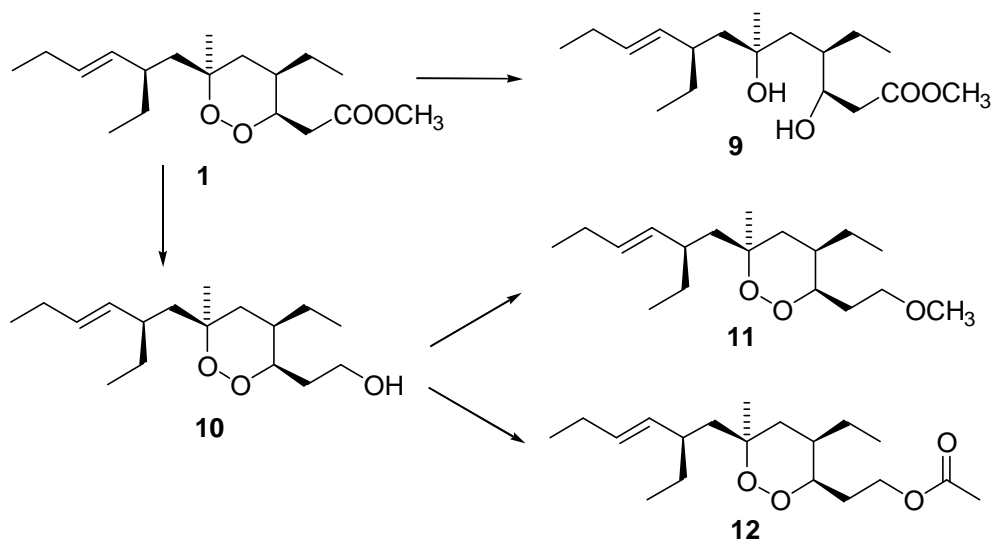
	D10	W2
	IC₅₀ μM	IC₅₀ μM
1	0.87 ± 0.35	0.39 ± 0.13
7	1.00 ± 0.56	0.52 ± 0.16
8	1.03 ± 0.30	0.67 ± 0.18
Clorochina	0.05 ± 0.02	0.81 ± 0.31
Artemisinina	0.013 ± 0.004	0.009 ± 0.005

V. STUDI SUL MECCANISMO D'AZIONE DELLA PLAKORTINA

V. A. MODIFICAZIONI SEMISINTETICHE DELLA PLAKORTINA

Come descritto sopra, la plakortina (**1**) può essere isolata in grosse quantità (più del 5% nell'estratto organico) da *Plakortis simplex*, seguendo una procedura molto semplice, essendo stabile sia nella fase di estrazione che purificazione cromatografica. La disponibilità di una ragionevole quantità del composto **1**, la sua stabilità, e la presenza nel suo scheletro monociclico di gruppi funzionali che possono essere modificati, appare una buona opportunità per studiare l'effetto di trasformazioni chimiche sull'attività antimalarica, permettendo un ampliamento delle relazioni struttura-attività (SARs) per questa classe di endoperossidi antimalarici.

La struttura semplice della plakortina offre tre punti per effettuare trasformazioni chimiche: i) il legame cicloperossidico; ii) il doppio legame carbonio-carbonio; iii) il gruppo estereo. Queste funzionalità sono state sottoposte a semplici reazioni chimiche e i prodotti ottenuti (**9-16**) sono stati completamente caratterizzati mediante tecniche di spettrometria di massa e di spettroscopia NMR sia mono- che bidimensionale.



Schema 4

Sintesi del diolo (9):

Per ottenere la trasformazione della plakortina nel diolo corrispondente in seguito all'apertura dell'anello cicloperossidico, è stato necessario l'utilizzo di un reattivo riducente che non fosse in grado di ridurre anche il doppio legame ed il gruppo estereo. Per questo motivo non sono utilizzabili gli idruri né H_2 ; quindi è stata scelta la procedura di riduzione con Zn in acido acetico ed etere. La plakortina (**1**, 35 mg, 0,11 mmol) è stata trattata con 200 μ L di acido acetico e un eccesso (80 mg) di Zn in polvere in 200 μ L di etere anidro sotto agitazione e a temperatura ambiente per 24 ore. Dopo aver monitorato la reazione mediante TLC, la soluzione è stata neutralizzata con Na_2CO_3 e successivamente sottoposta a filtrazione. Il solvente è stato evaporato ottenendo un prodotto che è stato ripartito tra H_2O e $CHCl_3$. La fase organica conteneva il composto **9**, ossia il diolo della plakortina (**1**, 29 mg, 0.092 mmol, resa 83.4 %) allo stato puro (**Schema 4**).

La dimostrazione della trasformazione avvenuta, ossia la riduzione selettiva del nucleo perossidico, è stata ottenuta attraverso i dati NMR e della spettrometria di massa. Il prodotto ottenuto ha $m/z = 314.455$, quindi esattamente 2 unità di massa in più rispetto alla plakortina (312.45). Nello spettro 1H NMR del composto **9** è stato osservato un segnale risonante a δ 4.16 assente nello spettro della plakortina, mentre nello spettro ^{13}C comparivano due segnali a $\delta_C = 73.0$ e 70.6. L'attribuzione di tali segnali alle posizioni 3 e 6 è stata confermata dagli esperimenti 2D COSY ed HMBC. In particolare le correlazioni del protone risonante a δ 4.16 con H-4 a δ 1.91 e con C-4 a $\delta_{C-4} = 40.5$ hanno permesso di collocare tale protone al C-3.

Sintesi dell'alcol (10):

Un'altra trasformazione effettuata è stata la riduzione selettiva del gruppo estereo della plakortina, lasciando inalterato l'anello cicloperossidico. A tale scopo è stata necessaria un'accurata scelta dell'agente riducente. $NaBH_4$ è un idruro eccessivamente blando per la riduzione del legame estereo; $LiAlH_4$ avrebbe ridotto anche la funzione cicloperossidica. Pertanto è stato utilizzato un reagente a forza intermedia, $LiBH_4$ che riduce il gruppo estereo lasciando inalterate le altre funzioni. La plakortina (**1**, 100 mg, 0.32 mmol) è stata sciolta in 3.0 mL di THF anidro in atmosfera inerte di Argon a 0 °C e in 450 μ L di una soluzione 2 M di $LiBH_4$ (0.9 mmol) e sono stati aggiunti goccia a

goccia 30 μL di metanolo anidro. La reazione è stata effettuata sotto agitazione per 2 ore a 0 °C. Successivamente 30 μL di una soluzione acquosa di NaOH 1M sono stati addizionati alla miscela ottenuta, ripartita poi tra H_2O e CHCl_3 . La fase organica anidrificata con Na_2SO_4 e concentrata sottovuoto è stata purificata mediante HPLC utilizzando come eluente *n*-esano/EtOAc 75:25, ottenendo il derivato alcolico della plakortina (**10**, 78 mg, 0.28 mmol, resa 87.5 %) allo stato puro (**Schema 4**).

La determinazione strutturale del composto ottenuto ha confermato che il processo di riduzione era realmente selettivo, permettendo di ottenere l'alcol della plakortina, senza riduzione del doppio legame o apertura del cicloperossido.

Dallo spettro ^1H NMR è stata rilevante la presenza di un tripletto integrante per due protoni a δ 3.81 assente nella plakortina e tipici di protoni legati a carboni ossigenati. Tali protoni accoppiavano con H_{2-2} ($\delta = 2.16$, segnali sovrapposti) in un esperimento COSY. Nello spettro eteronucleare HMBC è stata osservata l'assenza del segnale estereo della plakortina ($\delta_{\text{C}} = 170.8$), sostituito con un carbonio a $\delta_{\text{C}} 60.5$, che dimostrava il legame di C-1 ad un gruppo ossidrilico.

Sintesi dell'etere metilico (11):

Dal composto **10** (alcol primario della plakortina) è stato ottenuto il composto **11** in seguito ad una semplice metilazione.

Pertanto il composto **10** (25 mg, 0.088 mmol) è stato sciolto in CH_2Cl_2 (3 mL) a 0 °C e in un eccesso di 2,6-di-*terz*-butilpiridina (130 μL) e sono stati aggiunti goccia a goccia 50 μL (0.44 mmol) di metiltrifluorometansolfonato. La reazione è stata effettuata sotto agitazione per una notte e dopo, la miscela ottenuta, è stata trattata con una soluzione satura di NaHCO_3 . La fase organica, anidrificata con Na_2CO_3 e concentrata sottovuoto è stata purificata mediante HPLC utilizzando come eluente *n*-esano/EtOAc 85:15, ottenendo il composto puro **11** (20 mg, 0.067 mmol, resa 76.1 %) (**Schema 4**).

Il successo della reazione effettuata è stato verificato mediante confronto dei suoi dati spettroscopici con quelli della plakortina ($m/z = 298.467$). Nello spettro ^1H NMR è stata evidenziata la presenza di un singoletto attribuibile ad un metossile, i cui protoni risuonano a δ 3.34; il segnale del corrispondente carbonio nel ^{13}C risuona a $\delta_{\text{C}} 58.8$. La localizzazione del metossile al C-1 è stata inequivocabilmente dimostrata dalla

correlazione HMBC 2J H₂-2 ($\delta_{\text{H-2a}} = 2.16$ e $\delta_{\text{H-2b}} = 2.12$) con C-1 ($\delta_{\text{C}} 58.8$) e 3J H-3 ($\delta = 4.06$) con lo stesso C-1.

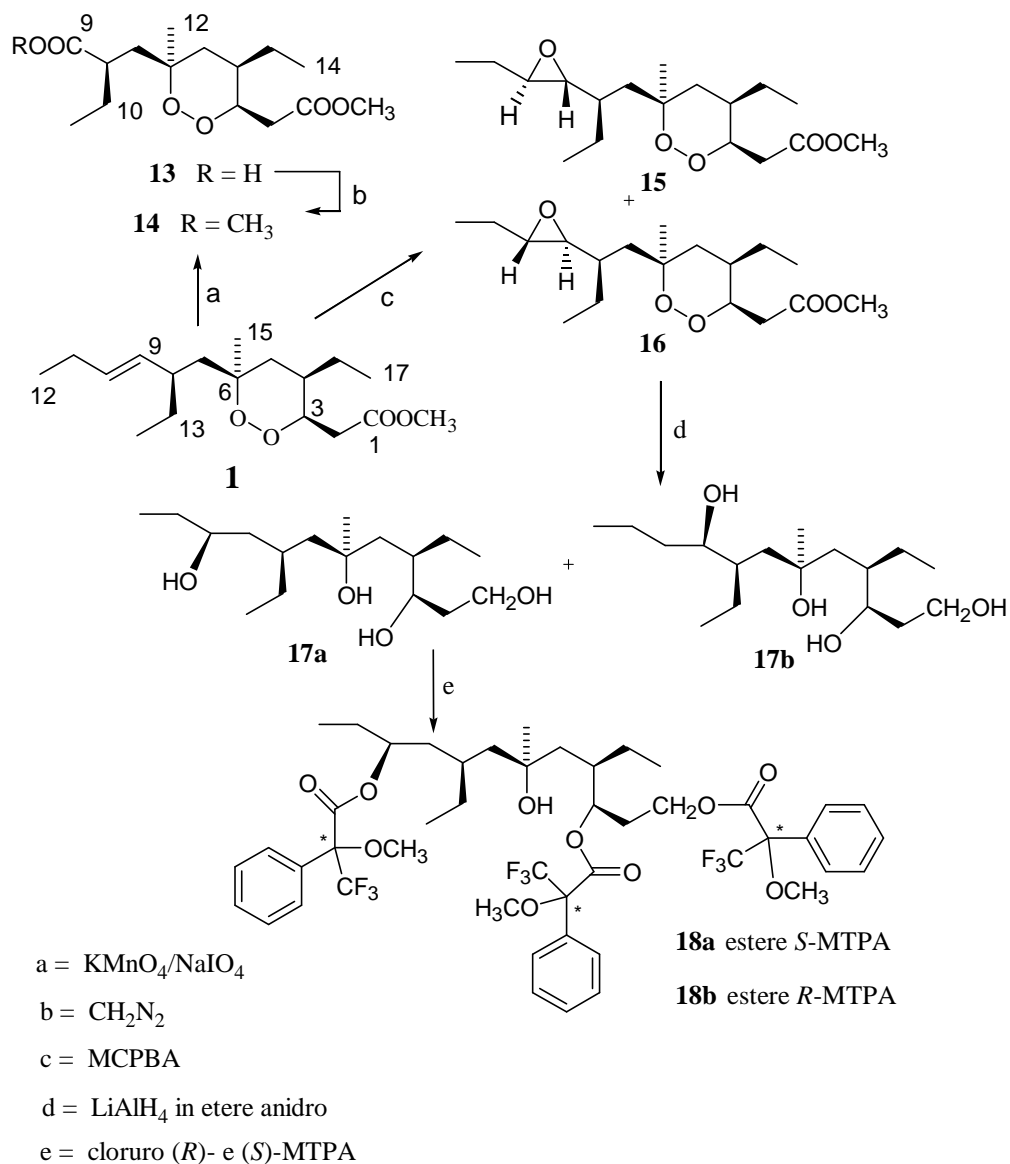
Sintesi del derivato acetilato (12):

Il composto **10** (20 mg, 0.070 mmol) è stato sciolto in piridina anidra (1 mL) ed è stato trattato con anidride acetica (1 mL). Dopo una notte, il work-up della reazione è stato eseguito mediante l'aggiunta di poche gocce di metanolo per neutralizzare l'eccesso di anidride acetica e di acqua (*ca.* 5 mL) e di EtOAc (*ca.* 15 mL). La fase organica è stata sequenzialmente lavata con H₂SO₄ 2N, saturato con sale e NaHCO₃. Dopo anidrifazione (Na₂SO₄) e rimozione del solvente, è stato ottenuto il composto **12** (22.0 mg, 0.069 mmol) (**Schema 4**).

La conferma della struttura di tale derivato è stata ottenuta dal confronto dei suoi dati spettroscopici con quelli del composto di partenza. Le principali differenze osservate sono state la presenza di un segnale singoletto integrante per tre protoni a $\delta = 2.03$ tipico di un acetile (^1H NMR) e di un carbonio estereo a $\delta_{\text{C}} = 171.1$ (^{13}C NMR).

Scissione ossidativa del legame C-9/C-10:

Ad una soluzione di plakortina (120 mg, 0.385 mmol) in 40 mL di *t*-BuOH, sono stati aggiunti 26 mL di 0.04 M di Na₂CO₃ e 150 mL di una soluzione acquosa 0.023 M di KMnO₄ e 0.09 M di NaIO₄. La reazione è stata eseguita a 37°C per 20 ore sotto agitazione. Dopo acidificazione con una soluzione di H₂SO₄ 5 N, la miscela è stata decolorata con una soluzione satura di acido ossalico ed estratta con dietiletere (200 mL, per due volte). Le fasi organiche combinate sono state anidrifate con Na₂SO₄, filtrate e poi concentrate sottovuoto. La frazione ottenuta è stata purificata mediante HPLC a fase diretta, utilizzando come eluente *n*-esano/EtOAc 65:35, portando all'ottenimento del derivato carbossilico **13** (90 mg, 0.289 mmol, resa del 75%) allo stato puro (**schema 5**).



Schema 5

Sintesi del metilestere 14:

Una porzione del composto **13** è stata metilata con diazometano, ottenendo una trasformazione quantitativa nel composto **14**. La metilazione è stata eseguita aggiungendo goccia a goccia a 40 mg di composto **13** (0.132 mmol) una soluzione satura di diazometano in dietilere. Dopo rimozione del solvente organico, il residuo è stato purificato mediante HPLC a fase diretta, utilizzando come solvente *n*-esano/EtOAc 95:5, portando al composto puro **14** (schema 5) (41 mg, 0.130 mmol).

Epossidazione del doppio legame:

A tale scopo la plakortina (110 mg, 0.353 mmol) è stata sciolta in 4 mL di diclorometano anidro ed alla soluzione sono stati aggiunti 84 mg di acido *meta*-cloroperbenzoico (0.494 mmol). La reazione è stata eseguita sotto agitazione per una notte a temperatura ambiente. Successivamente, la miscela ottenuta è stata ripartita tra CHCl_3 e una soluzione acquosa saturata con NaHCO_3 . La fase organica, anidrificata e concentrata sottovuoto, è stata purificata mediante HPLC a fase normale, utilizzando come sistema di eluizione *n*-esano/EtOAc 9:1, ottenendo in tal modo i composti **15** (41 mg, 0.125 mmol, 35% di resa) e **16** (45 mg, 0.137 mmol, 39% di resa) allo stato puro.

Come previsto per questa reazione, i due differenti epossidi ottenuti (**15** e **16**), derivano dall'attacco *sin* del reagente su entrambi i lati del doppio legame *trans*. La geometria *trans* dell'anello epossidico è stata chiaramente dimostrata sia per il composto **15** che per il composto **16** attraverso un esperimento 2D ROESY: in entrambi i casi sono stati osservati i picchi di correlazione corrispondenti all'accoppiamento spaziale di H-9 con H₂-11 (**15**: δ 2.44 con δ 1.58; **16**: δ 2.52 con δ 1.55). Data l'inapplicabilità della determinazione strutturale ai raggi X, dovuta alla natura oleosa dei composti, la determinazione della corretta configurazione assoluta dei carboni epossidici di **15** e **16** ha richiesto una strategia differente.

In particolare, si è pensato di realizzare l'apertura dell'anello epossidico, allo scopo di ottenere un alcol secondario da sottoporre al metodo di Mosher modificato. Pertanto il composto **15** è stato trattato con metanolo, in una reazione catalizzata da tetrafluoroborato di rame (II),¹⁹ ma, sfortunatamente, è stata ottenuta una complessa miscela di prodotti, chiaramente dovuti alla concomitante apertura dell'anello cicloperossidico. Per evitare questa reazione collaterale, abbiamo deciso di modificare la procedura di riduzione di uno dei due epossidi (**16**), usando LiAlH_4 in etere anidro. Il composto **16** (28 mg, 0.085 mmol) è stato sciolto in dietilere anidro e sono stati aggiunti 10 equivalenti di LiAlH_4 . La reazione è stata eseguita sotto agitazione per 3 ore a temperatura ambiente. A reazione completata, il prodotto ottenuto è stato ripartito tra H_2O e cloroformio.

L'evaporazione sottovuoto del solvente dalla fase organica ha portato ad una miscela purificata successivamente mediante HPLC (eluente EtOAc 100%). In questo modo sono stati ottenuti solo due derivati tetraolici, **17a** (13 mg, 0.043 mmol, 51 % di resa) e

17b (10 mg, 0.033 mmol, 39% di resa) allo stato puro. L'analisi spettroscopica di tali derivati ha confermato che essi sono effettivamente regioisomeri, differendo per la posizione del solo gruppo idrossile (al C-10 e al C-9, rispettivamente). Infine, per la determinazione della configurazione assoluta di C-9 e C-10, il composto **17a** contenente il gruppo alcolico secondario desiderato, è stato sottoposto al metodo di Mosher modificato.

Il composto **17a** (4 mg), è stato sciolto in 1.0 mL di piridina anidra, trattato con un eccesso (15 μ L) di cloruro (*R*)-MTPA, con una punta di spatola di *N,N*-dimetilamminopiridina (DMAP) e mantenuto sotto agitazione e a temperatura ambiente per una notte. Dopo rimozione del solvente, la miscela di reazione è stata purificata mediante HPLC, utilizzando come eluente *n*-esano/EtOAc 95:5, portando all'estere (*S*)-MTPA (composto **18a**, 4.4 mg) allo stato puro. Usando con la stessa procedura il cloruro (*S*)-MTPA, è stato ottenuto l'estere (*R*)-MTPA (composto **18b**) con la stessa resa.

I derivati triestere ottenuti sono stati analizzati mediante le tecniche spettroscopiche, utilizzando come solvente CDCl_3 , come previsto dal metodo di Mosher²⁰ modificato ed è stata così assegnata la configurazione *S* al C-10 di **17a**. Di conseguenza, è stato possibile assegnare la configurazione *S* anche al C-10 di **16** e, data la geometria *trans* dell'anello epossidico in **16**, la sua configurazione assoluta è stata determinata come 9*S*, 10*S*. Tenendo conto della relazione enantiomerica esistente tra i carboni epossidici di **15** e **16**, è stato possibile assegnare la configurazione assoluta dei corrispondenti carboni chirali come 9*R*,10*R*.

V. B. Attività contro *P. falciparum* dei derivati semisintetici della plakortina

I nuovi derivati semisintetici della plakortina **9-16** sono stati testati in vitro per la loro attività antimalarica, usando il saggio pLDH, contro i ceppi D10 (cloroquina-sensibili, CQ-S) e W2 (cloroquina-resistenti CQ-R) di *P. falciparum*. I risultati sono riportati nella **Tabella B**.

In primo luogo, è di notevole interesse la completa inefficacia del diolo **9**, dimostrando che, come riportato per l'artemisinina, la funzione cicloperossidica gioca un ruolo cruciale per l'attività antimalarica dei derivati della plakortina. In secondo luogo, tutti i

nuovi composti semisintetici della plakortina sono più attivi su W2 (ceppi CQ-R, cloroquina-resistenti) che su D10 (ceppi CQ-S, cloroquina-sensibili), con l'eccezione del composto **13** che presenta attività paragonabile su entrambe le linee cellulari.

Possono comunque essere fatte interessanti considerazioni: i) la sostituzione della funzione esterea (**1**) con differenti gruppi come idrossi- (**10**), metossi- (**11**) e acetossi- (**12**) non influisce sull'attività e sulla selettività per i ceppi testati di *Plasmodium falciparum*; inoltre questi composti presentano una collinearità tra le variazioni di attività su D10 (ceppi CQ-S) e su W2 (ceppi CQ-R); ii) modifiche sulla catena alchilica laterale ad "ovest" sembrano avere un effetto più significativo sull'attività antimalarica, influenzando in maniera diversa l'attività contro i ceppi CQ-S e CQ-R. La diminuita attività del composto **13** nei confronti di entrambi i ceppi *P. falciparum*, potrebbe essere dovuta a sfavorevoli proprietà di penetrazione nel parassita, dovute alla presenza di una funzione carbossilica libera. A dimostrazione di ciò, l'esterificazione del gruppo carbossilico (**14**) determina un lieve miglioramento totale dell'attività antimalarica. D'altro canto, i composti **15** e **16** mostrano un'attività simile a quella del composto **13** sui ceppi CQ-S, mentre mostrano un incremento di attività (doppio) sui ceppi CQ-R.

E' interessante notare che, alcuni dati disponibili in letteratura per molecole analoghe alla plakortina sembrano rafforzare l'osservazione che modificazioni della catena alchilica laterale possono influenzare significativamente l'attività antimalarica. Infatti i composti **19** e **20** (**Figura 13**), analoghi della plakortina (**1**), sono molto meno attivi di quest'ultima.²¹

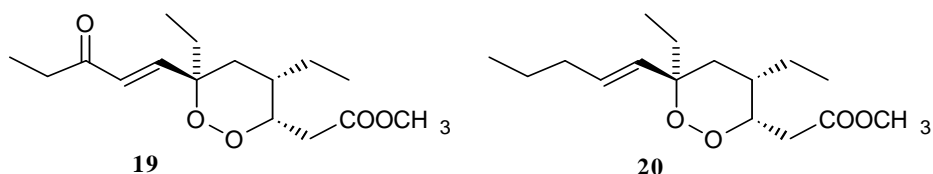


Figura 13

Questa differenza può anche essere attribuita a motivi stereochimici, infatti i due composti differiscono dalla plakortina sia per la configurazione a C-3 che a C-4.

Tuttavia, la differenza di attività tra i due composti, va attribuita unicamente alla differenza nella catena laterale. In particolare, il composto **19** mostra una moderata attività (IC_{50} 1.9 μ M) su W2 (ceppo CQ-R), mentre il composto **20**, differendo solo per l'assenza del gruppo chetonico, è praticamente inattivo ($IC_{50} > 10$ μ M) su W2.²¹

Al fine di studiare il ruolo svolto dal comportamento conformazionale sull'attività antimalarica degli endoperossidi derivati dalla plakortina è stata effettuata una completa analisi computazionale sui nuovi composti **10-16**, tenendo conto anche del confronto dei composti **1-4**^{22,23} con gli analoghi della plakortina **19** e **20**.

I risultanti conformeri possono essere raggruppati in quattro famiglie (**Figura 14**) in relazione alle conformazioni dell'anello diossanico, chiamate sedia A, sedia B, barca A e barca B, dimostrando una forte preferenza per le conformazioni a sedia in accordo con il comportamento conformazionale precedentemente osservato dell'anello 1,2-diossanico.²⁴

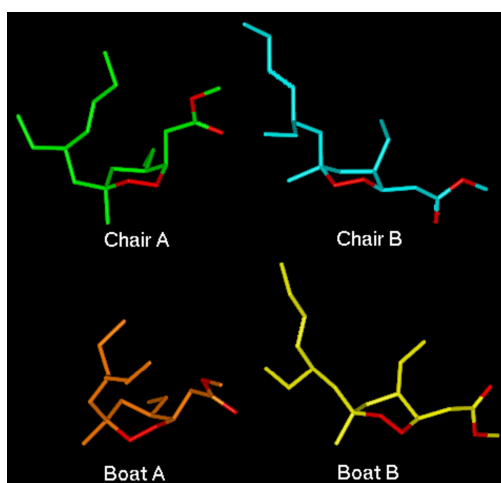
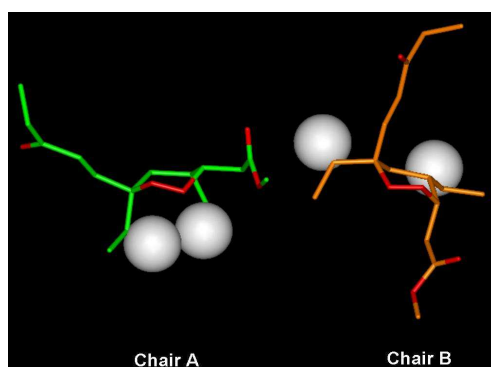
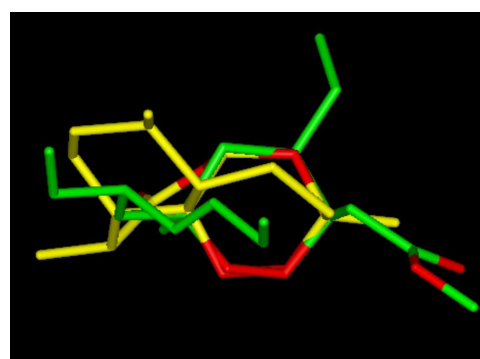


Figura 14

E' stato osservato che tutte le molecole con una buona attività antimalarica (i.e., $IC_{50} < 1$ μ M sui ceppi CQ-R, **1-4**, **10-16**) presentano la stessa conformazione preferenziale dell'anello diossanico (sedia A). E' importante notare che, mentre l'epimerizzazione al C-3 (**3** e **4**) non inclina la conformazione dell'anello diossanico, il cambiamento del comportamento conformazionale osservato nei composti **19** e **20** può essere attribuito ad una concomitante epimerizzazione al C-4, che cambia l'orientazione relativa della catena etilica rispetto alla catena alchilica laterale ad "ovest" (**Figura 15**). L'importanza della conformazione del nucleo endoperossidico è confermata dal confronto con la

struttura dell'artemisinina. Infatti, la conformazione maggiormente favorita (sedia A) dell'anello diossanico della plakortina (**1**) e dei suoi derivati attivi, si sovrappone bene con il nucleo perossidico costretto dell'artemisinina (**Figura 16**). D'altra parte la completa mancanza di attività del composto **20** rispetto al composto **19** conferma che piccoli cambiamenti nella catena laterale alchilica ad "ovest" delle strutture derivate dalla plakortina possono marcatamente influenzare l'attività antimalarica, anche se le molecole mostrano la stessa conformazione dell'anello diossanico.

**Figura 15****Figura 16**

Questo studio, oltre a confermare il ruolo cruciale della funzione cicloperossidica, ha preso in considerazione altre caratteristiche strutturali critiche per l'attività antimalarica: i) la catena laterale alchilica ad "ovest"; ii) la configurazione assoluta dei carboni stereogenici sull'anello 1,2-diosanico, solo quando influenza la sua conformazione bioattiva.

Quest'ultima osservazione, accompagnata dai dati che dimostrano un'attività paragonabile dei diastereoisomeri **15** e **16**, suggerisce ulteriormente l'assenza di un'interazione stereospecifica con il presunto bersaglio molecolare da cui deriva l'attività antimalarica.

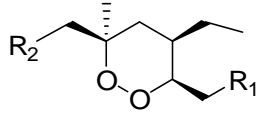
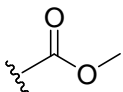
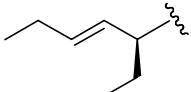
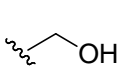
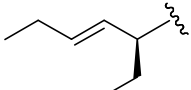
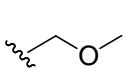
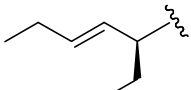
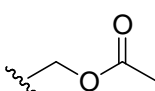
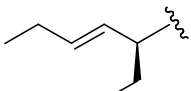
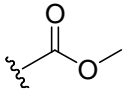
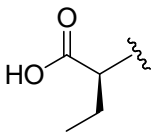
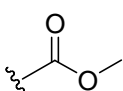
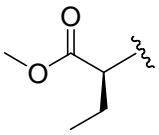
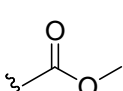
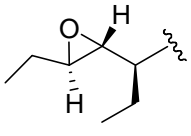
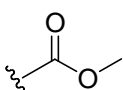
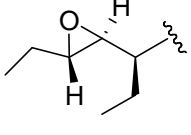
Una completa indagine sul meccanismo d'azione della plakortina e di molecole plakortina-simili, su cui si sta lavorando attualmente nei nostri laboratori, può aiutare a chiarire il ruolo della catena laterale alchilica ad "ovest" e della conformazione dell'anello diossanico nel modulare l'attività di questi derivati cicloperossidici fornendo ulteriori preziose informazioni allo scopo di ottimizzare il profilo dell'attività antimalarica di nuovi endoperossidi sinteticamente convenienti.

Una delle ipotesi sul meccanismo d'azione di artemisinina e plakortina prevede che il gruppo perossidico interagisca con lo ione ferroso centrale dell'eme portando alla formazione di un ossi-radicalo che si riarrangia in un radicalo al carbonio. Quest'ultima specie radicalica sarebbe responsabile dell'attività contro il plasmodio, funzionando come agente alchilante per le macromolecole del protozoo.

Per fornire dei dati che possano avvalorare questa ipotesi, si è pensato di effettuare una reazione chimica che mimasse, quanto più possibile, ciò che probabilmente accade a livello molecolare.

È stata infatti effettuata una reazione della diidroplakortina con Fe^{2+} , per cercare di capire se si ottengono dei prodotti e, dalla struttura di tali prodotti, intuire e ricavare il meccanismo di tipo radicalico avvenuto.

Tabella B. Attività antimalarica in vitro della plakortina (**1**) e dei derivati semisintetici **9-16** contro i ceppi D10 (CQ-S) e W2 (CQ-R) di *Plasmodium falciparum*.^a

			D10	W2
	R ₁	R ₂	IC ₅₀ in μM	IC ₅₀ in μM
1			0.87 ± 0.22	0.41 ± 0.13
10			0.83 ± 0.12	0.48 ± 0.11
11			0.74 ± 0.25	0.41 ± 0.10
12			0.84 ± 0.20	0.46 ± 0.12
13			1.20 ± 0.20	1.23 ± 0.12
14			0.85 ± 0.18	0.78 ± 0.13
15			1.05 ± 0.13	0.50 ± 0.15
16			1.20 ± 0.13	0.70 ± 0.10
Clorochina			0.05 ± 0.02	0.81 ± 0.31
Artemisinina			0.013 ± 0.004	0.009 ± 0.005

^a Il composto **9** (in cui la funzione cicloperossidica è sostituita dalla funzione 3,6-diolo) è risultato completamente inattivo contro entrambe le linee cellulari (IC₅₀ > 20 μM).

V. C. REAZIONI CON LO IONE FERROSO

La conoscenza del meccanismo d'azione della plakortina e dei suoi derivati è un aspetto essenziale nello sviluppo di questa classe di composti allo scopo di realizzare dei farmaci antimalarici. Come è facilmente comprensibile, tale conoscenza può solo derivare da un approccio multidisciplinare che integri le competenze ed i risultati farmacologici con quelli della chimica organica.

Il punto di partenza del nostro studio è stato quello di supporre come bersaglio iniziale dei derivati plakortinici il gruppo eme (precisamente lo ione Fe^{2+}), immaginando quindi un'attivazione della molecola simile a quella dimostrata per l'artemisinina, capostipite degli antimalarici cicloperossidici.

Come descritto sopra, la plakortina ed i suoi derivati sono stati sottoposti ad un'accurata procedura di analisi conformazionale, che ha rivelato l'esistenza di una elevata mobilità conformazionale di circa 500 conformeri, raggruppabili però in quattro famiglie sulla base della disposizione dell'anello diossanico. A questo punto è stata valutata, attraverso calcoli quantomeccanici, l'energia richiesta per la scissione omolitica del legame cicloperossidico (in seguito all'interazione con il Fe^{2+}) per ciascuna delle quattro famiglie di conformeri ottenuti dalla dinamica molecolare. In tutti i casi, i calcoli quantomeccanici indicavano come energeticamente favorita la formazione del radicale sull'O-1 piuttosto che sull'O-2 (**Figura 17**).

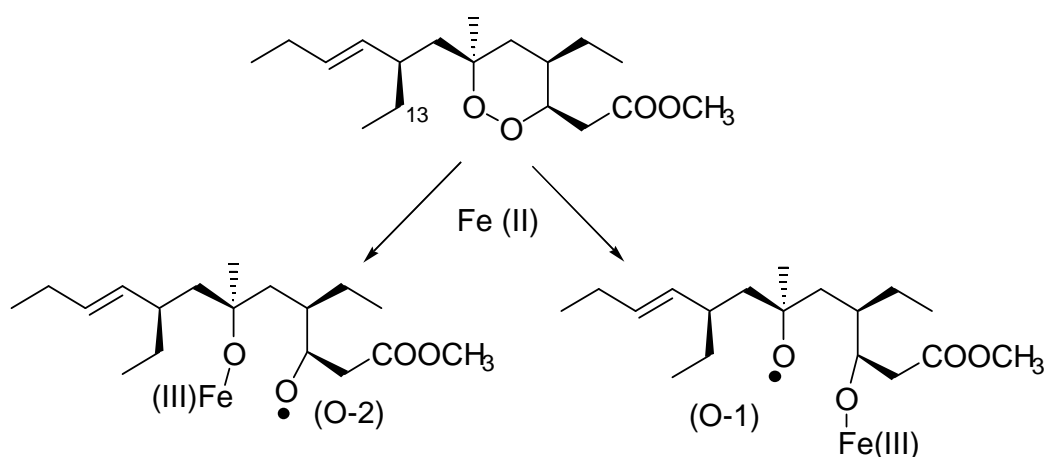


Figura 17

Sempre grazie all'ausilio della dinamica/meccanica molecolare è stata prevista una possibile evoluzione del radicale formatosi sull'O-1. Nel caso della diidroplakortina (**2**), un'analisi delle distanze e della variazione conformazionale in seguito all'interazione con la molecola di eme, portava ad indicare come più probabile un attacco degli idrogeni presenti sul C-13, con conseguente formazione del radicale al C-13.

Per verificare sperimentalmente i risultati dei calcoli computazionali, abbiamo deciso di adoperare la riduzione del legame del cicloperossido indotta dal Fe (II) e di analizzare il comportamento della diidroplakortina (**2**) attraverso una dettagliata caratterizzazione dei suoi prodotti di degradazione. A questo scopo, la diidroplakortina (1 equivalente, 21.4 mg) è stata fatta reagire con FeCl₂ · 4 H₂O (5 equivalenti) in CH₃CN/H₂O 8:2 (5mL) a temperatura ambiente per 2 ore. Il prodotto della reazione è stato ripartito tra acqua ed etere aggiungendo EDTA per complessare il ferro in eccesso. La fase eterea, contenente il derivato desiderato (12 mg), è stata cromatografata mediante HPLC utilizzando una colonna analitica Luna silica (2) 5μ e come miscela eluente *n*-esano-EtOAc 8:2.

La purificazione cromatografica della miscela di reazione ha fornito prodotti puri (**3a-b**, **4a-b**, **Figura 18**), la cui struttura è stata identificata attraverso una dettagliata analisi spettroscopica.

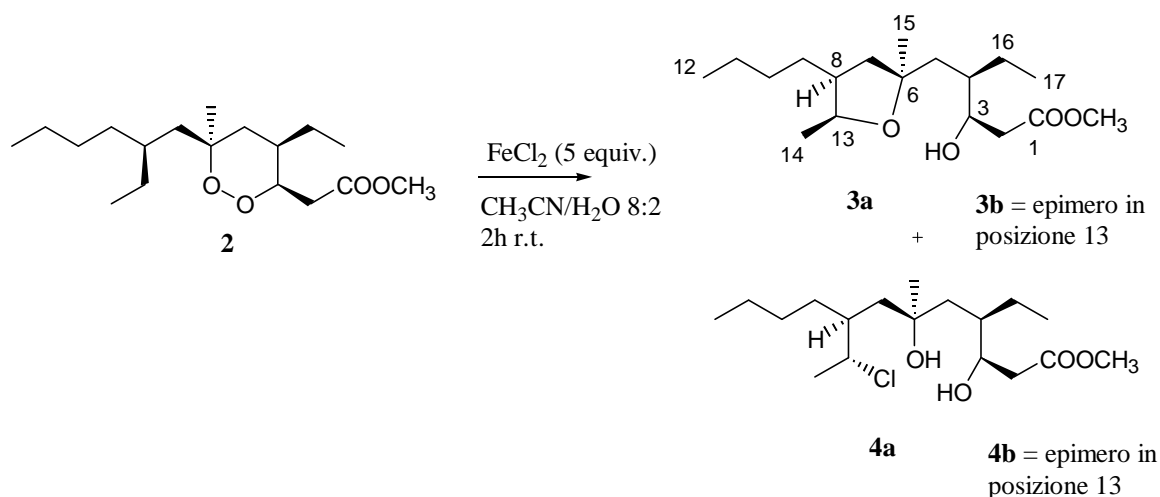


Figura 18

La formula molecolare del composto **3a**, C₁₈H₃₄O₄, stabilita sulla base di HR-EIMS, era identica a quella della diidroplakortina, suggerendo che le due insaturazioni di **2** erano ancora presenti nel composto **3a**. Una preliminare analisi dello spettro ¹H NMR e ¹³C

NMR di **3a** (Tabella 3, CDCl_3), ha confermato la presenza di un estere metilico, mentre ha escluso la presenza di un ulteriore doppio legame e, conseguentemente, ha suggerito la presenza di un sistema ciclico in **3a**. Le informazioni più importanti ottenute dallo spettro ^1H NMR di **3a**, confrontate con il protonico della diidroplakortina, sono: i) la presenza di un secondo multipletto nella regione a chemical-shifts medi (δ_{H} 3.61 e 4.14); ii) la modificazione della molteplicità dei segnali metilici, che appaiono come due tripletti (δ_{H} 0,92 e 0,93), un doppietto (δ_{H} 1,21) e due singoletti (δ_{H} 1,22 e 3,71), al posto di tre tripletti e due singoletti presenti per la diidroplakortina. L'analisi ottenuta dagli esperimenti 2D NMR spiega questi cambiamenti e chiarisce la struttura planare del composto **3a**. Un esperimento 2D NMR COSY ha consentito di evidenziare gli accoppiamenti scalari ^1H - ^1H attraverso tre legami. Dallo spettro COSY di **3a** è possibile raggruppare i protoni risonanti come multipletti in due sistemi di spin, mostrati in **Figura 19**.

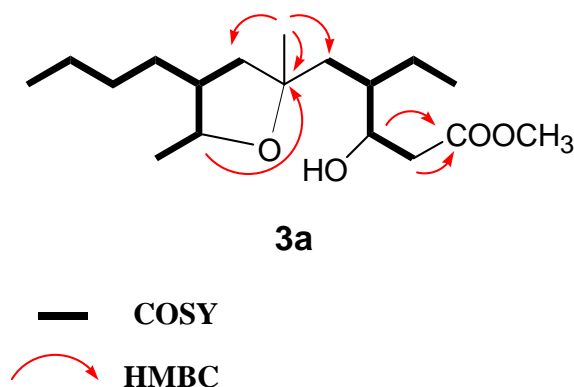


Figura 19

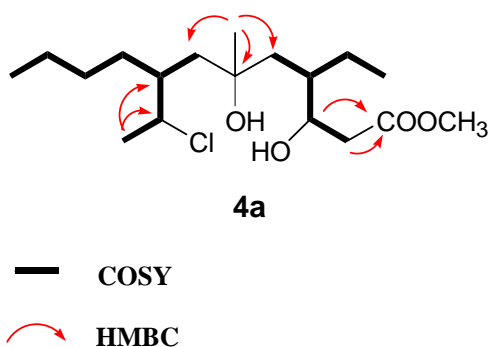
Dopo l'associazione di tutti i segnali dei protoni con quelli degli atomi di carbonio direttamente legati grazie all'analisi dello spettro bidimensionale HSQC l'analisi delle correlazioni $^{2,3}J_{\text{H-C}}$ evidenziate in un esperimento bidimensionale HMBC, ci ha permesso di individuare la struttura planare del composto **3a** (**Figura 19**). In particolare, la correlazione sia di H_2 -2 che di H-3 con il segnale del carbonio estereo (δ_{C} 173.6) ha confermato la presenza di una funzione esterea al C-1, mentre il punto di connessione tra i due sistemi di spin è stato stabilito sulla base dei picchi di correlazione del singoletto metilico a δ_{H} 1.22 con C-5 (δ_{C} 42.4), C-6 (δ_{C} 81.7) e C-7 (δ_{C} 48.2). Infine il picco di correlazione del segnale a δ_{H} 3.61 (H-13) con C-6 indicava la presenza di un

anello tetraidrofuranico, permettendo di sistemare l'ultima insaturazione. Mentre la configurazione al C-3, C-4, C-6 e C-8 del composto **3a** può essere assegnata come quella della diidropalakortina, la configurazione al carbonio chirale C-13 appena creato è stata stabilita attraverso l'analisi di un esperimento 2D ROESY. Di fondamentale importanza sono state le correlazioni tra H-13 e H-7a (δ_{H} 2.03) e tra quest'ultimo con H-5a (δ_{H} 1.61) che hanno dimostrato la configurazione *S* al C13.

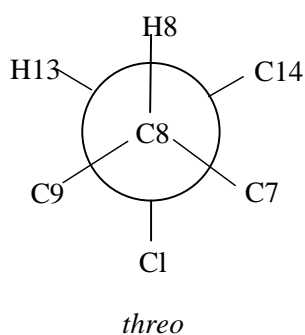
La seconda frazione **3b**, ottenuta in più bassa resa, ha mostrato la stessa formula molecolare e anche spettri ^1H NMR e ^{13}C NMR comparabili al composto **3a**. L'analisi degli esperimenti 2D NMR di **3b** ha dimostrato la stessa struttura planare di **3a**, suggerendo una relazione diastereoisomerica tra le due molecole. L'analisi dello spettro ROESY di **3b** ha rivelato che, come prevedibile, le due molecole si differenziano per la configurazione al C-13. Di conseguenza, la reazione che ha portato al composto **3a** e **3b**, non è stereospecifica, sebbene ha portato al composto **3a** in grosse quantità (circa 4:1).

La frazione più polare **4a** ha mostrato picchi per gli ioni molecolari (ESIMS) a m/z 373 e 375 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (con intensità 3:1), un pattern isotopico che suggerisce la presenza di un atomo di cloro, che è stata confermata dallo spettro HR EIMS, indicando la formula molecolare $\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{ClO}_4$, con un grado di insaturazione. Data la presenza del gruppo metilico estereo nel composto **4a** (δ_{C} 174.6; δ_{C} 51.0, δ_{H} 3.72), la molecola doveva essere aciclica. L'analisi dell'esperimento 2D COSY NMR e dello spettro HSQC di **4a**, ha dimostrato la presenza di due sistemi di spin (**Figura 20**), che ha chiaramente confermato la struttura prevista per il composto **3a**. In particolare, la parte destra della molecola appare identica a quella del composto **3a** (**Tabella 3**), mentre l'unica differenza significativa è ristretta alla parte sinistra della molecola.

All'interno di questa parte strutturale, la correlazione del protone del metino clorurato (δ_{H} 4.53, δ_{C} 64.2) con i protoni metilici deschermati a δ_{H} 1.45 (H₃-14) e con il metino H-8 (δ_{H} 1.83) suggeriva il legame del cloro al C-13. Lo spettro HMBC del composto **4a** ha confermato questa assegnazione ed ha permesso di completare la determinazione della struttura planare del composto **4a**. I picchi di correlazione HMBC più significativi sono riportati in **Figura 20**.

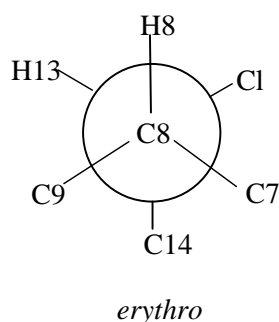
**Figura 20**

La determinazione della configurazione assoluta del nuovo carbonio chirale C-13 non è stata semplice come per il composto **3a**. Per risolvere questo problema, è stato deciso di applicare l'analisi configurazionale basata sul calcolo delle costanti di accoppiamento J proposto da Murata²⁵ per dedurre la stereochimica relativa in sistemi aciclici. Dato che il C-13 era adiacente all'atomo di carbonio chirale C-8 e dato che il basso valore di $^3J_{H-8/H-13}$ (1.5 Hz) indicava che esisteva un rotamero dominante (con i due protoni in conformazione *gauche*) intorno all'asse C-8/C-13, la nostra molecola sembrava presentare tutte le caratteristiche per l'applicazione del metodo di Murata. E' stata determinata la quarta costante di accoppiamento eteronucleare richiesta attraverso l'analisi di un esperimento HMBC phase-sensitive e dalla J ottenuta i dati indicavano una relazione stereochimica *threo* tra C-8 e C-13 nel composto **4a** (**Figura 21**). Di conseguenza, sulla base conoscenza della configurazione *S* del C-8 abbiamo assegnato la configurazione *R* al C-13 del composto **4a**.



asse C8-C13

3J (H8-H13) = piccola
 3J (H13-C9) = piccola
 3J (H8-C14) = piccola
 2J (H8-C13) = piccola
 2J (H13-C8) = piccola



asse C8-C13

3J (H8-H13) = piccola
 3J (H13-C9) = piccola
 3J (H8-C14) = grande
 2J (H8-C13) = grande
 2J (H13-C8) = grande

Figura 21

Come per il composto **3a**, anche nel caso del composto contenente cloro è stata ottenuta una piccola quantità dell'epimero in posizione 13, il composto **4b** ($C_{18}H_{35}ClO_4$ da HR-EIMS). Questa molecola è stata facilmente identificata sulla base delle ampie similitudini tra i suoi spettri 1H NMR e ^{13}C e i corrispondenti spettri di **3a**. La struttura planare e l'assegnazione dei segnali è stata poi inequivocabilmente dedotta sulla base di spettri 2D NMR (COSY, HSQC, HMBC). Le piccole differenze tra le due serie di dati NMR erano ristrette alle risonanze degli atomi di carbonio e di idrogeno vicini al C-13, pertanto abbiamo assegnato la stereostruttura di **4b**, epimero di **4a** al nuovo carbonio chirale C-13. Quindi anche la reazione che ha prodotto i composti **4a** e **4b** non è stereospecifica, ma produce **4a** in quantità maggiore (circa 6:1).

La determinazione della struttura dei prodotti ottenuti in seguito alla reazione della diidroplakortina con $FeCl_2$ è assolutamente in accordo con le previsioni provenienti dai calcoli computazionali. Il seguente meccanismo razionalizza la formazione dei prodotti ottenuti (**Figura 22**).

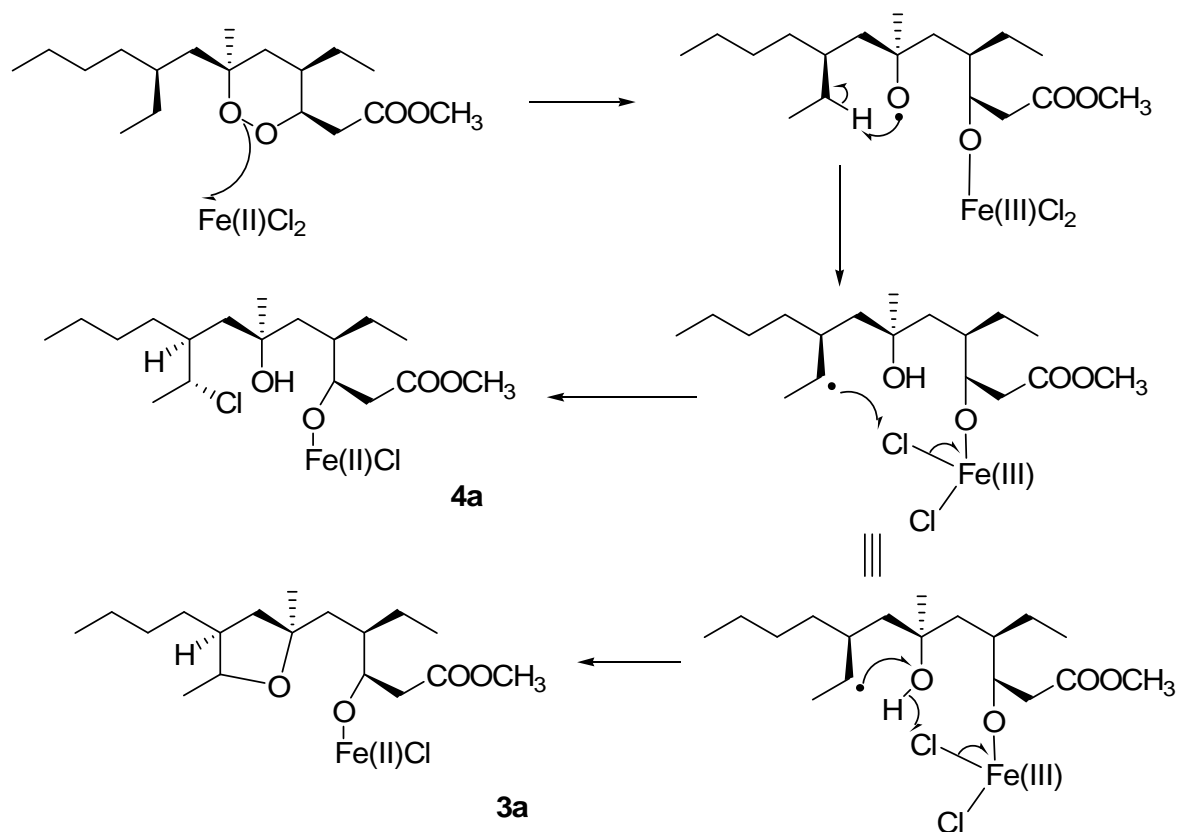


Figura 22

A questo proposito, va sottolineata la completa assenza di prodotti di scissione di legami carbonio-carbonio, che erano stati evidenziati per l'artemisinina e per altri semplici cicloperossidi. Probabilmente, motivazioni di tipo termodinamico portano, nel caso della diidroplakortina, alla formazione esclusiva di prodotti di riarrangiamento (shift 1,5 di H). Sulla base di questi risultati è possibile postulare un meccanismo per l'azione antimalarica della diidroplakortina che prevede le seguenti fasi:

- Interazione della molecola con residui di eme presenti nel vacuolo digestivo del plasmodio e formazione preferenziale del radicale all'O-1.
- Shift 1,5 di idrogeno con formazione preferenziale del radicale al C-13.
- Interazione del radicale al C-13 con macromolecole del plasmodio e morte del parassita.

Ovviamente, queste informazioni sono preziose nella progettazione di derivati semplificati della plakortina e della diidroplakortina e suggeriscono l'importante ruolo della catena laterale alchilica, che va a tutti gli effetti considerata come parte integrante

del farmacoforo. Al contrario, gli altri sostituenti presenti sull'anello diossanico sembrano avere un ruolo meno rilevante.

La fase successiva, cioè la sintesi di analoghi semplificati della diidroplakortina sulla base delle informazioni qui illustrate, è già in corso.

V. D. PARTE SPERIMENTALE

Metodi generali: Le rotazioni ottiche sono state misurate in CHCl_3 con un polarimetro di Perkin-Elmer 192 dotato di una lampada al sodio ($\lambda = 589 \text{ nm}$) e di una microcella di 10-cm. Gli esperimenti ESIMS a bassa risoluzione (ioni positivi) sono stati registrati su uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo Applied Biosystem API 2000. Gli spettri sono stati registrati mediante infusione in una sorgente ESI usando MeOH come solvente. Gli spettri di massa EI a bassa e ad alta risoluzione (70 eV,) sono stati realizzati su uno spettrometro di massa VG Prospec (FISONS). Gli spettri ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR sono stati registrati su uno spettrometro Varian UnityInova 500 NMR; i chemical shifts si riferiscono ai segnali del solvente (CDCl_3 : $\delta_{\text{H}} = 7.26$, $\delta_{\text{C}} = 77.0$). Le correlazioni ^1H omonucleari sono state determinate mediante esperimenti COSY. Gli accoppiamenti ^1H nello spazio sono state evidenziate in esperimenti 2D ROESY utilizzando un mixing time di 500 ms. Le correlazioni eteronucleari ^1H - ^{13}C attraverso un solo legame sono state determinate attraverso esperimenti HSQC. Le correlazioni ^1H - ^{13}C attraverso due e tre legami sono state determinate mediante esperimenti HMBC ottimizzati per una $^3J_{\text{C-H}}$ di 8.0 Hz. La cromatografia liquida a media pressione (MPLC) è stata realizzata usando un sistema Büchi 861 usando Merck SI60 (230-400 mesh) come fase stazionaria. Le separazioni per cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) sono state eseguite in maniera isocratica utilizzando un sistema Beckmann dotato di rivelatore ad indice di rifrazione e con colonne Phenomenex LUNA SI60 (250 × 4 mm).

Materiale Animale, Estrazione e Isolamento. Un campione di *Plakortis simplex* è stato raccolto nel luglio del 2002 lungo le coste delle Bahamas. Un campione è conservato al Dipartimento di Chimica delle Sostanze Naturali, Italia con ref. N° 02-10. L'organismo è stato immediatamente congelato dopo la raccolta e mantenuto come tale

fino al momento in cui la spugna (43 g, peso secco dopo estrazione) è stata omogeneizzata ed estratta con metanolo (4 x 500 mL) e con cloroformio (4 x 500 mL). L'estratto metanolico è stato inizialmente ripartito tra H₂O e n-BuOH e successivamente la fase organica, combinata con l'estratto cloroformico, è stata concentrata sotto vuoto fino ad ottenere un olio marrone (22.1g). Questo è stato sottoposto a cromatografia su una colonna impaccata con gel di silice RP18 ed eluita con H₂O/MeOH 9:1 (A₁), H₂O/MeOH 7:3 (A₂), H₂O/MeOH 4:6 (A₃), H₂O/MeOH 2:8 (A₄), e MeOH (A₅). Le frazioni A₄ e A₅ sono state unite (6.5 g) e cromatografate mediante MPLC (SiO₂ 230-400 mesh); sistema eluente a gradiente con polarità crescente da *n*-esano a MeOH). Le frazioni MPLC eluite con *n*-esano/EtOAc 9:1, sono state nuovamente cromatografate su colonne SiO₂, usando un sistema di solvente a gradiente da *n*-esano a *n*-esano/EtOAc 8:2, per ottenere plakortina (**1**, 1.18 g) e altre frazioni unite e purificate mediante HPLC (eluente *n*-esano/EtOAc 97:3, flusso 0.8 mL/min) dando la diidroplakortina (**2** 5.5 mg), il composto **4** (3.0 mg), il composto **8** (4.2 mg) e il plakortide Q (**7**, 2,8 mg) allo stato puro.

Le frazioni MPLC eluite con *n*-esano/EtOAc (8:2) sono state ricromatografate mediante HPLC (eluente *n*-esano/EtOAc, 85:15, flusso 1,0 ml/min) per arrivare al composto **5** (1.8 mg) e al composto **6** (0.9 mg).

Composto 5: Olio incolore. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +25.1$ ($c = 1.5$ mg/mL in CHCl₃); IR (KBr): ν_{max} 3345, 1735, 1690 cm⁻¹. UV (CH₃CN): $\lambda_{\text{max}} = 235$ nm ($\epsilon = 18500$). ¹H e ¹³C NMR (CDCl₃): vedi Tabella 1. LR-FABMS: m/z 339 [M + H]⁺; HR-FABMS: osservato $m/z = 339.2547$ [M + H]⁺; calc. per C₂₀H₃₅O₄, 339.2535; $\Delta = 3.5$ ppm.

Composto 6: Olio incolore. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +23.3$ ($c = 0.9$ mg/mL in CHCl₃); IR (KBr): ν_{max} 3345, 1737, 1692 cm⁻¹. UV (CH₃CN): $\lambda_{\text{max}} = 235$ nm ($\epsilon = 18500$). ¹H e ¹³C NMR (CDCl₃): vedi Tabella 1. LR-FABMS: m/z 341 [M + H]⁺; HR-FABMS: osservato $m/z = 341.2677$ [M + H]⁺; calc. per C₂₀H₃₇O₄, 341.2692; $\Delta = 4.3$ ppm.

Plakortide Q (7): Olio incolore. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +10.3$ ($c = 2.5$ mg/mL in CHCl₃); IR (KBr): $\nu_{\text{max}} = 1741, 1449, 970$ cm⁻¹; ¹H e ¹³C NMR (CDCl₃): vedi tabella 2. LR-FABMS: m/z

327 [M + H]⁺; HR-FABMS: osservato $m/z = 327.2549$ [M + H]⁺; calc. per C₁₉H₃₅O₄, 327.2535; $\Delta = 4.2$ ppm.

Composto 8: Olio incolore. $[\alpha]_D^{25} = +22.3$ ($c = 3.5$ mg/mL in CHCl₃); IR (KBr): ν_{\max} 1740, 1450, 970 cm⁻¹; ¹H e ¹³C NMR (CDCl₃): vedi tabella 2. LR-FABMS: m/z 313 [M + H]⁺; HR-FABMS: osservato $m/z = 313.2383$ [M + H]⁺; calc. per C₁₈H₃₃O₄, 313.2379; $\Delta = 1.3$ ppm.

Riduzione del plakortide Q (7), plakortina (1) e composto 8: Il plakortide Q (**1**, 1.6 mg, $5 \cdot 10^{-3}$ mmol) in 100 μ L di etere anidro è stato trattato con 40 μ L di acido acetico e un eccesso (10 mg) di Zn in polvere e poi messo sotto agitazione per 24 h a temperatura ambiente. Dopo la conferma della scomparsa della sostanza di partenza mediante TLC, la soluzione è stata neutralizzata con Na₂CO₃ e la parte solida rimossa mediante filtrazione. Il solvente è stato poi evaporato ottenendo il prodotto che poi è stato ripartito tra H₂O e CHCl₃. La fase organica conteneva il composto **7a** (1.4 mg), allo stato puro. La stessa procedura è stata applicata al composto **8** (2.0 mg, 6.4×10^{-3} mmol), che ha portato a 1.6 mg di composto **8a**, e alla plakortina (**1**, 4.0 mg, 1.2×10^{-2} mmol), ottenendo 3.6 mg di composto **1a**. I dati del composto **1a** sono già stati riportati.²⁶

Composto 7a. Olio incolore. $[\alpha]_D^{25} -18$ ($c = 1.0$ mg/mL in CHCl₃). IR (KBr): $\nu_{\max} = 3350, 2975$ cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 5.48 (dt, $J = 15.2, 6.2$ Hz, 1 H, 10-H); 5.16 (dd, $J = 15.2, 9.0$ Hz, 1 H, 9-H); 3.90 (dt, $J = 9.8, 2.1$ Hz, 1 H, 3-H); 3.69 (s, 3 H, 19-H₃); 2.59 (dd, $J = 15.9, 2.1$ Hz, 1 H, 2a-H); 2.45 (dd, $J = 15.9, 9.8$ Hz, 1 H, 2b-H); 2.06 (sovrapposto, 8-H); 2.04 (sovrapposto, 11-H₂); .80 (dd, $J = 14.5, 3.5$ Hz, 1 H, 7a-H); 1.70 (m, 1 H, 4-H); 1.52 (sovrapposto, 15a-H); 1.50 (sovrapposto, 7b-H); 1.48 (sovrapposto, 15b-H); 1.45 (sovrapposto, 5a-H); 1.44 (sovrapposto, 17a-H); 1.38 (sovrapposto, 13a-H); 1.25 (dd, $J = 13.8, 6.4$ Hz, 1 H, 5b-H); 1.18 (sovrapposto, 13b-H); 1.18 (sovrapposto, 17b-H); 0.97 (t, $J = 6.2$ Hz, 3 H, 12-H₃); 0.87 (t, $J = 7.3$ Hz, 3 H, 14-H₃); 0.85 (t, $J = 6.3$ Hz, 3 H, 18-H₃); 0.82 (t, $J = 6.3$ Hz, 3 H, 16-H₃). FABMS: m/z 329 [M + H]⁺.

Preparazione degli esteri MPTA del composto 7a: il composto **7a** (0.5 mg, 1.6×10^{-3} mmol) è stato sciolto in 0.3 mL di piridina anidra, e trattato con (-)-MPTA cloruro (10 μ L) e mantenuto a temperatura ambiente sotto agitazione per una notte. Dopo aver rimosso il solvente, la miscela di reazione è stata purificata con HPLC su colonna SI60 (eluente *n*-esano/EtOAc 95:5), dando l'estere **7b** (*S*)-MPTA allo stato puro (0.6 mg). Usando (+)-MPTA cloruro, la stessa procedura ci ha condotto all'estere (*R*)-MPTA **7c** nelle stesse quantità.

(S)-MTPA estere (7b): Solido amorfo. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 7.35 and 7.45 (MTPA phenyl protons); 5.71 (dt, $J = 9.8, 2.1$ Hz, 1 H, 3-H); 5.46 (dt, $J = 15.2, 6.2$ Hz, 1 H, 10-H); 5.18 (dd, $J = 15.2, 9.0$ Hz, 1 H, 9-H); 3.59 (MTPA OCH_3 , s); 3.50 (s, 3 H, 19- H_3); 2.52 (dd, $J = 15.9, 2.1$ Hz, 1 H, 2a-H); 2.46 (dd, $J = 15.9, 9.8$ Hz, 1 H, 2b-H); 2.00 (q, $J = 7.0$ Hz, 2 H, 11- H_2); 1.92 (m, 1 H, 8-H); 1.85 (sovrapposto, 7a-H); 1.84 (sovrapposto, 4-H); 1.56 (sovrapposto, 15a-H); 1.55 (sovrapposto, 7b-H); 1.48 (sovrapposto, 4-H); 1.48 (sovrapposto, 15b-H); 1.48 (sovrapposto, 5a-H); 1.45 (sovrapposto, 17a-H); 1.35 (m, 1 H, 13a-H); 1.28 (sovrapposto, 5b-H); 1.22 (sovrapposto, 17b-H); 1.15 (m, 1 H, 13b-H); 0.97 (t, $J = 7.0$ Hz, 3 H, 12- H_3); 0.87 (t, $J = 7.3$ Hz, 3 H, 14- H_3); 0.87 (t, $J = 6.3$ Hz, 3 H, 18- H_3); 0.84 (t, $J = 6.3$ Hz, 3 H, 16- H_3). FABMS (matrice glicerolo, ione positivo): m/z 545 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

(R)-MTPA estere (7c): Solido amorfo. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 7.32 and 7.55 (MTPA phenyl protons); 5.71 (dt, $J = 9.8, 2.1$ Hz, 1 H, 3-H); 5.46 (dt, $J = 15.2, 6.2$ Hz, 1 H, 10-H); 5.18 (dd, $J = 15.2, 9.0$ Hz, 1 H, 9-H); 3.64 (MTPA OCH_3 , s); 3.56 (s, 3 H, 19- H_3); 2.62 (dd, $J = 15.9, 2.1$ Hz, 1 H, 2a-H); 2.59 (dd, $J = 15.9, 9.8$ Hz, 1 H, 2b-H); 2.00 (q, $J = 7.0$ Hz, 2 H, 11- H_2); 1.91 (m, 1 H, 8-H); 1.82 (sovrapposto, 7a-H); 1.75 (sovrapposto, 4-H); 1.55 (sovrapposto, 15a-H); 1.52 (sovrapposto, 7b-H); 1.45 (sovrapposto, 15b-H); 1.45 (sovrapposto, 5a-H); 1.43 (sovrapposto, 17a-H); 1.35 (m, 1 H, 13a-H); 1.25 (sovrapposto, 5b-H); 1.20 (sovrapposto, 17b-H); 1.15 (m, 1 H, 13b-H); 0.97 (t, $J = 7.0$ Hz, 3 H, 12- H_3); 0.87 (t, $J = 7.3$ Hz, 3 H, 14- H_3); 0.85 (t, $J = 6.3$ Hz, 3 H, 18- H_3); 0.82 (t, $J = 6.3$ Hz, 3 H, 16- H_3). FABMS (matrice glicerolo, ione positivo): m/z 545 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Composto 8a. Olio incolore. $[\alpha]_D^{25} -9$ ($c = 1.5$ mg/mL in CHCl_3). IR (KBr): ν_{\max} 3350, 2975 cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 5.50 (dt, $J = 15.2, 7.0$ Hz, 1 H, 10-H); 5.21 (dd, $J = 15.2, 9.0$ Hz, 1 H, 9-H); 3.89 (dt, $J = 9.8, 2.1$ Hz, 1 H, 3-H); 3.70 (s, 3 H, 18-H₃); 2.59 (dd, $J = 15.9, 2.1$ Hz, 1 H, 2a-H); 2.40 (dd, $J = 15.9, 9.8$ Hz, 1 H, 2b-H); 2.14 (m, 1 H, 8-H); 2.03 (q, $J = 7.0$ Hz, 11-H₂); 1.76 (dd, $J = 13.8, 5.0$ Hz, 1 H, 5a-H); 1.64 (m, 1 H, 4-H); 1.56 (sovrapposto, 5b-H); 1.54 (sovrapposto, 7a-H); 1.45 (sovrapposto, 16a-H); 1.43 (sovrapposto, 7b-H); 1.35 (m, 1 H, 13a-H); 1.19 (sovrapposto, 13b-H); 1.19 (sovrapposto, 16b-H); 1.17 (s, 3 H, 15-H₃); 0.96 (t, $J = 7.0$ Hz, 3 H, 12-H₃); 0.89 (t, $J = 7.3$ Hz, 3 H, 17-H₃); 0.82 (t, $J = 6.3$ Hz, 3 H, 14-H₃). FABMS: m/z 315 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Ossidazione del composto 1a e 8a. Il composto **1a** (3.0 mg, 1×10^{-2} mmol) è stato sciolto in CH_2Cl_2 (600 μL) sotto agitazione a temperatura ambiente e atmosfera inerte; il periodinano (8 mg, 1.9×10^{-2} mmol) è stato aggiunto in una sola volta. La reazione è stata messa sotto agitazione fino a completamento (TLC, circa 2 ore), poi raffreddata con sodio tiosolfato (soluzione satura), estratta quattro volte con acetato di etile, lavato, seccato su solfato di magnesio, filtrato e concentrato sotto vuoto. Il prodotto è stato purificato mediante HPLC (eluente *n*-esano/EtOAc 96:4), portando a 2.4 mg del composto **8b**. Seguendo la stessa procedura, il composto **8a** (1.4 mg, 5×10^{-3} mmol) è stato trattato con periodinano (5 mg, 1×10^{-2} mmol) per portare ad 1.0 mg del composto **8b**.

Composto 8b. Olio incolore. $[\alpha]_D^{25} = +9$ ($c = 2$ mg/mL in CHCl_3). IR (KBr): $\nu_{\max} = 3350, 1713$ cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, C_6D_6): δ 5.19 (dt, $J = 14.5, 7.0$ Hz, 1 H, 10-H); 5.04 (dd, $J = 14.5, 9.0$ Hz, 1 H, 9-H); 4.90 (s, 1 H, 6-OH); 3.57 (s, 3 H, 18-H₃); 3.42 (s, 2 H, 2-H₂); 2.50 (m, 1 H, 4-H); 1.87 (sovrapposto, 8-H); 1.87 (sovrapposto, 11-H₂); 1.51 (dd, $J = 13.0, 3.5$ Hz, 1 H, 7a-H); 1.47 (sovrapposto, 5a-H); 1.45 (sovrapposto, 7b-H); 1.37 (m, 1 H, 13a-H); 1.36 (m, 1 H, 16a-H); 1.16 (sovrapposto, 13b-H); 1.11 (sovrapposto, 5b-H); 1.05 (s, 3 H, 15-H₃); 1.03 (sovrapposto, 16b-H); 0.87 (t, $J = 7.0$ Hz, 3 H, 12-H₃), 0.81 (t, $J = 6.3$ Hz, 3 H, 14-H₃), 0.57 (t, $J = 7.3$ Hz, 3 H, 17-H₃) ppm. FABMS: $m/z = 313$ $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Riduzione del legame cicloperossidico della plakortina: la plakortina (**1**, 35 mg, 0,11 mmol) in 200 μ L di etere anidro è stata trattata con 200 μ L di acido acetico e con un eccesso (80 mg) di polvere di Zn e dopo agitata vigorosamente per 24 ore a temperatura ambiente. Dopo la conferma della scomparsa del materiale di partenza attraverso TLC, la soluzione è stata neutralizzata Na_2CO_3 ed il solido è stato rimosso mediante filtrazione. Il solvente è stato evaporato ed il prodotto ottenuto è stato ripartito tra H_2O e CHCl_3 . La fase organica conteneva il composto **9** allo stato puro (29 mg, 0,092 mmol, resa 83,4%),.

Composto 9: Olio incolore. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -5$ ($c = 0.10$ in CHCl_3). ESMS: m/z 315 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 337 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. EIMS: m/z 296 ($\text{M} - 18$), 281 ($\text{M} - 33$). HREIMS: m/z 314.2467, calcolato per $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_4$ m/z 314.2457. ^1H NMR (CDCl_3): δ 5.53 (H-10, dt, $J = 15.2, 6.2$ Hz); 5.21 (H-9, dd, $J = 15.2, 9.0$ Hz); 4.16 (H-3, dt, $J = 10.4, 2.1$ Hz); 3.70 (H₃-18, s); 2.46 (H-2a, dd, $J = 15.9, 10.4$ Hz); 2.34 (H-2b, dd, $J = 15.9, 2.1$ Hz); 2.13 (H-8, m); 2.03 (H₂-11, q, $J = 6.2$ Hz); 1.91 (H-4, m); 1.67 (H-5a, dd, $J = 13.5, 9.8$ Hz); 1.55 (H-7a, overlapped); 1.53 (H-7b, sovrapposto); 1.38 (H-13a, m); 1.35 (H-5b, sovrapposto); 1.27 (H-16a, m); 1.21 (H-13b, m); 1.17 (H₃-15, s); 1.13 (H-16b, m); 0.98 (H₃-12, t, $J = 6.2$ Hz); 0.92 (H₃-17, t, $J = 7.3$ Hz); 0.84 (H₃-14, t, $J = 6.3$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 173.7 (C-1); 134.8 (C-9); 133.8 (C-10); 73.0 (C-6); 70.6 (C-3); 51.7 (OCH_3); 49.7 (C-7); 40.8 (C-8); 40.7 (C-5); 40.5 (C-4); 36.6 (C-2); 29.7 (C-13); 26.8 (C-15); 26.4 (C-16); 25.6 (C-11); 13.7 (C-12); 12.3 (C-17); 11.5 (C-14).

Riduzione del gruppo estereo della plakortina: la plakortina (**1**, 100 mg, 0,32 mmol) è stata sciolta in 3,0 mL THF anidro sotto atmosfera inerte di argon ad un a 0 °C e dopo sono state aggiunte goccia a goccia alla soluzione 450 μ L di una soluzione 2 M di LiBH_4 in THF (0,9 mmol) e 30 μ L di MeOH anidro. La reazione è stata tenuta sotto agitazione per 2 h a 0 °C. Dopo, alla miscela ottenuta, sono stati aggiunti 30 μ L di una soluzione acquosa 1 M di NaOH, che è stata poi ripartita tra acqua e CHCl_3 . La fase organica, anidrificata con Na_2SO_4 e concentrata sottovuoto è stata purificata mediante HPLC (LUNA SI60 250 \times 4 eluente *n*-esano/EtOAc 75:25) ottenendo il composto puro **10** (78 mg, 0,28 mmol, resa 87,5%).

Composto 10: Olio incolore. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 55$ ($c = 0.10$ in CHCl_3). ESMS: m/z 285 $[\text{M} + \text{H}]^+$,

307 [M + Na]⁺. EIMS: m/z 284 (M), 266 (M – 18). HREIMS: m/z 284.2339, calcolato per C₁₇H₃₂O₃ m/z 284.2351. ¹H NMR (CDCl₃): δ 5.36 (H-10, dt, $J = 16.3, 6.6$ Hz); 5.09 (H-9, dd, $J = 16.3, 9.5$ Hz); 4.08 (H-3, m); 3.81 (H₂-1, t, $J = 6.0$ Hz); 2.16 (H-2a, sovrapposto); 2.08 (H-4, sovrapposto); 2.03 (H-8, sovrapposto); 1.99 (H₂-11, q, $J = 6.6$ Hz); 1.49 (H-2b, ddd, $J = 13.8, 6.0, 4.3$ Hz); 1.44 (H-7a, sovrapposto); 1.40 (H-5a, sovrapposto); 1.37 (H₃-15, s); 1.36 (H-16a, sovrapposto); 1.32 (H-5b, sovrapposto); 1.27 (H-13a, m); 1.23 (H-7b, sovrapposto); 1.15 (H-16b, sovrapposto); 1.15 (H-13b, sovrapposto); 0.95 (H₃-12, t, $J = 6.3$ Hz); 0.87 (H₃-14, t, $J = 6.6$ Hz); 0.79 (H₃-17, t, $J = 6.6$ Hz). ¹³C NMR (CDCl₃): δ 134.3 (C-9); 132.0 (C-10); 81.5 (C-6); 80.5 (C-3); 60.5 (C-1); 46.4 (C-7); 39.9 (C-8); 34.7 (C-4); 34.3 (C-5); 29.9 (C-16); 29.2 (C-13); 26.8 (C-2); 25.2 (C-11); 21.0 (C-15); 13.7 (C-12); 11.1 (C-17); 11.0 (C-14).

Metilazione del composto 10: Il composto **10** (25 mg, 0.088 mmol) è stato sciolto in CH₂Cl₂ anidro (3 mL) a 0 °C e in un eccesso di 2,6-di-*terz*-butilpiridina (130 µL) e sono stati aggiunti goccia a goccia alla soluzione 50 µL (0.44 mmol) di metiltrifluorometansolfonato. La miscela è stata fatta reagire sotto agitazione per una notte e dopo è stata trattata con una soluzione satura di NaHCO₃. La fase organica anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata sottovuoto è stata purificata mediante HPLC (LUNA SI60 250 × 4 eluente *n*-esano/EtOAc 85:15) ottenendo il composto puro **11** (20 mg, 0.067 mmol, resa 76.1%).

Composto 11: Olio incolore. $[\alpha]_D^{25} + 75$ ($c = 0.10$ in CHCl₃). ESMS: m/z 299 [M + H]⁺, 321 [M + Na]⁺. EIMS: m/z 298 (M), 266 (M – 32). HREIMS: m/z 298.2500, calcolato per C₁₈H₃₄O₃ m/z 298.2509. ¹H NMR (CDCl₃): δ 5.36 (H-10, dt, $J = 16.3, 6.6$ Hz); 5.10 (H-9, dd, $J = 16.3, 9.5$ Hz); 4.06 (H-3, m); 3.53 (H₂-1, m); 3.34 (OCH₃, s) 2.16 (H-2a, overlapped); 2.12 (H-2b, overlapped); 2.09 (H-4, overlapped); 2.03 (H-8, overlapped); 1.99 (H₂-11, q, $J = 6.6$ Hz); 1.50 (H-7a, overlapped); 1.43 (H-5a, dd, $J = 13.8, 4.3$ Hz); 1.37 (H₃-15, s); 1.36 (H-16a, overlapped); 1.32 (H-7b, overlapped); 1.27 (H-13a, m); 1.24 (H-5b, dd, $J = 13.8, 6.9$ Hz); 1.15 (H-13b, overlapped); 1.14 (H-16b, overlapped); 0.96 (H₃-12, t, $J = 6.6$ Hz); 0.87 (H₃-14, t, $J = 6.6$ Hz); 0.80 (H₃-17, t, $J = 6.6$ Hz). ¹³C NMR (CDCl₃): δ 134.3 (C-9); 131.4 (C-10); 81.1 (C-6); 79.0 (C-3); 69.4 (C-1); 58.8 (OCH₃); 46.5 (C-7); 40.1 (C-8); 34.8 (C-4); 34.7 (C-5); 29.8 (C-13); 29.6 (C-16); 25.5 (C-2); 25.0

(C-11); 21.4 (C-15); 13.8 (C-12); 11.3 (C-14); 11.1 (C-17).

Acetilazione del composto 10: Il composto **10** (20 mg, 0.070 mmol) è stato sciolto in piridina anidra (1 mL) ed è stato trattato con Ac₂O (1 mL). Dopo una notte, il work-up della reazione è stato eseguito mediante addizione di poche gocce di metanolo per neutralizzare l'eccesso di Ac₂O, acqua (ca. 5 mL) ed EtOAc (ca. 15 mL). La fase organica è stata lavata sequenzialmente con H₂SO₄ 2N, una soluzione satura di NaHCO₃ sale. Dopo anidificazione con Na₂SO₄ e rimozione del solvente, sono stati ottenuti 22.0 mg (0.069 mmol) di composto **12**.

Composto 12: Olio incolore. $[\alpha]_D^{25} + 47$ (c = 0.10 in CHCl₃). ESMS: m/z 327 [M + H]⁺, 350 [M + Na]⁺. EIMS: m/z 326 (M), 266 (M - CH₃COOH). HREIMS: m/z 326.2466, calcolato per C₁₉H₃₄O₄ m/z 326.2457. ¹H NMR (CDCl₃): δ 5.36 (H-10, dt, $J = 16.3, 6.6$ Hz); 5.09 (H-9, dd, $J = 16.3, 9.6$ Hz); 4.27 (H-1a, m); 4.21 (H-1b, m); 4.04 (H-3, m); 2.23 (H-2a, m); 2.10 (H-4, overlapped); 2.03 (H-8, overlapped); 2.03 (OCOCH₃, s); 1.99 (H₂-11, q, $J = 6.6$ Hz); 1.59 (H-2b, overlapped); 1.41 (H-7a, overlapped); 1.37 (H₃-15, s); 1.36 (H-16a, overlapped); 1.34 (H-5a, overlapped); 1.29 (H-5b, overlapped); 1.26 (H-13a, overlapped); 1.15 (H-7b, overlapped); 1.15 (H-16b, overlapped); 1.13 (H-13b, overlapped); 0.96 (H₃-12, t, $J = 6.6$ Hz); 0.88 (H₃-14, t, $J = 6.6$ Hz); 0.80 (H₃-17, t, $J = 6.6$ Hz). ¹³C NMR (CDCl₃): δ 171.1 (CH₃CO); 134.2 (C-9); 131.3 (C-10); 81.2 (C-6); 78.6 (C-3); 61.7 (C-1); 46.5 (C-7); 40.1 (C-8); 34.8 (C-4); 34.5 (C-5); 30.3 (C-16); 29.8 (C-13); 25.4 (C-11); 23.9 (C-2); 21.5 (CH₃CO); 21.1 (C-15); 14.0 (C-12); 11.4 (C-14); 11.0 (C-17).

Scissione ossidativa della plakortina: Ad una soluzione di plakortina (120 mg, 0.385 mmol) in 40 mL di *t*-BuOH sono stati aggiunti 26 mL di una soluzione 0.04 M di Na₂CO₃ e 150 mL di una soluzione acquosa di KMnO₄ 0.023 M e 0.09 M di NaIO₄. La reazione è stata eseguita a 37 °C per 20 h sotto agitazione. Dopo acidificazione con H₂SO₄ 5 N, la soluzione è stata decolorata con una soluzione satura di acido ossalico ed estratta con dietilere (200 mL, per due volte). Le fasi organiche combinate sono state anidificate con Na₂SO₄, filtrate e dopo concentrate sottovuoto. La frazione ottenuta è stata purificata mediante HPLC (LUNA, SI60, eluente *n*-esano/EtOAc 65:35) ottenendo il composto **13**

(90 mg, 0.289 mmol, resa 75%) allo stato puro.

Composto 13: Solido amorfo. $[\alpha]_D^{25} + 80$ ($c = 0.10$ in CHCl_3). ESMS: m/z 303 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 325 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. EIMS: m/z 302 (M). HREIMS: m/z 302.1735, calcolato per $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_6$ m/z 302.1729. ^1H NMR (CDCl_3): δ 4.50 (H-3, m); 3.70 (OCH_3 , s); 3.01 (H-2a, dd, $J = 15.9, 10.4$ Hz); 2.50 (H-8, m); 2.36 (H-2b, dd, $J = 15.9, 2.1$ Hz); 2.19 (H-4, m); 2.02 (H-7a, dd, $J = 13.5, 9.8$ Hz); 1.62 (H-10a, m); 1.54 (H-10b, overlapped); 1.50 (H-7b, overlapped); 1.45 (H-5a, overlapped); 1.37 (H_3 -12, s); 1.34 (H-5b, overlapped); 1.22 (H-13a, m); 1.14 (H-13b, m); 0.92 (H_3 -11, t, $J = 6.6$ Hz); 0.90 (H_3 -14, t, $J = 6.6$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 181.9 (C-9); 172.2 (C-1); 80.0 (C-6); 78.9 (C-3); 51.9 (OCH_3); 42.8 (C-7); 41.6 (C-8); 34.7 (C-4); 34.4 (C-5); 31.3 (C-2); 27.1 (C-10); 24.9 (C-13); 20.9 (C-12); 11.2 (C-11); 11.0 (C-14).

Metilazione del composto 13: A 40 mg di composto **13** (0,132 mmol) sono state aggiunte gocce di una soluzione satura di CH_2N_2 in Et_2O . Dopo rimozione del solvente organico il residuo è stato purificato mediante HPLC (eluente *n*-esano/ EtOAc 95:5, flusso 0.8 mL/min) portando al composto puro **14** (41 mg, 0.130 mmol).

Composto 14: Olio incolore. $[\alpha]_D^{25} + 108$ ($c = 0.10$ in CHCl_3). ESMS: m/z 317 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 339 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. EIMS: m/z 316 (M). HREIMS: m/z 316.1895, calcolato per $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_6$ m/z 316.1886. ^1H NMR (CDCl_3): δ 4.50 (H-3, m); 3.70 (OCH_3 , s); 3.69 (OCH_3 , s); 3.00 (H-2a, dd, $J = 15.9, 10.4$ Hz); 2.48 (H-8, m); 2.36 (H-2b, dd, $J = 15.9, 2.1$ Hz); 2.19 (H-4, m); 2.02 (H-7a, dd, $J = 13.5, 9.8$ Hz); 1.60 (H-10a, m); 1.52 (H-7b, overlapped); 1.48 (H-10b, overlapped); 1.44 (H-5a, overlapped); 1.35 (H_3 -12, s); 1.34 (H-5b, overlapped); 1.22 (H-13a, m); 1.14 (H-13b, m); 0.90 (H_3 -14, t, $J = 6.6$ Hz); 0.88 (H_3 -11, t, $J = 6.6$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 176.8 (C-9); 172.2 (C-1); 80.1 (C-6); 78.7 (C-3); 51.9 (OCH_3); 51.6 (OCH_3); 41.9 (C-7); 41.6 (C-8); 34.7 (C-4); 34.3 (C-5); 31.3 (C-2); 27.5 (C-10); 25.0 (C-13); 21.0 (C-12); 11.5 (C-11); 11.0 (C-14).

Epossidazione della plakortina: Plakortina (110 mg, 0.353 mmol) è stata sciolta in 4 mL di CH_2Cl_2 anidro ed alla soluzione sono stati aggiunti 84 mg di acido *meta*-

cloroperbenzoico (0.494 mmol), lasciando reagire per tutta la notte a temperatura ambiente. Successivamente la miscela di reazione è stata ripartita tra CHCl_3 ed una soluzione acquosa satura di NaHCO_3 . La fase organica, anidrificata e concentrata sottovuoto, è stata purificata mediante HPLC (LUNA, SI60, eluente *n*-esano/EtOAc 9:1) ottenendo il composto **15** (41 mg, 0.125 mmol, resa 35%) ed il composto **16** (45 mg, 0.137 mmol, resa 39%) allo stato puro.

Composto 15: Olio incolore. $[\alpha]_D^{25} + 63$ ($c = 0.10$ in CHCl_3). ESMS: m/z 329 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 351 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. EIMS: m/z 328 (M), 312 (M – 16). HREIMS: m/z 328.2257, calcolato per $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_5$ m/z 328.2250. ^1H NMR (CDCl_3): δ 4.51 (H-3, m); 3.71 (OCH_3 , s); 2.95 (H-2a, dd, $J = 15.7, 10.5$ Hz); 2.73 (H-10, bd, $J = 1.7$ Hz); 2.52 (H-9, dd, $J = 7.0, 1.7$ Hz); 2.37 (H-2b, dd, $J = 15.7, 3.5$ Hz); 2.20 (H-4, m); 1.60 (H-7a, overlapped); 1.58 (H-5a, overlapped); 1.56 (H-8, overlapped); 1.55 (H_2 -11, overlapped); 1.47 (H-7b, overlapped); 1.45 (H-5b, overlapped); 1.38 (H_3 -15, s); 1.36 (H-13a, overlapped); 1.34 (H-16a, overlapped); 1.21 (H-13b, m); 1.15 (H-16b, m); 0.99 (H_3 -12, t, $J = 7.8$ Hz); 0.94 (H_3 -14, t, $J = 7.8$ Hz); 0.92 (H_3 -17, t, $J = 7.8$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 171.9 (C-1); 80.4 (C-6); 78.6 (C-3); 62.4 (C-10); 59.6 (C-9); 51.7 (OCH_3); 41.8 (C-7); 36.8 (C-8); 35.3 (C-5); 34.9 (C-4); 31.4 (C-2); 26.2 (C-11); 25.1 (C-13); 25.0 (C-16); 21.5 (C-15); 11.0 (C-17); 10.7 (C-14); 9.9 (C-12).

Composto 16: Olio incolore. $[\alpha]_D^{25} + 48$ ($c = 0.10$ in CHCl_3). ESMS: m/z 329 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 351 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. EIMS: m/z 328 (M), 312 (M – 16). HREIMS: m/z 328.2242, calcolato per $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_5$ m/z 328.2250. ^1H NMR (CDCl_3): δ 4.51 (H-3, m); 3.71 (OCH_3 , s); 3.02 (H-2a, dd, $J = 15.7, 9.6$ Hz); 2.73 (H-10, dt, $J = 5.2, 1.7$ Hz); 2.44 (H-9, dd, $J = 7.8, 1.7$ Hz); 2.38 (H-2b, dd, $J = 15.7, 3.5$ Hz); 2.18 (H-4, m); 1.64 (H-7a, dd, $J = 14.0, 4.4$ Hz); 1.58 (H-5a, overlapped); 1.57 (H_2 -11, overlapped); 1.56 (H-8, overlapped); 1.56 (H-13a, overlapped); 1.47 (H-7b, dd, $J = 14.0, 4.4$ Hz); 1.45 (H-5b, m); 1.36 (H_3 -15, s); 1.33 (H-13b, m); 1.20 (H-16a, overlapped); 1.18 (H-16b, overlapped); 1.00 (H_3 -12, t, $J = 7.0$ Hz); 0.91 (H_3 -14, t, $J = 7.0$ Hz); 0.90 (H_3 -17, t, $J = 7.0$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 171.9 (C-1); 80.4 (C-6); 78.9 (C-3); 62.7 (C-9); 61.0 (C-10); 52.0 (OCH_3); 43.7 (C-7); 38.2 (C-8); 36.3 (C-5); 34.8 (C-4); 31.3 (C-2); 25.2 (C-11); 25.1 (C-13); 24.8 (C-16); 20.2 (C-15); 11.2 (C-17); 11.2 (C-14); 10.2 (C-12).

Riduzione del composto 16: Il composto **16** (28 mg, 0.085 mmol) è stato sciolto in dietilere ed alla soluzione sono stati aggiunti 10 equiv. di LiAlH_4 lasciando reagire per 3 h a temperatura ambiente.. Dopo completamento della reazione, la miscela ottenuta è stata ripartita tra H_2O e cloroformio. L'evaporazione del solvente dalla fase organica ha portato ad una miscela di sostanze purificate poi mediante HPLC (LUNA, SI60, eluente EtOAc) portando ai composti **17a** (13 mg, 0.043 mmol, resa 51%) and **17b** (10 mg, 0.033 mmol, resa 39%) allo stato puro.

Composto 17a: Solido amorfo. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +15$ ($c = 0.10$ in CHCl_3). ESMS: m/z 305 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 327 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. EIMS: m/z 286 ($\text{M} - 18$), 304 (M). HREIMS: m/z 304.2607, calcolato per $\text{C}_{17}\text{H}_{36}\text{O}_4$ m/z 304.2614. ^1H NMR (CDCl_3): 4.18 (H-3, m); 4.16 (H-10, m); 3.83 (H_2 -1, t, $J = 6.0$ Hz); 2.19 (H-2a, m); 1.97 (H-8, m); 1.91 (H-4, m); 1.75 (H-9a, overlapped); 1.73 (H-11a, overlapped); 1.68 (H-9b, overlapped); 1.67 (H-5a, dd, $J = 13.5, 9.8$ Hz); 1.57 (H-11b, overlapped); 1.55 (H_2 -7, overlapped); 1.52 (H-2a, ddd, $J = 13.8, 6.0, 4.3$ Hz); 1.39 (H-13a, m); 1.36 (H-5b, overlapped); 1.27 (H-16a, m); 1.21 (H-13b, m); 1.19 (H_3 -15, s); 1.13 (H-16b, m); 0.93 (H_3 -12, t, $J = 7.3$ Hz); 0.92 (H_3 -17, t, $J = 7.3$ Hz); 0.87 (H_3 -14, t, $J = 7.3$ Hz).

Composto 17b: Solido amorfo. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +19$ ($c = 0.10$ in CHCl_3). ESMS: m/z 305 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 327 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. EIMS: m/z 286 ($\text{M} - 18$), 304 (M). HREIMS: m/z 304.2627, calcolato per $\text{C}_{17}\text{H}_{36}\text{O}_4$ m/z 304.2614. ^1H NMR (CDCl_3): 4.22 (H-9, m); 4.18 (H-3, m); 3.83 (H_2 -1, t, $J = 6.0$ Hz); 2.18 (H-2a, m); 2.00 (H-8, m); 1.92 (H-4, m); 1.67 (H-5a, dd, $J = 13.5, 9.8$ Hz); 1.65 (H-10a, overlapped); 1.62 (H-10b, overlapped); 1.58 (H_2 -7, overlapped); 1.52 (H-2a, ddd, $J = 13.8, 6.0, 4.3$ Hz); 1.39 (H-13a, m); 1.36 (H-5b, overlapped); 1.27 (H_2 -11, overlapped); 1.27 (H-16a, overlapped); 1.21 (H-13b, m); 1.19 (H_3 -15, s); 1.13 (H-16b, m); 0.92 (H_3 -17, t, $J = 7.3$ Hz); 0.89 (H_3 -12, t, $J = 7.3$ Hz); 0.88 (H_3 -14, t, $J = 7.3$ Hz).

Preparazione degli esteri MTPA dal composto 17a: Il composto **17a** (4 mg) è stato sciolto in 1.0 mL di piridina anidra, trattata con cloruro (-)-MTPA (15 μL), *N,N*-dimetilamminopiridina (DMAP, una punta di spatola), e dopo mantenuta sotto agitazione e a temperatura ambiente per una notte. Dopo evaporazione del solvente, la miscela di

reazione è stata purificata mediante HPLC su colonna SI60 (eluente *n*-esano/EtOAc 95:5), portando all'estere (*S*)-MTPA **18a** allo stato puro (4.4 mg). Usando il cloruro (+)-MTPA, attraverso la stessa procedura è stato ottenuto l'estere (*R*)-MTPA **18b** nella stessa resa.

Estere (*S*)-MTPA (18a): Solido amorfo. ESI-MS (matrice glicerolo, ioni positivi): m/z 975 $[M + Na]^+$. 1H NMR ($CDCl_3$): δ 7.35 e 7.45 (MTPA protoni fenilici); 5.73 (H-10, m); 5.63 (H-3, m); 4.29 (H₂-1, m); 3.59 (MTPA OCH₃); 2.20 (H-2a, m); 2.00 (H-2b, m); 1.84 (H-8, overlapped); 1.82 (H-9a, overlapped); 1.75 (H-9b, m); 1.62 (H₂-11, m); 1.60 (H-4, m); 1.18 (H-5a, overlapped); 1.12 (H-16a, overlapped); 1.11 (H-7a, overlapped); 1.05 (H₂-13, overlapped); 1.03 (H-7b, overlapped); 0.98 (H-5b, overlapped); 0.95 (H-16b, overlapped); 0.86 (H₃-15, s); 0.63 (H₃-12, t, $J = 7.3$ Hz); 0.62 (H₃-17, t, $J = 7.3$ Hz); 0.55 (H₃-14, t, $J = 7.3$ Hz).

Estere (*R*)-MTPA (18b): Solido amorfo. ESI-MS (matrice glicerolo, ioni positivi): m/z 975 $[M + Na]^+$. 1H NMR ($CDCl_3$): δ 7.32 e 7.55 (MTPA protoni fenilici); 5.71 (H-10, m); 5.68 (H-3, m); 4.25 (H₂-1, m); 3.59 (MTPA OCH₃); 2.17 (H-2a, m); 1.95 (H-2b, m); 1.80 (H-9a, overlapped); 1.76 (H-8, overlapped); 1.73 (H-4, m); 1.70 (H-9b, m); 1.68 (H-11a, m); 1.65 (H-11b, m); 1.36 (H-5a, dd, $J = 14.3, 6.7$ Hz); 1.25 (H-16a, overlapped); 1.21 (H-7a, overlapped); 1.13 (H-7b, overlapped); 1.12 (H-16b, overlapped); 1.12 (H₂-13, overlapped); 1.11 (H-5b, overlapped); 1.00 (H₃-15, s); 0.73 (H₃-17, t, $J = 7.3$ Hz); 0.72 (H₃-12, t, $J = 7.3$ Hz); 0.55 (H₃-14, t, $J = 7.3$ Hz).

Reazione della diidroplakortina (2) : La diidroplakortina (**2** 21.4 mg, $8 \cdot 10^{-2}$ mmol) è stata fatta reagire sotto atmosfera inerte per azoto con $FeCl_2 \cdot 4 H_2O$ (0.4 mmol) in 5 mL una miscela $CH_3CN:H_2O$ 8:2. La reazione è stata eseguita sotto agitazione per 2 ore a temperatura ambiente in assenza di luce ed è stata monitorata mediante TLC. Il prodotto della reazione è stato ripartito tra H_2O e Et_2O aggiungendo EDTA per complessare il ferro in eccesso. La fase eterea (12 mg) è stata cromatografata mediante HPLC utilizzando una colonna Luna silica (2) 5 μ e come miscela eluente *n*-esano-EtOAc 8:2. Flusso 0.8 mL/min. Sono stati ottenuti i composti **3a** (2.4 mg), **3b** (2.9 mg), **4a** e **4b**.

Composto 3a. Olio incolore. $[\alpha]_D^{25} -18$ ($c = 1.0$ mg/mL in CHCl_3). IR (KBr): ν_{\max} 3350, 2975 cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 4.14 (m, sovrapposto); 3.71 (s); 3.61 (dq, $J = 5.6$ Hz, $J = 6.0$ Hz, 13-H); 2.40 (m, 2a H); 2.35 (m, 2bH); 2.03 (dd, $J = 12.3$ Hz, $J = 7.0$, 7a-H); 1.89 (m, 4-H); 1.77 (m, 8-H); 1.61 (sovrapposto, 5a-H); 1.60 (m, sovrapposto, 10a-H); 1.45 (m, 9a-H); 1.42 (m, 5b-H); 1.39 (sovrapposto, 7b-H); 1.31 (sovrapposto, 16a-H); 1.29 (sovrapposto, 11a,b-H); 1.24 (sovrapposto, 10b-H); 1.22 (s, 15-H₃); 1.21 (d, $J = 6.0$ Hz, 14-H₃); 1.14 (sovrapposto, 9b-H); 0.93 (t, $J = 6.9$ Hz, 17-H₃); 0.92 (t, $J = 6.9$ Hz, 12-H₃); HR-EIMS: m/z 337 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Composto 4a. Olio incolore. $[\alpha]_D^{25} -18$ ($c = 1.0$ mg/mL in CHCl_3). IR (KBr): ν_{\max} 3350, 2975 cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 4.53 (dq, $J = 1.5$, 6.9 Hz, 13-H); 4.19 (m, 3a); 3.72 (s, OCH_3); 2.56 (dd, $J = 16.4$, $J = 10.5$, 2a-H); 2.37 (dd, $J = 16.4$, $J = 2.0$, 2b-H); 1.97 (m, 4-H); 1.83 (m, 8-H); 1.77 (dd, $J = 14.2$, 5.6 Hz, 7a-H); 1.67 (dd, $J = 14.4$, 9.0, 5a-H); 1.45 (d, $J = 6.9$, 14-H); 1.41 (sovrapposto, 9a-H); 1.31 (sovrapposto, 7b-H); 1.31 (sovrapposto, 9b-H); 1.29 (sovrapposto 11-H); 1.29 (sovrapposto 5b-H); 1.26 (sovrapposto, 16a-H); 1.17 (s, 15-H); 1.17 (sovrapposto 16b-H); 0.93 (t, $J = 7.2$ Hz, 17-H); 0.90 (t, $J = 7.2$ Hz, 12-H); FABMS: m/z 329 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Test antimalarici. Le colture di plasmodio sono state realizzate come descritto da Trager e Jensen.²⁷ In breve, il ceppo D-10, sensibile alla cloroquina e moderatamente resistente alla meflochina, ed il ceppo W-2, resistente alla cloroquina e sensibile alla meflochina, sono stati tenuti in coltura a 37° al 5% di ematocrito (cellule rosse del sangue umane, A-positivo). Il mezzo di coltura RPMI 1640 è addizionato del 10% di plasma umano A-positivo inattivato al calore, 20mM di HEPES e 2mM di glutammina. Tutte le colture sono state mantenute in una miscela gas standard costituita dal 1% di ossigeno, 5% di anidride carbonica e il 94% di azoto. Quando il livello di parassitemia superava il 5% nuove sub-colture erano prese. Il mezzo di coltura è stato cambiato ogni due giorni. I composti in esame sono stati disciolti in acqua, (cloroquina) o in DMSO (gli altri). I composti in esame sono stati posti in micropiastre e quindi diluiti col mezzo di coltura per raggiungere le concentrazioni finali (in ogni caso concentrazioni finali di DMSO non superiore all'1%, che risulta tossico per il parassita). Colture asincrone con parassitemia di 1/1.5% e di ematocrito finale pari a 1% sono state divise in al quote e

incubate in piastre per 72 ore a 37°C. La crescita dei parassiti è stata determinata spettrofotometricamente misurando l'attività dell'enzima lattato deidrogenasi del parassita (pLDH) sia in piastre trattate con i composti in esame che in piastre di controllo secondo quanto descritto da Makler.^{28,29} L'attività antimalarica è stata espressa come il 50% della concentrazione inibitoria (IC₅₀, µM); tale valore di IC₅₀ è la media e la deviazione standard di quattro esperimenti effettuati per tre volte.

Studi di “Molecular Modeling”. I calcoli di “Molecular modeling” sono stati eseguiti su SGI Origin 200 8XR12000, mentre I grafici di “molecular modeling” sono stati trasferiti su stazioni di lavoro SGI Ottano 2 and Ottano. La Plakortina (**1**), I composti **2-16** e **19-20** sono stati costruiti usando il modulo Builder Insight 2005. Il calcolo dei valori di pK_a apparenti dei composti studiati di recente sono stati calcolati usando la versione 9.00 del software ACD/pKa DB (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada). Il composto **13** è stato considerato deprotonato mentre tutti gli altri composti sono stati considerati neutri in tutti i calcoli effettuati, come conseguenza della valutazione della percentuale di forme neutre/ionizzate calcolate a pH 7.2 (valore fisiologico di pH) e 5.5 (pH del vacuolo del parassita) usando l'equazione di Handerson-Hasselbac. Lo spazio conformazionale di tutti i composti è stato campionato attraverso 500 cicli di “Simulated Annealing” (CFF91 campo di forza,³⁰ ε= 80*r) seguendo questo protocollo: il sistema è stato riscaldato fino a 1000K su 2000 fs (timestep = 3.0), la temperatura di 1000 K è stata applicata al sistema per 2000 fs (timestep = 3.0) con lo scopo di superare le barriere torsionali; successivamente la temperatura è stata ridotta gradualmente a 300 K in 1000 fs (timestep = 1.0). Le strutture risultanti sono state sottoposte a minimizzazione di energia nel modulo Insight 2005 (CFF91 campo di forza, gradiente algoritmico coniugato; ε=80*r) fino al massimo derivato RMS meno di 0.001 kcal/Å. e successivamente forzati dalla loro energia conformazionale e torsionale a determinati valori angolari. Allo scopo di analizzare correttamente le proprietà elettroniche, I loro conformeri più stabili sono stati sottoposti ad ottimizzazione completa della geometria attraverso calcoli semiempirici usando il metodo quanto-meccanico AM1 con il programma Mopac 6.0³¹ nel modulo Ampac/Mopac di Insight 2000.1. Il valore GNORM è stato settato a 0.5. Per estendere la completa ottimizzazione della geometria i criteri per la terminare tutte le

ottimizzazioni sono state incrementate di un fattore di 100, usando la parola chiave PRECISE. Il conformero a più bassa energia della Plakortina (**1**) è stato sovrapposto alla struttura a raggi x dell'artemisinina (CSDS code: QNGHSU) adattando l'anello 1,2-diossanico a quello 1,2,4- triossanico.

V. E. DATI SPETTROSCOPICI

Tabella 1. Dati ^1H e ^{13}C NMR dei composti **5** e **6** (in CDCl_3).

Pos.	5		6	
	δC , molt.	δH , molt., J in Hz	δC , molt.	δH , molt., J in Hz
1	174.2, C		174.0, C	
2	37.4, CH_2	2.42 ^[a]	37.4, CH_2	2.40 ^[a]
3	70.3, CH	4.09, m	70.0, CH	4.11, m
3-OH		3.37, bd, 2.5	81.8, CH	3.38, bd, 2.5
4	43.2, CH	2.05, m	43.2, CH	2.03 ^[a]
5a	48.1, CH_2	2.17, dd, 10.5, 3.5	47.9, CH_2	2.09, dd, 10.5, 3.5
b		2.02 ^[a]		2.00 ^[a]
6	158.5, C		158.2 C	
7	125.2, CH	6.03, s	125.5, CH	6.08, s
8	201.0, C	1.48 ^[a]	201.2, C	
9a	41.3, CH_2	2.63, dd, 14.5, 4.2	41.3, CH_2	2.61, dd, 14.5, 4.2
9b		2.40 ^[a]		2.38 ^[a]
10	39.4, CH	2.08, m	30.3, CH	1.43, m
11	134.4, CH	5.06, dd, 15.4, 7.3	34.2, CH_2	1.21 ^[a]
12	131.2, CH	5.39, dt, 15.4, 6.6	29.0, CH_2	1.23 ^[a]
13	22.2, CH_2	1.98 ^[a]	21.9, CH_2	1.26 ^[a]
14	14.0, CH_3	0.94, t, 7.3	13.1, CH_3	0.89, t, 7.3
15a	26.6, CH_2	1.40, m	26.6, CH_2	1.36, m
b		1.30, m		1.27 ^[a]
16	13.1, CH_3	0.90, t, 7.3	13.1, CH_3	0.87, t, 7.3
17	21.1, CH_3	2.09, s		2.08, s
18a	28.1, CH_2	1.39, m	27.9, CH_2	1.36, m
b		1.18, m		1.19 ^[a]
19	12.2, CH_3	0.84, t, 7.3	12.2, CH_3	0.84, t, 7.3
20	52.1, CH_3	3.72, s	52.0, CH_3	3.70, s

^[a] Sovrapposto con altri segnali

Tabella 2. Dati ^1H e ^{13}C NMR del plakortide **7** e del composto **8** (in CDCl_3).

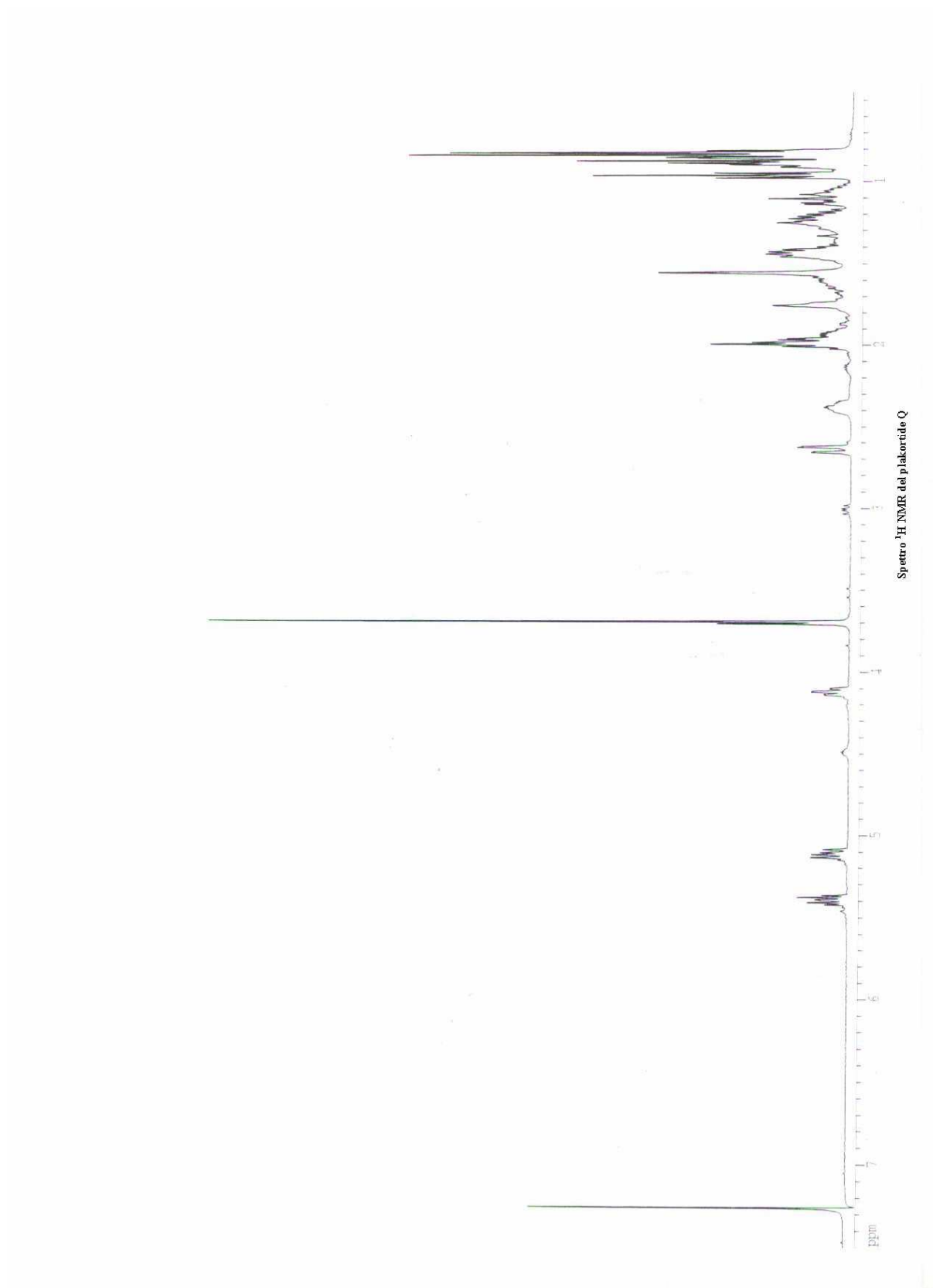
Pos.	7		8	
	δC , molt.	δH , molt., J in Hz	δC , molt.	δH , molt., J in Hz
1	170.8, C		171.0, C	
2a	36.4, CH_2	2.64, dd, 15.5, 3.5	36.9, CH_2	2.66, dd, 15.5, 3.5
b		2.37, dd, 15.5, 8.8		2.38, dd, 15.5, 8.8
3	81.9, CH	4.11, dt, 8.8, 8.8, 3.5	81.8, CH	4.15, dt, 8.8, 8.8, 3.5
4	35.6, CH	1.60, m	36.6, CH_2	1.62, m
5a	37.4, CH_2	1.46 ^[a]	39.3, CH_2	1.49 ^[a]
b		1.23, dd, 13.8, 7.4		1.25, dd, 13.8, 7.4
6	83.2, C		82.5, C	
7a	45.8, CH_2	1.75, dd, 14.5, 3.5	46.8, CH_2	1.78, dd, 14.5, 3.5
b		1.48 ^[a]		1.46 ^[a]
8	40.1, CH	1.96 ^[a]	40.4, CH	2.01 ^[a]
9	134.4, CH	5.10, dd, 15.6, 7.0	134.9, CH	5.10, dd, 15.6, 7.0
10	131.8, CH	5.39, dt, 15.6, 7.0	131.6, CH	5.37, dt, 15.6, 7.0
11	25.5, CH_2	1.99 ^[a]	25.8, CH_2	1.99 ^[a]
12	13.8, CH_3	0.96, t, 7.3	14.0, CH_3	0.97, t, 7.3
13a	29.6, CH_2	1.43 ^[a]	29.8, CH_2	1.43 ^[a]
b		1.20, m		1.20, m
14	11.5, CH_3	0.82, t, 7.3	11.7, CH_3	0.80, t, 7.3
15a	29.8, CH_2	1.56, m	21.3, CH_3	1.32, s
b		1.41 ^[a]		
16a	7.4, CH_3	0.84, t, 7.3	24.0, CH_2	1.40 ^[a]
b				1.07, m
17a	23.8, CH_2	1.42 ^[a]	10.6, CH_3	0.88, t, 7.3
b		1.04, m		
18	10.6, CH_3	0.87, t, 7.3	51.5, CH_3	3.68, s
19	51.9, CH_3	3.69, s		

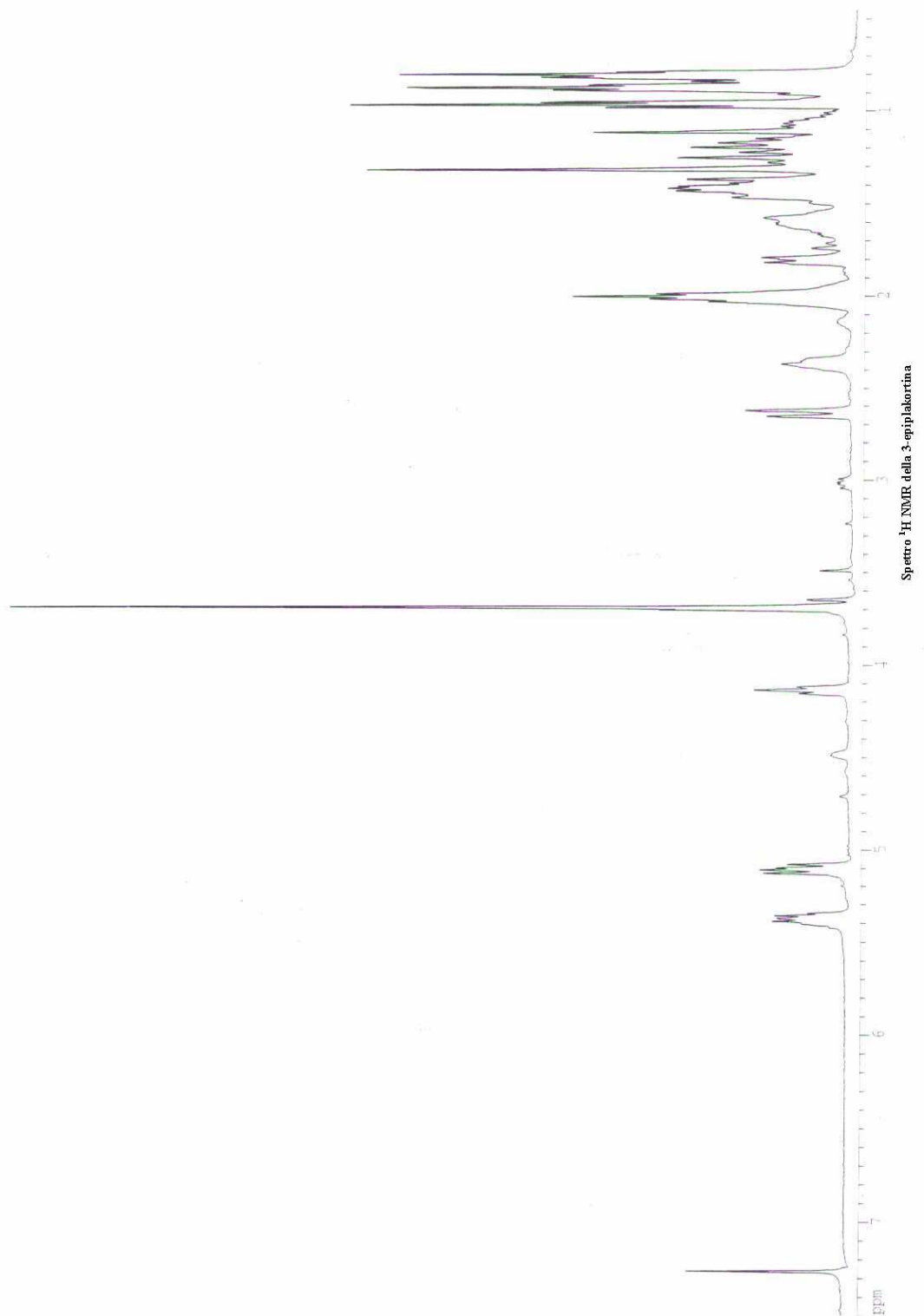
^[a] Sovrapposto con altri segnali

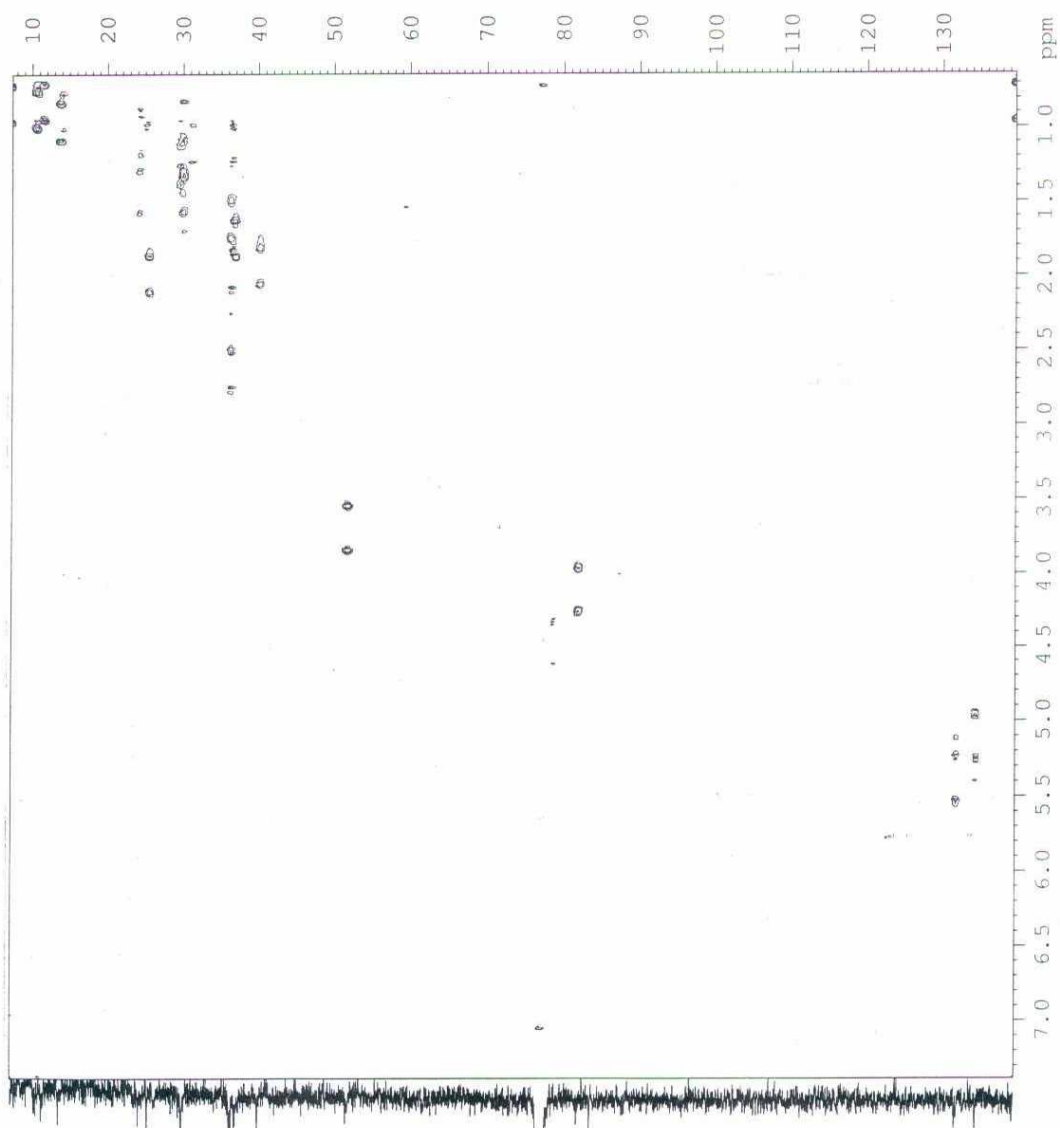
Tabella 3. Dati ^1H e ^{13}C NMR dei composti **3a** e **4a** (in CDCl_3).

Pos.	3a		4a	
	δC , molt.	δH , molt., J in Hz	δC , molt.	δH , molt., J in Hz
1	173.6, C		174.6, C	
2a	37.8, CH_2	2.40 ^[a]	37.4, CH_2	2.56, dd, 16.4, 10.5
b		2.35 ^[a]		2.37, dd, 16.4, 2.0
3	70.7, CH	4.14, m	70.8, CH	4.19, m
4	42.0, CH	1.89, m	40.1, CH	1.97, m
5a	42.4, CH_2	1.61 ^[a]	42.8, CH_2	1.67, dd, 14.4, 9.0
b		1.42 ^[a]		1.29 ^[a]
6	81.7, C		71.9, C	
7a	48.2, CH_2	2.03, dd, 12.3, 7.0	45.1, CH_2	1.77, dd, 14.2, 5.6
b		1.39 ^[a]		1.31 ^[a]
8	46.9, CH	1.77, m	41.3, CH	1.83, m
9a	28.5, CH_2	1.45 ^[a]	31.2, CH_2	1.41 ^[a]
b		1.14 ^[a]		1.31 ^[a]
10a	30.9, CH_2	1.60 ^[a]	30.3, CH_2	1.54, m
b		1.24 ^[a]		1.22 ^[a]
11	23.4, CH_2	1.29 ^[a]	23.4, CH_2	1.29 ^[a]
12	13.8, CH_3	0.92, t, 6.9	13.4, CH_3	0.90, t, 7.2
13	80.6, CH	3.61, dq, 5.6, 6.0	64.2, CH	4.53, dq, 6.9, 1.5
14	20.1, CH_3	1.21, d, 6.0	23.0, CH_3	1.45, d, 6.9
15	27.1, CH_3	1.22, s	26.4, CH_3	1.17, s
16a	26.8, CH_2	1.31 ^[a]	26.9, CH_2	1.26 ^[a]
b		1.14 ^[a]		1.17 ^[a]
17	12.6, CH_3	0.93, t, 6.9	12.6, CH_3	0.93, t, 7.2
-OMe	51.0, CH_3	3.71, s	51.0, CH_3	3.72, s

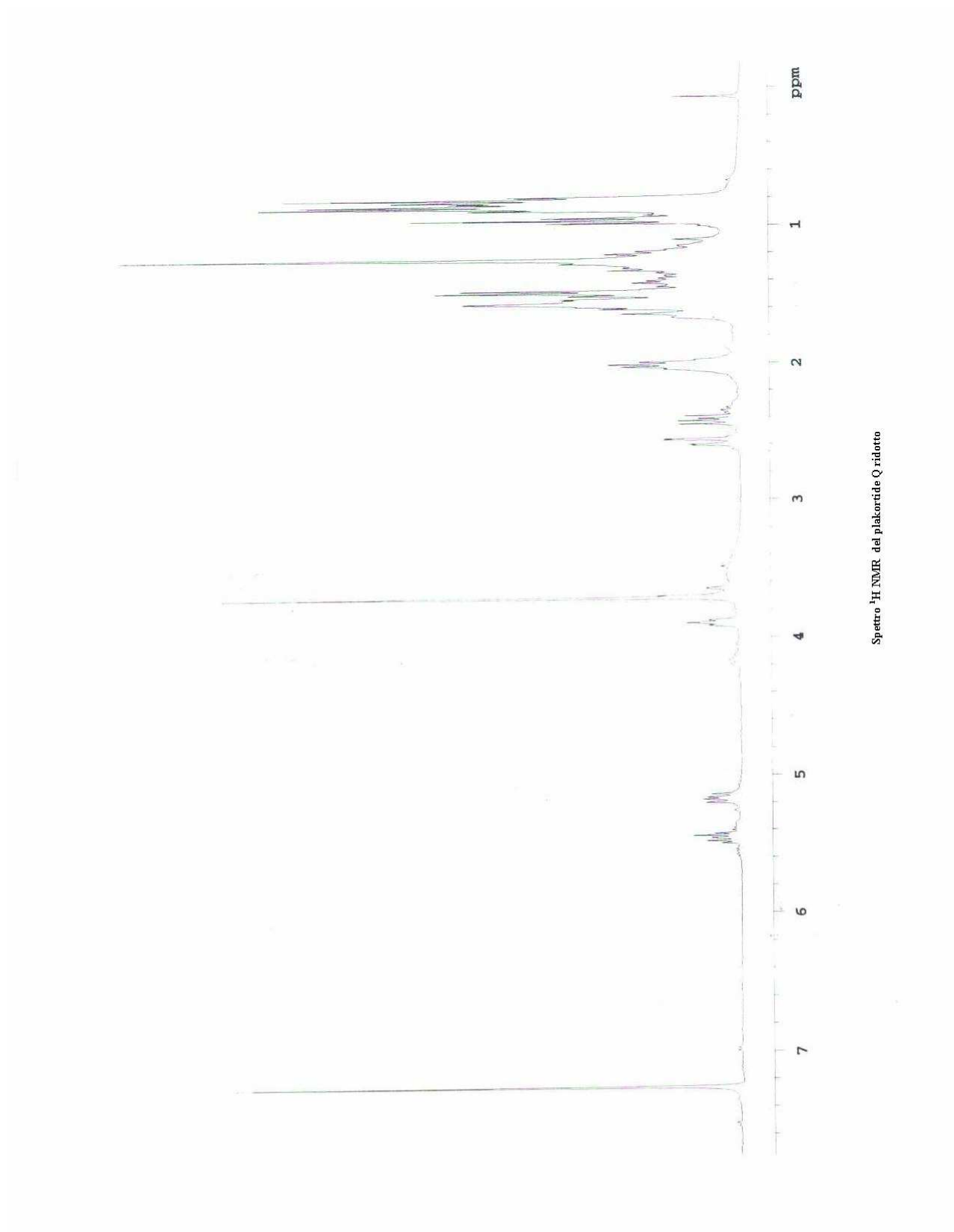
^[a] Sovrapposto con altri segnali.

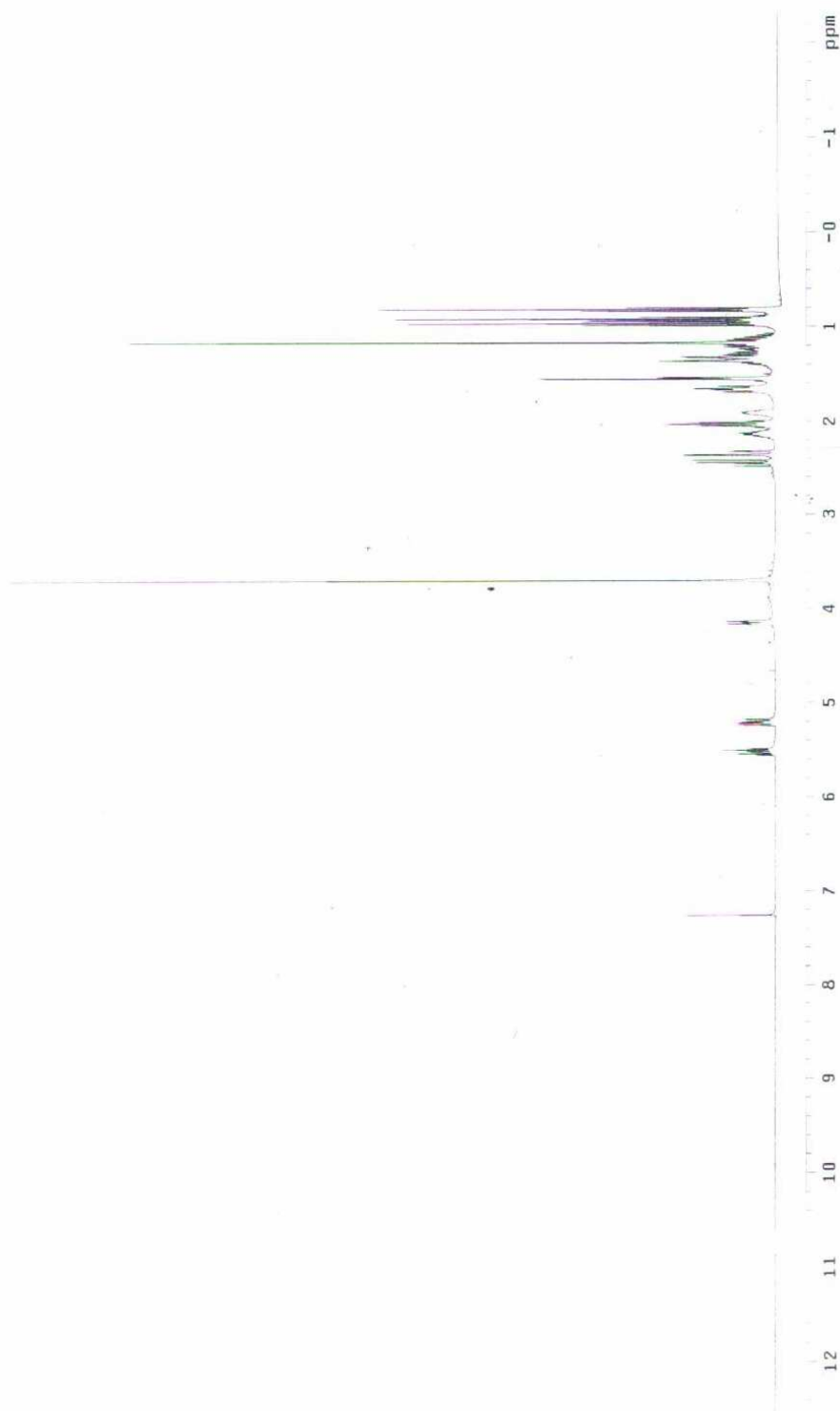




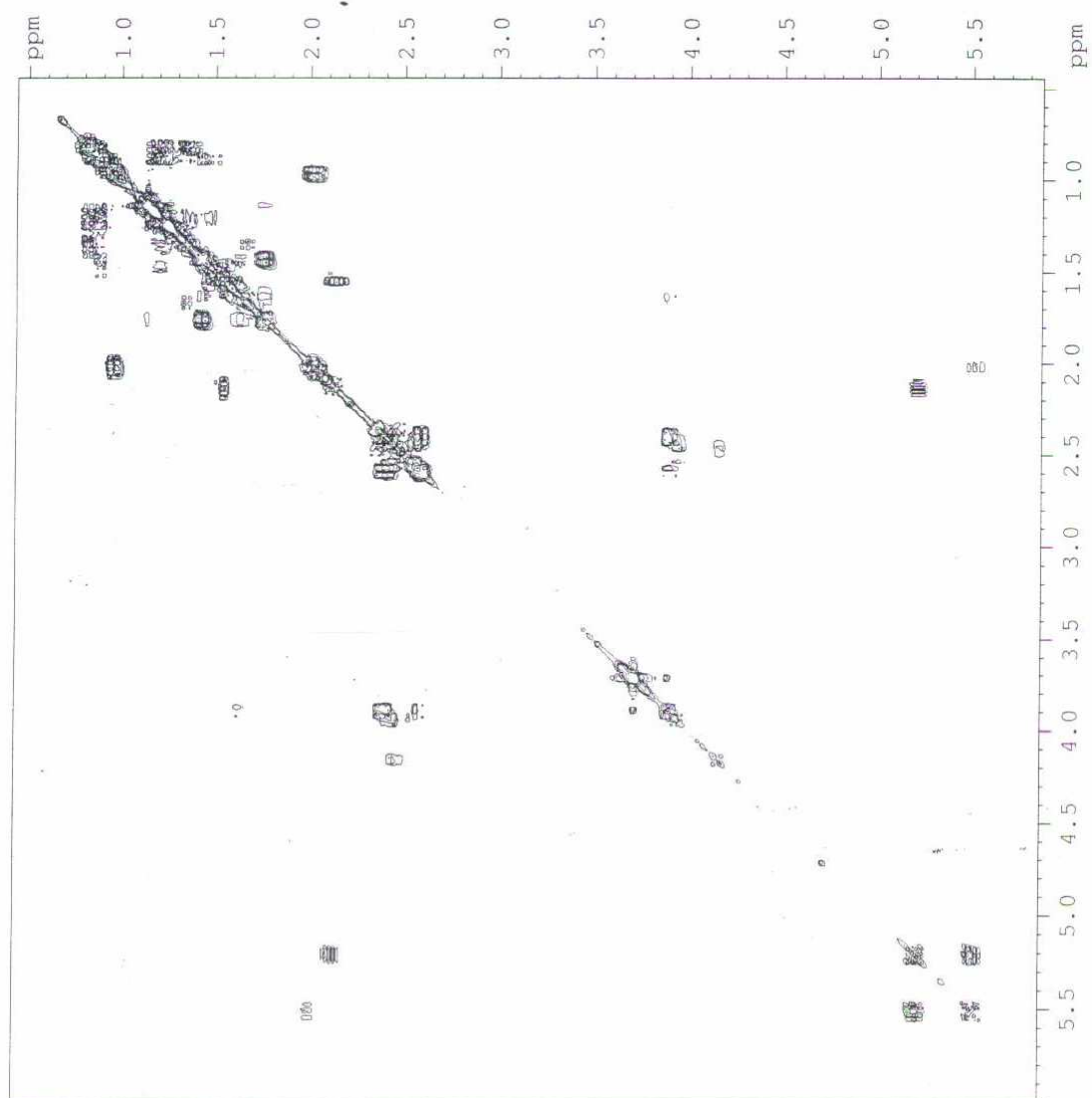


Spettro 2D NMR HSQC della 3-epiplakortina

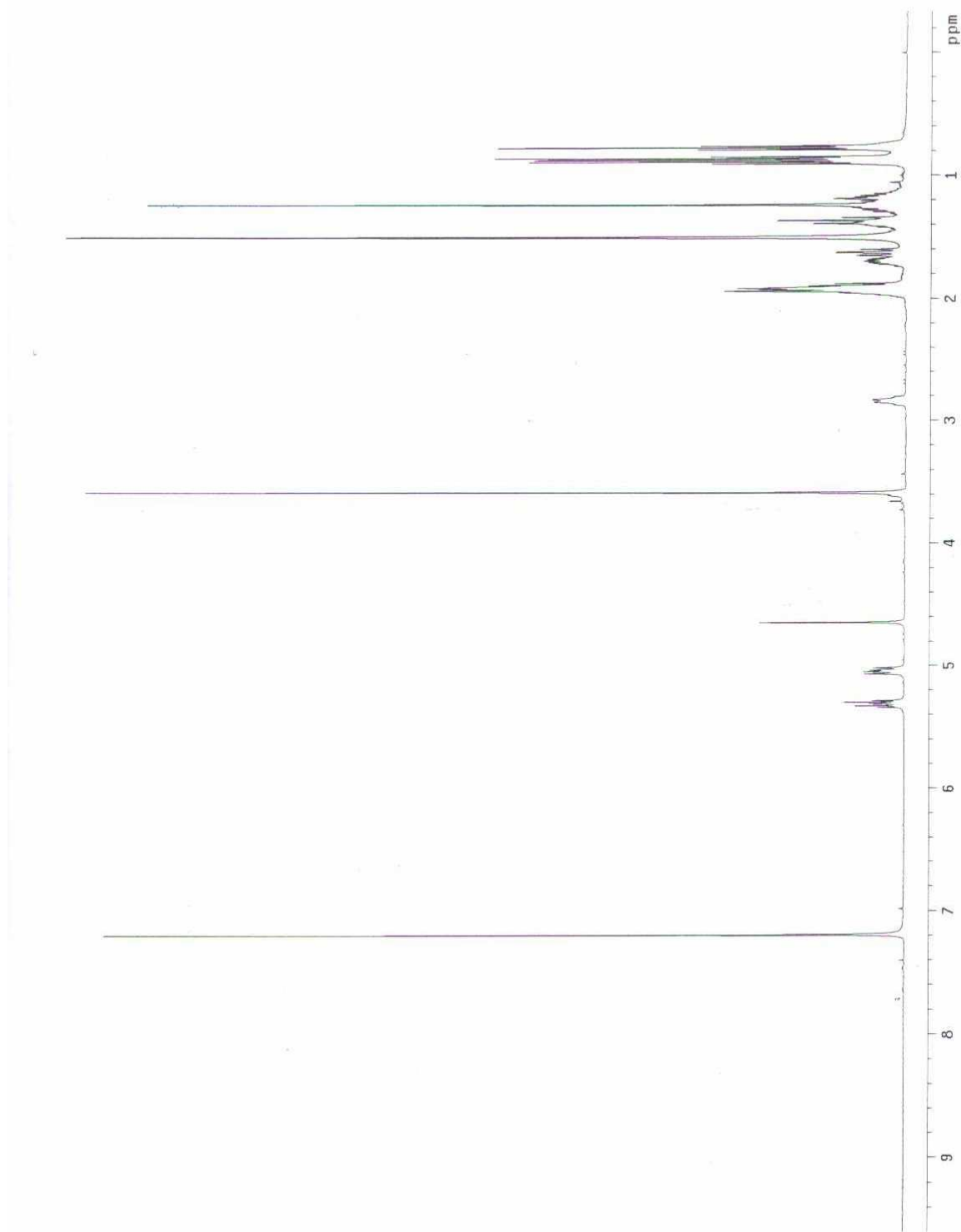


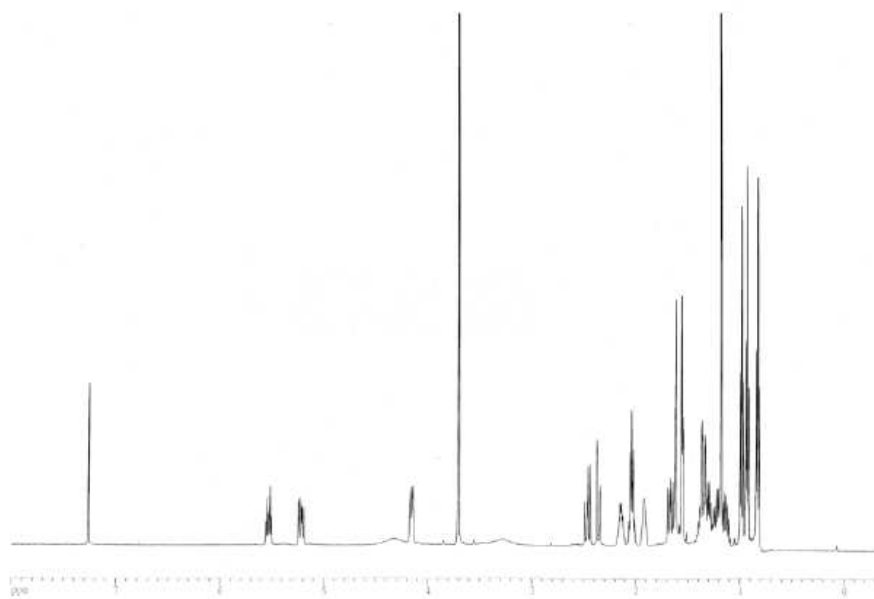
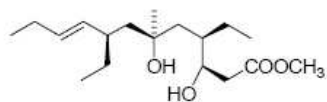


Spettro ¹H NMR della 3-epiplakortina ridotta

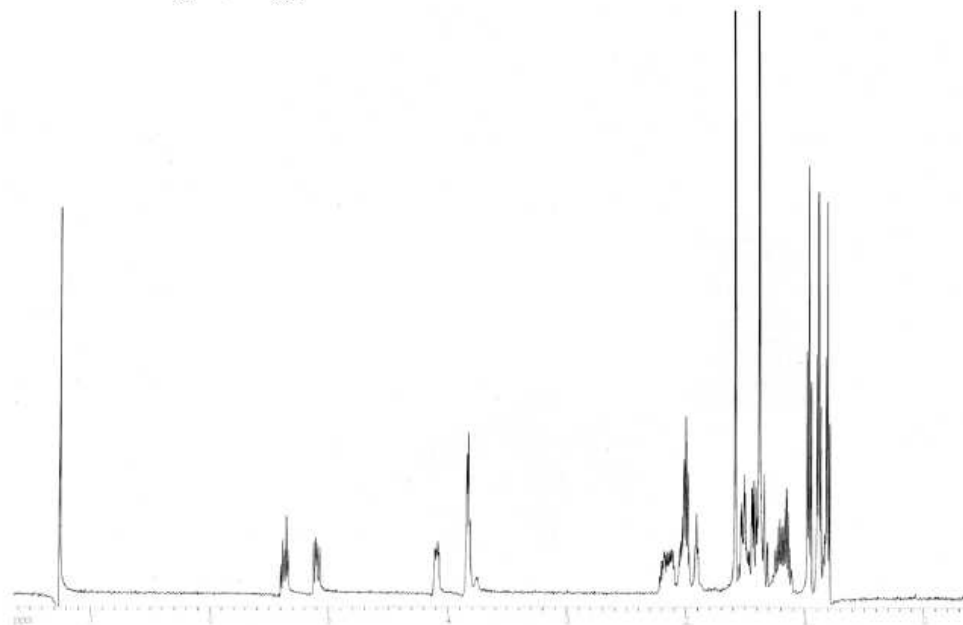
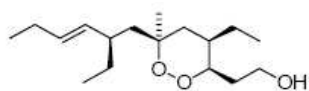


Spettro 2D NMR COSY della 3-epiplakortina ridotta

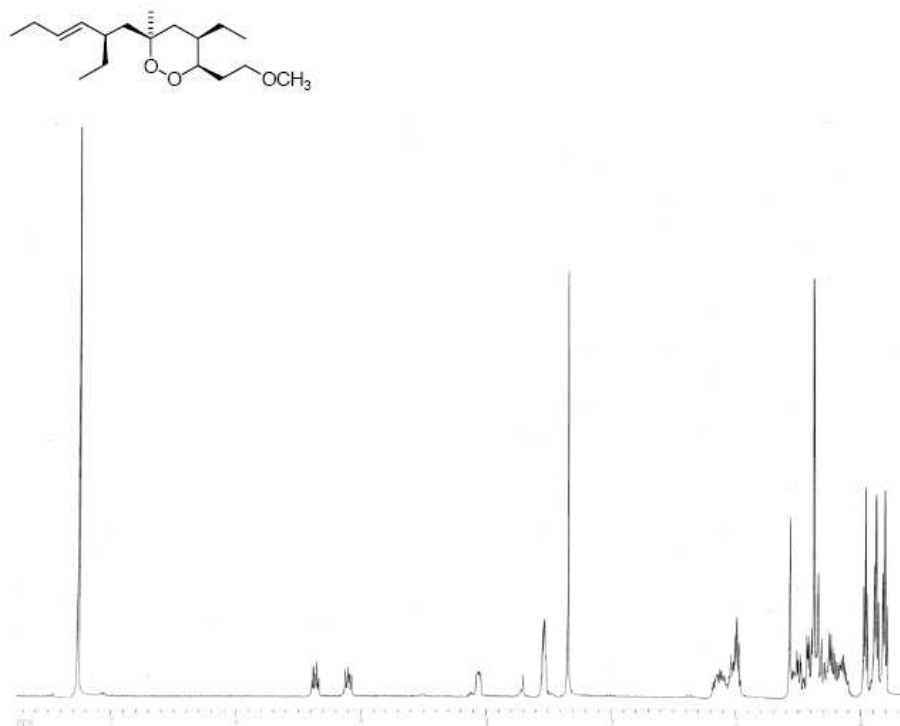




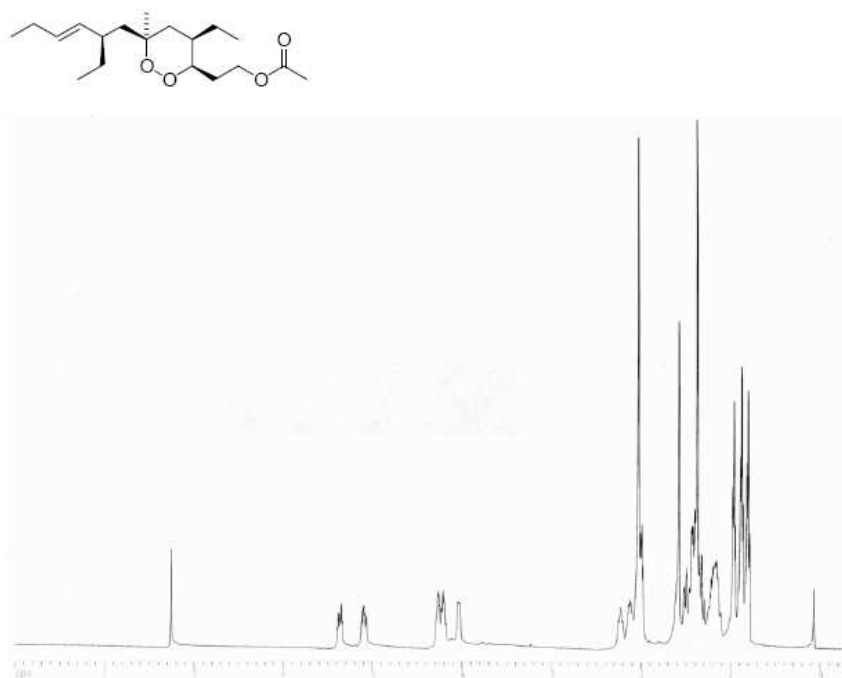
¹H NMR composto 9 (500 MHz, CDCl₃).



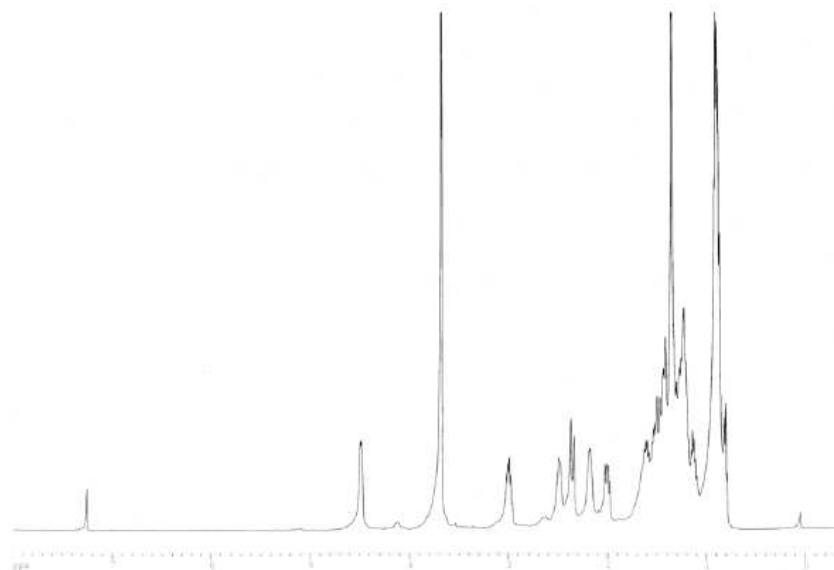
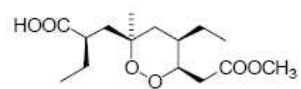
¹H NMR composto 10 (500 MHz, CDCl₃).



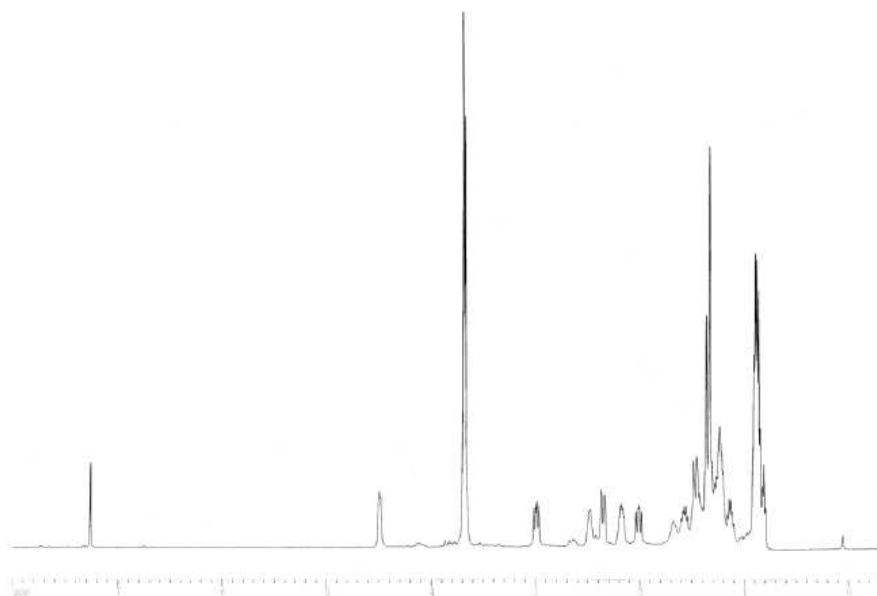
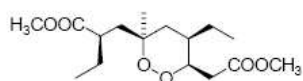
¹H NMR composto 11 (500 MHz, CDCl₃).



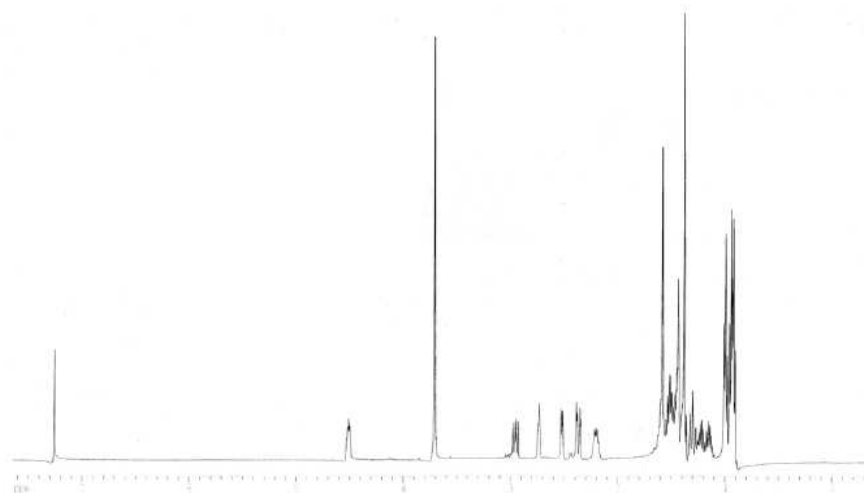
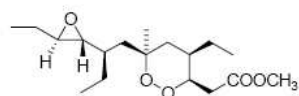
¹H NMR composto 12 (500 MHz, CDCl₃).



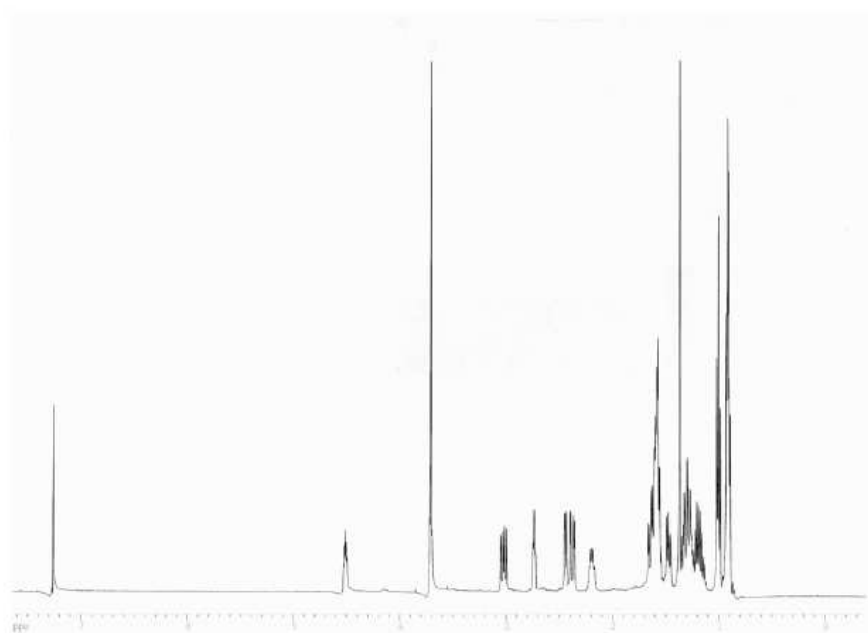
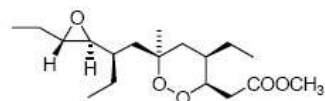
¹H NMR composto 13 (500 MHz, CDCl₃).



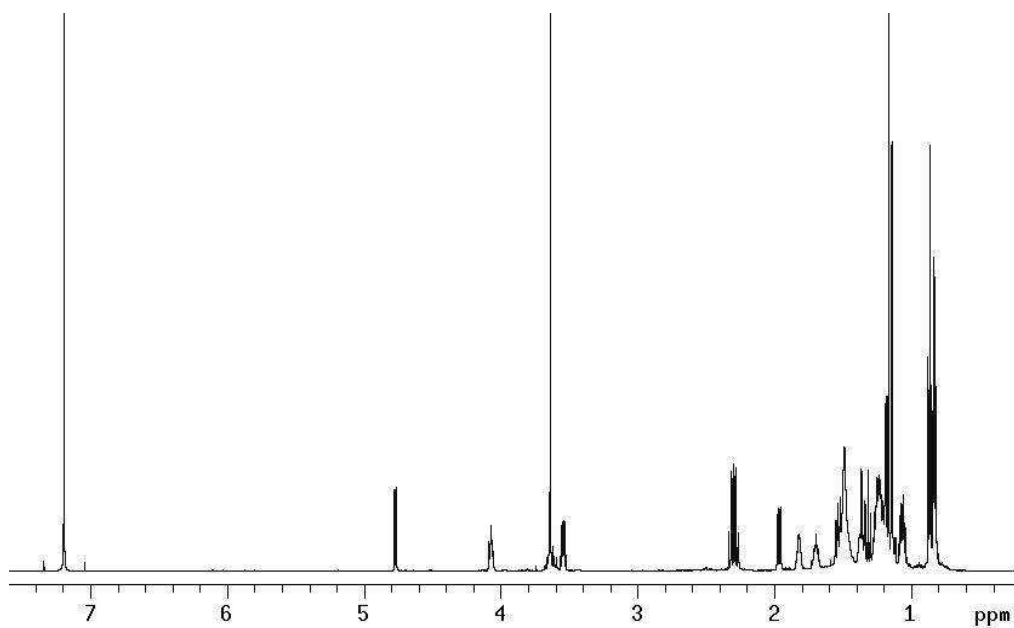
¹H NMR composto 14 (500 MHz, CDCl₃).



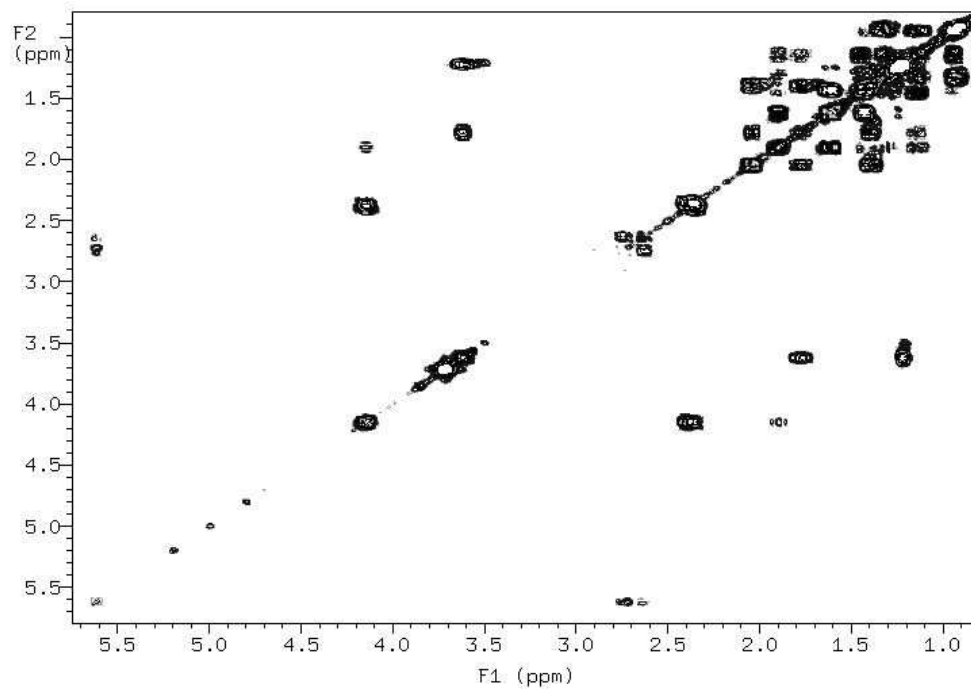
¹H NMR composto 15 (500 MHz, CDCl₃).



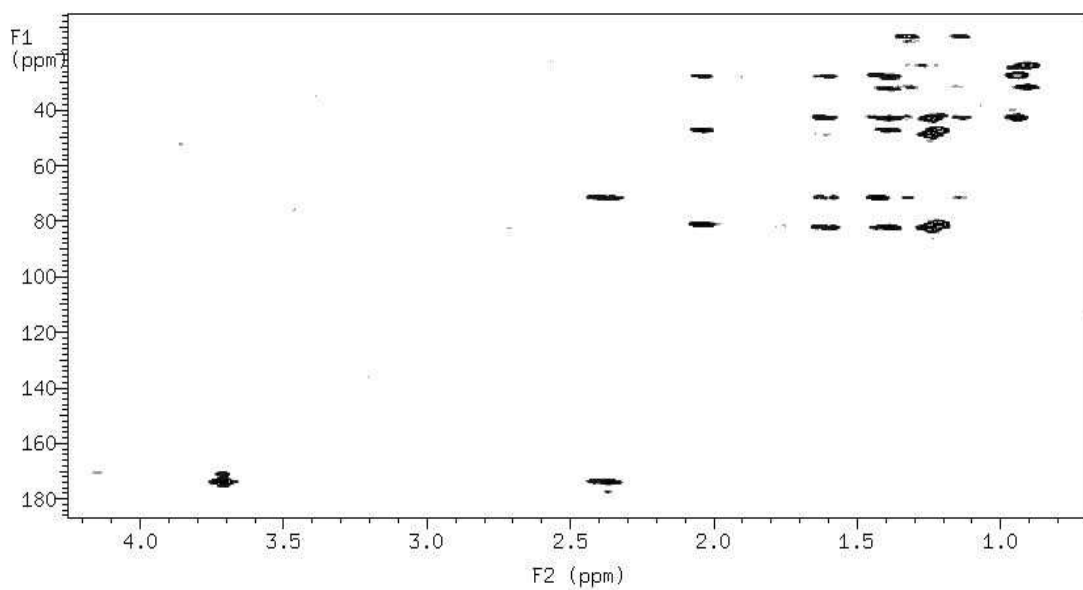
¹H NMR composto 16 (500 MHz, CDCl₃).



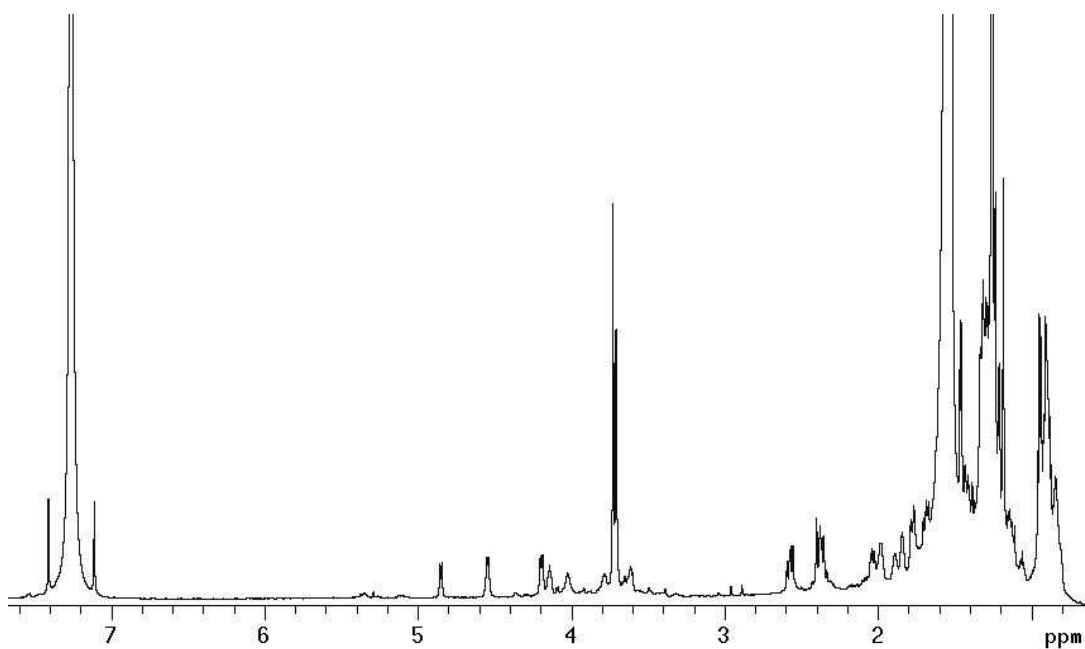
¹H composto 3a (500 MHz, CDCl₃).



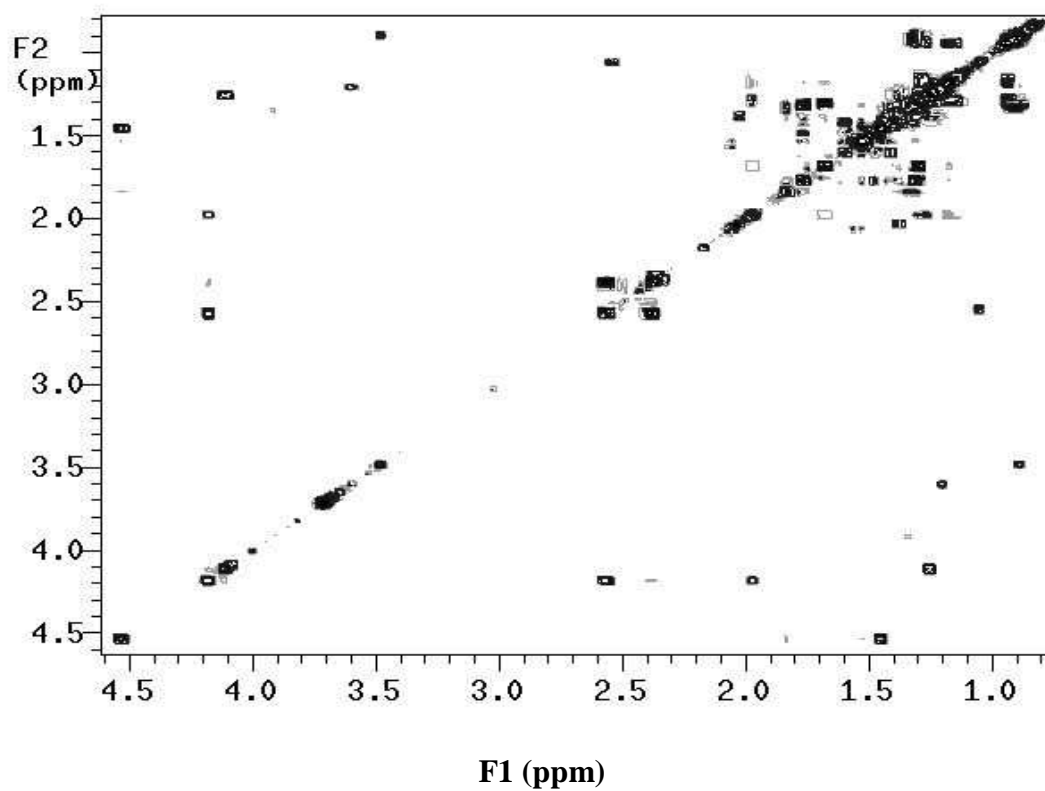
2D COSY NMR composto 3a (500 MHz, CDCl₃).



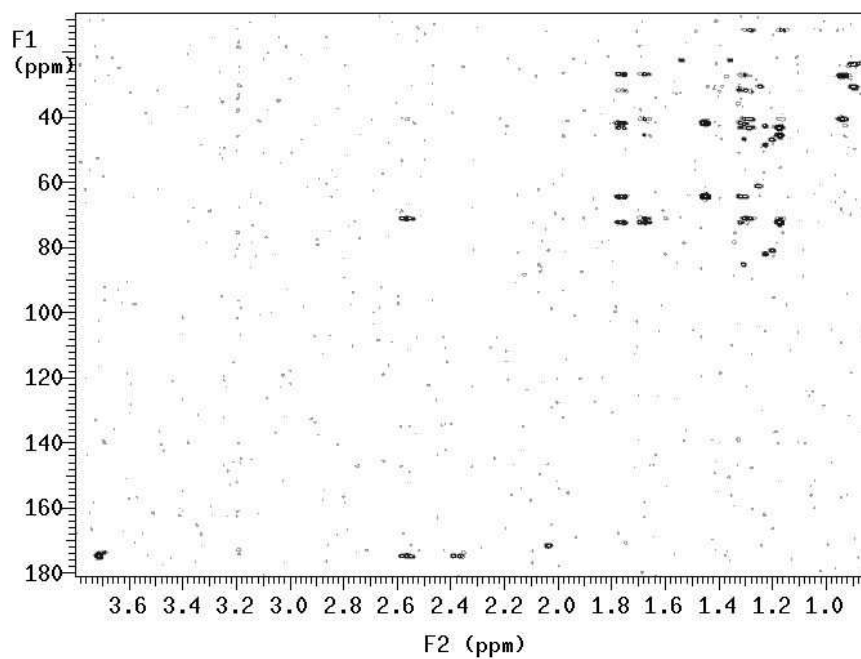
2D HMBC NMR composto 3a (500 MHz, CDCl₃).



¹H composto 4a (500 MHz, CDCl₃).



2D COSY NMR composto 4a (500 MHz, CDCl₃).



2D HMBC NMR composto 4a (500 MHz, CDCl₃).

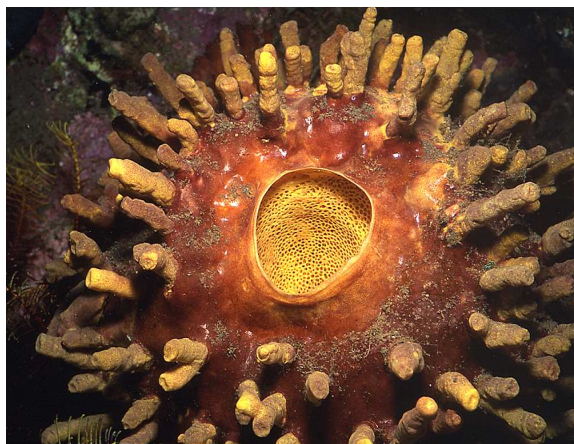
V. F. BIBLIOGRAFIA

1. Higgs, M., D.; Faulkner, D. J.; *J. Org. Chem.*, **1978**, *43*, 3454-3457.
2. Patil, A. D.; Freyer, A. J.; Bean, M. F.; Carte, B. K.; Westley, J. W.; Johnson, R. K.; *Tetrahedron*, **1996**, *52*, 377-394.
3. Phillipson, D. W.; Rinehart, K. L.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 7735.
4. Cafieri, F.; Fattorusso, E.; Taglialatela-Scafati, O.; Ianaro, A.; *Tetrahedron*, **1999**, 7045.
5. Patil, A. D.; Freyer, A. J.; Bean, M. F.; Carte, B. K.; Westley, J. W.; Johnson, R. K.; *Tetrahedron*, **1996**, *52*, 377-394.
6. West, R.; Mayne, C.; Ireland, C. M.; Brinen, L. J.; Clardy, J.; *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 3271.
7. Takeuchi, S.; Ishibashi, M.; Kobayashi, J.; *J. Org. Chem.*; **1994**, 3721.
8. Higgs, M., D.; Faulkner, D. J.; *J. Org. Chem.*, **1978**, *43*, 3454-3457.
9. Ramh, F.; Hayes, P. Y.; Kitching, W.; *Heterocycles*, **2004**, *64*, 523-575.
10. Stierle, D.; Faulkner, D. J.; *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 3396-3401.
11. Fattorusso, E.; Taglialatela-Scafati, O.; Ianaro, A.; Di Rosa, M.; *Tetrahedron*, **2000**, *56*, 7959-7967.
12. Othani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H.; *J. Am Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 4092-4096.
13. Dess, B.; Martin, J. C.; *J. Chem.*, **1983**, *48*, 4155-4156.
14. Stierle, D. B.; Faulkner, D. J.; *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 3396-3401.
15. Kubanek, J.; Andersen, R. J.; *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 6327-6330.
16. White, N., Olliaro, P.; *Parassitology Today*, **1996**, 399.
17. Gu, H., M., Lu, B., F., Qui, Z., X.; *Acta Pharm. Sinica*, **1980**, 48.
18. Eckeing-Ludwig, U.; Van Goethem, I. D. A.; Lee, A. G.; Kimura, M.; O'Neill, P. G.; Ward, S. A.; Krishina, S.; *Nature*, **2003**, *424*, 957-961.
19. Barluega, J.; Vazquez-Villa, H.; Ballesteros, A.; Gonzalez, J. M.; *Org. Lett.*; **2002**, *4*, 2817-2819.
20. Othani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H.; *J. Am Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 4092-4096.

21. Hu, J.-F.; Gao, H.-F.; Kelly, M.; Hamann, M. T. ; *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 9379-9383.
22. Fattorusso, E.; Parapini, S.; Campagnuolo, C.; Basilico, N.; Taglialatela-Scafati, O.; Taramelli, D.; *J. Antimicrob. Chemother.*, **2002**, *50*, 883-888.
23. Campagnuolo, C.; Fattorusso, E.; Romano, A.; Taglialatela-Scafati, O.; Basilico, N.; Parapini, S.; Taramelli, D.; *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 5077-5083.
24. a) Freeman, F.; Lee, C.; Hehre, W. J.; Po, H. N.; *J. Comp. Chem.*, **1997**, *18*, 1392-1406. b) Senthilkumar, K.; Kolandaivel, P.; *Comp. Biol. Chem.*, **2003**, *27*, 173-183.
25. Gu, H. M.; Lu, B. F.; Qui, Z. X. ; *Acta Pharm. Sinica*, **1980**, *48*.
26. Campagnuolo, C.; Fattorusso, E.; Taglialatela-Scafati, O.; Ianaro, A.; Pisano, B., *Eur. J. Org Chem.*, **2002**, 61-69.
27. Trager, W. ; Jensen, J. B. ; *Science*, **1976**, *193*, 673-675.
28. Makler, M.; Hinrichs, D.; *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **1993**, *48*, 205-210.
29. Parapini, S.; Basilico, N.; Mondani, M.; Olliaro, P.; Taramelli, D.; Monti, D.; *FEBS Lett.*, **2004**, *575*, 91-94.
30. Maple, J. R.; Hwang, M. J.; Stockfish, T. P.; Dinur, U; Waldman, M.; Ewig, C. S.; Hagler, A. T.; *J. Comput. Chem.* **1994**, *15*, 162-182.
31. Stewart, J. J. P.; *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1990**, *4*, 102-105.

VI. ANALISI DELLA SPUGNA *COELOCARTERIA SINGAPORENSIS*

Nel corso del mio dottorato di ricerca mi sono occupata dell'analisi del metabolismo secondario di una Demospongia; si tratta della spugna *Coelocarteria singaporensis* Leuconide appartenete alla famiglia delle Isodictyidae, ordine Poecilosclerida, subordine Mycalina.



Coelocarteria singaporensis

Questa si presenta come una spugna molto compatta, dura, ma friabile, strutturata inferiormente da un corpo emisferico che normalmente viene in parte nascosto nel sedimento, mentre superiormente da numerosi e ramificati osti inalanti e da un'ampia area cribrosa esalante che va a formare un unico largo osculo.

Coelocarteria singaporensis è stata raccolta nel 2003 nel Parco Marino di Bunaken nel Nord Sulawesi in Indonesia, dove vive in acque a circa 40 m di profondità. Comunemente la superficie della spugna è ricoperta da numerose specie epibionti e la spugna nel suo habitat risulta riconoscibile soltanto per gli osti e l'osculo che invece rimangono ben visibili. Le spugne appartenenti a tale famiglia hanno posto sempre alcuni problemi alle normali procedure di analisi a causa dalla loro organizzazione strutturale, per cui finora sono state poco studiate o con difficoltà.

Proprio l'assenza di dati sulla composizione chimica della spugna *Coelocarteria singaporensis*, insieme alle informazioni bibliografiche riportanti l'isolamento di derivati

purinici e triptofanici^{1,2} dalle poche altre specie di spugne appartenenti alla stessa famiglia Isodictya, hanno stimolato l'interesse del nostro gruppo di ricerca verso questo organismo.

Abbiamo dunque analizzato l'estratto organico (metanolico) della spugna indonesiana *Coelocarteria singaporensis* isolando due nuovi diterpeni *ent*-isocopalanici, chiamati coelodiolo (**1**) ed acido coeloico (**2**)(**Figura 1**), quest'ultimo differente dal primo per una estesa degradazione ossidativa dell'anello A.

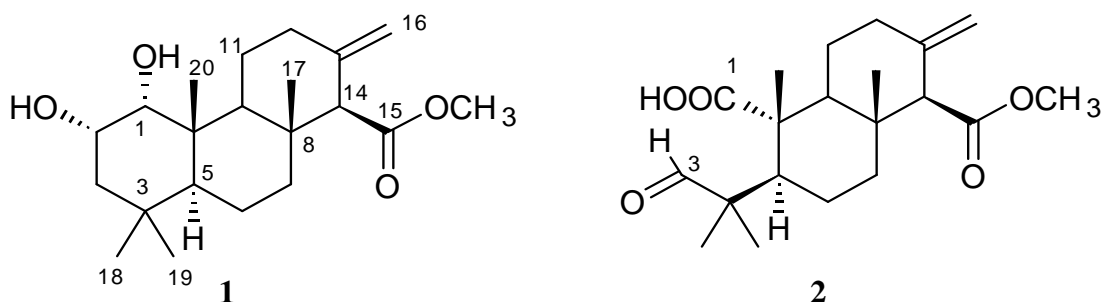
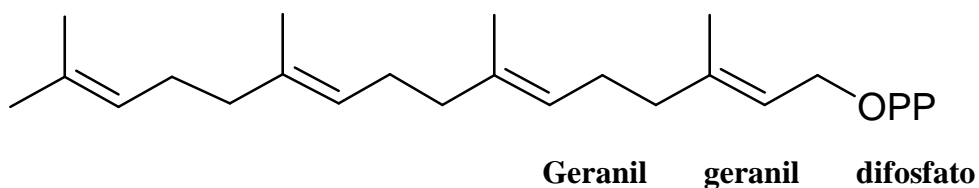


Figura 1

VI. A. I DITERPENI ISOCOPALANICI

I terpenoidi costituiscono una vasta famiglia di sostanze naturali strutturalmente molto diverse tra loro, tutte derivanti da unità isopreniche (C₅) unite in modo testa-coda. In particolare, nel caso dei diterpeni si ha una giunzione di quattro unità isopreniche ad opera dell'enzima *prenil transferasi* che porta così alla formazione del precursore Geranil-Geranil Pirofosfato (**Figura 2**)



(GGPP)

Figura 2

La via biogenetica che porta alla formazione del GGPP risulta comune all'intera gamma dei diterpeni naturali. L'ampia varietà strutturale di diterpenoidi deriva da reazioni di ciclizzazione del GGPP attraverso meccanismi carbocationici seguiti da trasposizioni di Wagner-Merweein.³

Per i diterpenoidi isocopalanici, classe a cui appartiene il coelodiolo, è possibile immaginare facilmente una origine biogenetica basata su una sequenza concertata di ciclizzazioni del geranil-geranil pirofosfato, che, nel caso del coelodiolo, sarebbe seguita da reazioni di ossidazione in posizione 1, 2 e 15 (**Figura 3**)

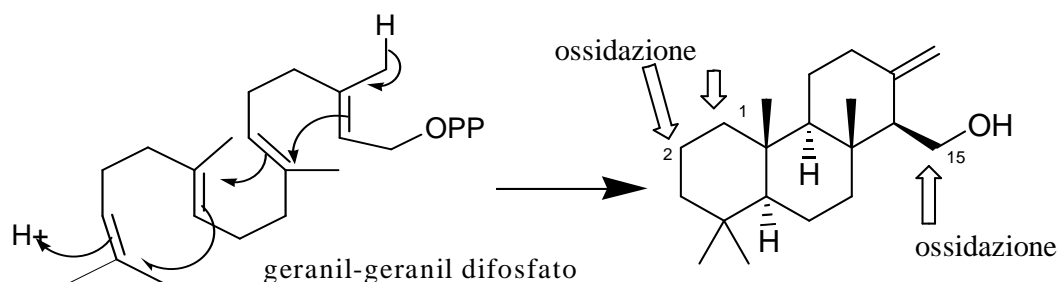


Figura 3

L'acido coeloico invece, come già accennato sopra, può derivare dal coelodiolo (o da un altro isocopalano) in seguito ad una degradazione ossidativa dell'anello A, che comporta la formazione di un gruppo carbossilico in posizione 1, di uno aldeidico in posizione 3 e la perdita di un atomo di carbonio (**Figura 4**).

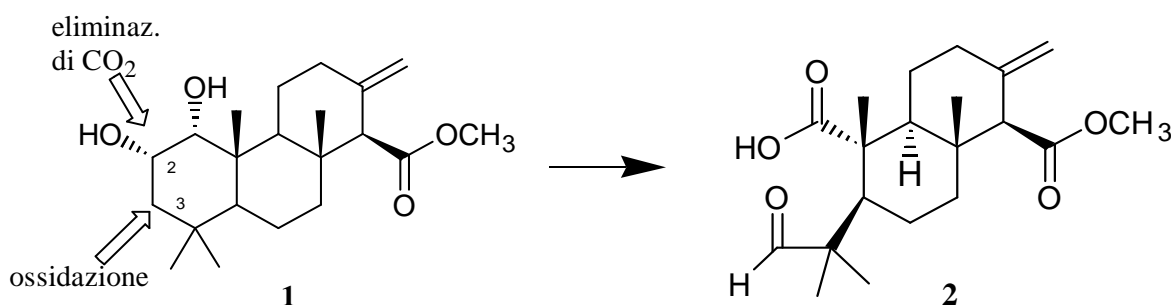


Figura 4

Benché la loro biogenesi sia estremamente semplice, i diterpeni isocopalanici sono una classe di composti molto rara in natura e apparentemente ristretta all'ambiente marino. Un'altra caratteristica peculiare è data dal fatto che questo stesso scheletro esiste in due forme enantiomeriche (**Figura 5**): a) gli isocopalanici classici identificabili per l'orientazione α del metile sui carboni C-8 e C-10, isolati in passato da alcuni Nudibranchi^{4,5} e, molto più recentemente, anche dalla spugna *Mycale graveolensis*;⁶ b) i

diterpeni enantiomeri, definiti *ent*-isocopalani, identificabili dall'orientazione β dei metili in C-8 e in C-10, che sono invece caratteristici di alcune spugne.^{7,8}

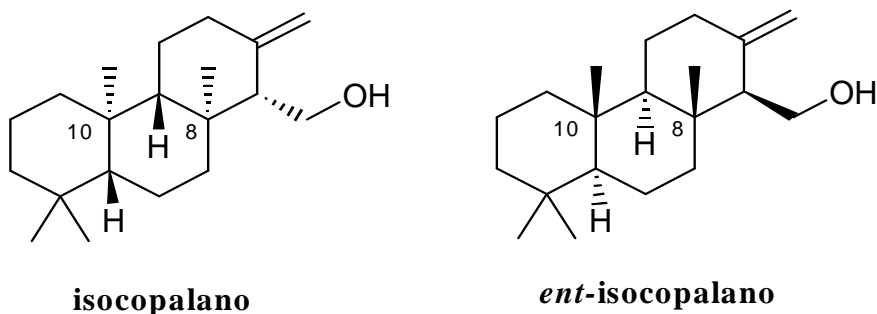


Figura 5

VI.B. ESTRAZIONE ED ISOLAMENTO

Un campione di *Coelocarteria singaporensis* (Isodictyadae), raccolto nel 2003 al Bunaken Marine Park (Nord Sulawesi, Indonesia), precedentemente sminuzzato, è stato sottoposto più volte ad estrazione con metanolo e con cloroformio fresco a temperatura ambiente. Gli estratti così ottenuti sono stati filtrati, concentrati e riuniti fino all'ottenimento di una gomma marrone. Questa è stata solubilizzata con H₂O e ripartita per tre volte tra H₂O ed acetato di etile (AcOEt). La fase in AcOEt (7,5 g) è stata cromatografata mediante MPLC su colonna impaccata con gel di silice 230-400 mesh. Per la separazione cromatografica sono stati utilizzati eluenti a polarità crescente, da *n*-esano 100% a MeOH 100%, incluse miscele di *n*-esano/EtOAc e EtOAc/MeOH. La frazione eluita in *n*-esano/EtOAc 7:3, verificatasi interessante ad una preliminare analisi NMR, è stata ulteriormente purificata mediante HPLC a fase diretta (*n*-esano/EtOAc 65:35), ottenendo i campioni puri di coelodiolo (**1**) (5,2 mg) e di acido coeloico (**2**) (1,8 mg) (**Figura 1**).

VI. C. DETERMINAZIONE STRUTTURALE

L'ESI-MS del coelodiolo (**1**), $[\alpha]_D +4.0$ (*c* 0.2, CHCl₃), ha mostrato il segnale dello ione pseudomolecolare a m/z 373 $[M + Na]^+$, mentre il picco a m/z 350.2466 nel HR-

EIMS ha indicato per il composto **1** la formula molecolare $C_{21}H_{34}O_4$ (m/z 350.2457). Gli spettri 1H e ^{13}C NMR del composto **1** (Tabella 1, C_6D_6) sono stati analizzati con l'aiuto di un esperimento 2D NMR HMQC dimostrando la presenza delle seguenti porzioni: (i) cinque gruppi metilici, tutti risonanti come singoletti nello spettro 1H NMR (δ_H 0.87 , 0.97 , 1.06 , 1.30 , 3.38) di cui l'ultimo è attribuito ad un gruppo metossilico (δ_C 51.5); (ii) un doppio legame geminalmente disostituito (δ_H 5.10, br s, e 4.90, br s, δ_C 109.5 , δ_C 145.0); (iii) un gruppo estereo (δ_C 171.8) indicato anche dall'assorbimento IR ($CHCl_3$) a ν_{max} 1742 cm^{-1} . Pertanto, tenendo conto delle cinque insaturazioni implicate dalla formula molecolare, il coelodiolo deve avere una struttura triciclica. L'analisi dello spettro 2D NMR COSY del composto **1** ha permesso di raggruppare i restanti protoni in tre sistemi di spin (A-C) evidenziati in Figura 6. In particolare, il sistema di spin A contiene, in aggiunta ad un metilene, due metini ossigenati vicinali (δ_H 3.20 , δ_C 76.3 ; δ_H 3.60 , δ_C 74.4), che danno conto così della presenza dei rimanenti due atomi di ossigeno presenti nella formula molecolare. Inoltre è da notare che il sistema di spin C, oltre al protone H-14, comprende anche i due protoni dell'esometilene (H_2 -16) che, sulla base di un accoppiamento allilico long-range, correlano sia con i multipletti a δ_H 2.08 e 2.31 di H_2 -12 che con il singoletto a δ_H 2.98 di H-14.

Le informazioni ottenute dall'esperimento 2D NMR HMBC ci hanno consentito di connettere le substrutture ricavate dalle suddette analisi e di completare così la struttura planare del coelodiolo (**1**). Particolarmente rilevanti sono state le correlazioni $^{2,3}J_{C,H}$ di H-5 (δ_H 1.16) con C-4 , C-18 , C-19 , C-1 , C-9 , C-10 e C-20 e quelle del metino H-14 risonante a campi bassi (δ_H 2.98) con C-15 , C-12 , C-13 , C-16 , C-7 , C-8 , C-9 e C-17. Le principali correlazioni HMBC sono riportate in Figura 6.

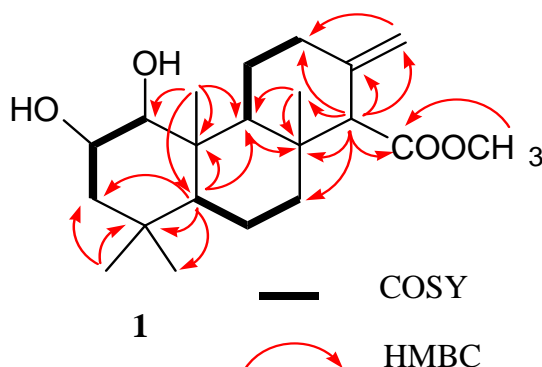


Figura 6

La configurazione relativa di **1** è stata determinata sulla base delle costanti di accoppiamento protone-protone (**Tabella 1**) e dagli accoppiamenti dipolari (evidenziati attraverso uno spettro ROESY) mostrati in **Figura 7**.

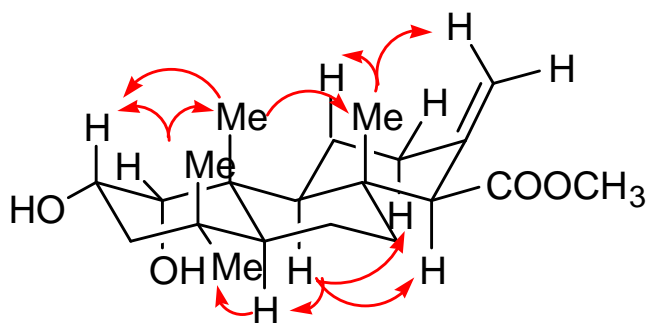


Figura 7

In particolare la giunzione *trans* tra gli anelli A e B è stata dedotta dai picchi di correlazione ROESY di H₃-20 con H-2 e di H-5 con H-3b (assiale); analogamente gli accoppiamenti dipolari di H-9 con H-5 e di H₃-17 con H₃-20 hanno suggerito una giunzione *trans* anche tra l'anello B e l'anello C.

Tenendo in considerazione l'orientazione assiale di H-2, la relativamente piccola costante di accoppiamento $J_{H-1,H-2}$ (3.5 Hz) è indicativa di un protone H-1 equatoriale, di conseguenza H-1 e H-2 sono orientati in *cis* (eq-ax). Infine la correlazione ROESY tra H-9 e H-14 ha indicato la relazione *cis* tra questi protoni e di conseguenza la configurazione relativa del C-14.

Lo scheletro carbonioso del coelodiolo (**1**) appartiene alla classe dei diterpeni "isocopalanici". Come sopra evidenziato, questa classe di composti può esistere in due forme completamente enantiomeriche, di conseguenza, nel caso del coelodiolo è stato necessario determinare la configurazione assoluta al fine di assegnare univocamente il composto ad una delle due classi.

Approfittando della presenza di un sistema 1,2 diolo in **1**, abbiamo deciso di affrontare questo problema sfruttando il metodo "exciton chirality CD" o metodo di Nakanishi, che prevede l'analisi dell'estere dibenzoico della molecola attraverso il dicroismo circolare. In particolare, il segno dell'effetto Cotton alla più alta lunghezza d'onda, viene correlato con la chiralità dei legami carbinolici C-O leganti il benzoato.⁹ Questa tecnica sfrutta le

proprietà chirottiche delle sostanze chirali, proprietà derivanti dall'interazione non distruttiva delle molecole con radiazione anisotropica e che consentono la differenziazione tra enantiomeri.

Per sfruttare pertanto il metodo di Nakanishi per la determinazione della configurazione assoluta del coelodiolo, è stato dunque necessario preparare il corrispondente derivato 1,2-dibenzoato.

Il trattamento del composto **1** con cloruro di benzoile in piridina ha portato alla formazione del solo 2-monobenzoato **1a** (Figura 8). La benzoilazione del gruppo idrossilico assiale in posizione 1 è stata realizzata con successo in seguito al trattamento del composto **1a** con il benzoiltrifluorometansolfonato (BzOTf) in CH_2Cl_2 a -78°C ¹⁰ ottenendo l'1,2-dibenzoato **1b** con una resa del 35%.

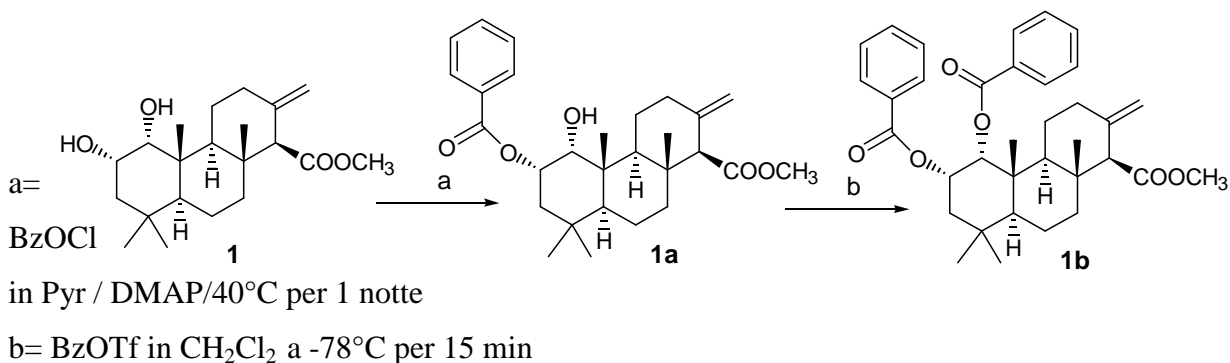


Figura 8

Lo spettro CD di **1b** in MeOH/diossano 9:1 ha mostrato il tipico exciton-split dell'effetto Cotton con segnali opposti centrati sul valore di assorbimento del benzoato cromoforo: $\Delta\lambda_{222} +6.7$ e $\Delta\lambda_{236} -15.2$. Il segno negativo dell'effetto Cotton alla più alta lunghezza d'onda indica la chiralità negativa tra i due dipoli dei benzoati cromofori (Figura 9),⁹ assegnando così il coelodiolo alla classe degli *ent*-isocopalani, come riportato in **1**.

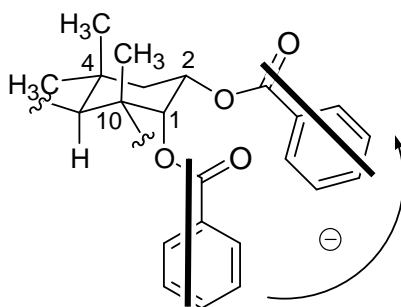


Figura 9

Il secondo derivato diterpenico, l'acido coeloico (**2**),¹¹ $[\alpha]_D -2.0$ (c 0.15, CHCl_3), ha mostrato un picco dello ione pseudomolecolare ESI-MS a m/z 373 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ e 395 $[\text{M} - \text{H} + 2 \text{Na}]^+$, mentre nell'EIMS il picco a m/z 350 ha rivelato la formula molecolare come $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_5$ (m/z 350.2099, calcolato m/z 350.2093). Con l'aiuto di un esperimento 2D HMQC NMR, e mediante la comparazione dei dati degli spettri ^1H e ^{13}C NMR dell'acido coeloico (**2**) (**Tabella 1**, C_6D_6) con i corrispondenti dati ottenuti per il coelodiolo (**1**), è stato possibile evidenziare numerose somiglianze, ma anche alcune differenze tra le due strutture. In particolare, i quattro metili singoletti, l'estere metilico e il gruppo *eso*-metilenico presenti nel composto (**1**) erano presenti anche in (**2**); nel composto **2** invece mancava il sistema 1,2 diolico, mentre apparivano presenti un gruppo aldeidico [NMR: δ_{H} 9.26, δ_{C} 204.3; IR, CHCl_3 ν_{max} 1735 cm^{-1}] e un acido carbossilico [NMR: δ_{C} 182.0; IR (CHCl_3): ν_{max} 1710 cm^{-1}]. Di conseguenza, poiché l'acido coeloico (**2**) contiene tre gruppi carbonilici e un doppio legame, soltanto due anelli erano necessari per giustificare le sei insaturazioni indicate dalla formula molecolare.

L'analisi combinata degli esperimenti 2D NMR COSY, HMQC e HMBC dell'acido coeloico (**2**), associata al confronto con i dati spettroscopici del coelodiolo (**1**), ha rivelato che tutte le differenze strutturali tra **2** e **1** sono limitate all'anello A. Le risonanze ^1H e ^{13}C NMR assegnate dalla posizione 5 alla 20 di **2** sono risultate essere simili a quelle dei corrispondenti atomi nel coelodiolo (**1**) (come si può vedere in **Tabella 1**) e inoltre, tutte le correlazioni COSY e HMBC rilevate tra protoni e carboni appartenenti agli anelli B e C del coelodiolo, (**Figura 6**) erano presenti anche nell'acido coeloico (**2**). Correlazioni aggiuntive evidenti nell'esperimento HMBC di **2** ci hanno permesso di determinare completamente la sua struttura planare. In particolare, i picchi di correlazione $^3J_{\text{H/C}}$ di H_3 -20 con C-9, C-5 e con il carbonio che risuona a δ_{C} 182.0 hanno permesso di posizionare il gruppo carbossilico sul C-10. Analogamente, i segnali di correlazione $^3J_{\text{H/C}}$ sia di H_3 -18 che di H_3 -19 con C-5 e con il carbonio risonante a δ_{C} 204.3, sono in accordo con la collocazione dei due metili e del gruppo aldeidico sul C-4.

I valori delle costanti di accoppiamento protone-protone e i segnali di correlazione ROESY (**Figura 10**) sono stati usati per stabilire la configurazione relativa dell'acido coeloico (**2**) che è risultata essere identica a quella del coelodiolo (**1**). A causa della limitata quantità di materiale disponibile, la determinazione della configurazione assoluta

dell'acido coeloico non è stata effettuata; in ogni modo, la struttura del composto (2) è stata riportata con la stessa configurazione *ent*-isocopalanica del coelodiolo (1).

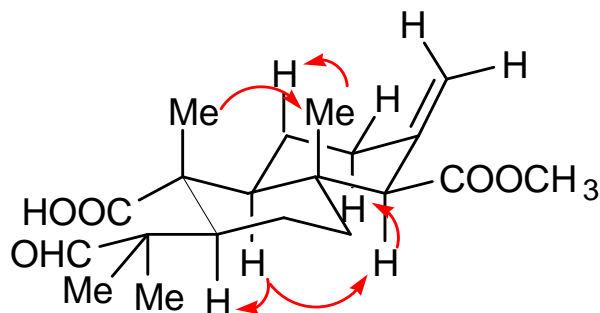


Figura 10

Lo scheletro carbonioso dell'acido coeloico (2) è unico e, per quanto si conosce, rappresenta il primo esempio in natura di diterpene *seco*-norisocopalanico. L'acido coeloico (2) può derivare dal coelodiolo (1) (o da un *ent*-isocopalano simile) attraverso una degradazione ossidativa dell'anello A, che comporta la formazione di un gruppo carbossilico in posizione 1, di un gruppo aldeidico in posizione 3 e la perdita del carbonio 2. Questo tipo di degradazione non è unica soltanto tra gli isocopalani, ma è molto rara anche nell'intera classe di terpenoidi. Uno dei pochi esempi di molecole correlate è rappresentato dagli orizalidi (**Figura 11**), diterpeni antibatterici C₁₉-Kauranici isolati dalla pianta di riso.¹² Interessante è che in questo caso, il gruppo aldeidico è localizzato in posizione 1 e quello carbossilico in posizione 3.

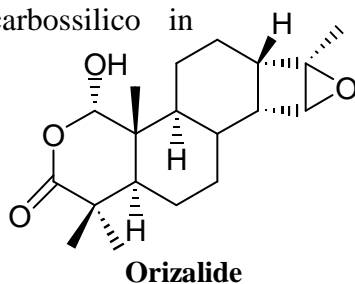


Figura 11

Su queste due nuove molecole non sono ancora disponibili dei dati completi relativi ad una possibile attività farmacologica, quindi al momento ci risulta impossibile predire quali possano essere i loro impieghi futuri.

Da preliminari test di citotossicità possiamo solo anticipare che il coelodiolo (**1**) e l'acido coeloico (**2**) hanno dimostrato di inibire in vitro la crescita della linea cellulare MKN-45, le cellule dell'adenocarcinoma gastrico umano, rispettivamente a 20 e a 40 µg/mL, ma il meccanismo di questa attività e ulteriori test biologici sono ancora in via di studio e saranno riportati in futuro.

VI. D. PARTE SPERIMENTALE

Strumentazione. Le rotazioni ottiche sono state misurate in CHCl₃ su un polarimetro Perkin-Elmer 192 equipaggiato con una lampada al sodio ($\lambda = 589$ nm) ed una microcella di 10-cm. Gli spettri IR (KBr) sono stati misurati su uno spettrofotometro modello Bruker IFS-48. Gli spettri UV sono stati ottenuti in CH₃CN usando uno spettrofotometro Beckman DU70. Gli spettri di massa FAB-MS sono stati ottenuti su un spettrometro di massa FISIONS Prospec usando una matrice di glicerolo. Gli spettri ¹H (500 MHz) e ¹³C (125 MHz) sono stati misurati su uno spettrometro Bruker AMX-500; i chemical shift sono riferiti ai segnali dei solventi (C₆D₆: $\delta_H = 7.15$, $\delta_C = 128.0$). Le molteplicità dei segnali ¹³C sono state determinate con esperimenti DEPT. Le correlazioni omonucleari ¹H-¹H sono state determinate mediante esperimenti COSY. Le correlazioni eteronucleari ¹H-¹³C sono state determinate con esperimenti HSQC. Le correlazioni ¹H-¹³C attraverso due e tre legami sono state determinate con esperimenti HMBC ottimizzati per ^{2,3}J di 8.0 Hz. Le cromatografie liquide a media pressione (MPLC) sono state effettuate usando un sistema Büchi 861 con fase stazionaria RP18 e SiO₂ (230-400 mesh). Le separazioni con cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) sono state ottenute in modo isocratico su un sistema Beckmann equipaggiato con rivelatore RI e colonne LUNA (SI60, 250 x 4 mm).

Materiale Animale, Estrazione e Isolamento. Un campione di *Coelocarteria singaporensis* è stato raccolto nel luglio del 2003 nel Bunaken Marine Park nel Nord Sulawesi, Indonesia. Un campione è conservato al Dipartimento di Chimica delle Sostanze Naturali, Italia. L'organismo è stato immediatamente congelato dopo la raccolta e mantenuto come tale fino al momento in cui la spugna (2,5 kg, peso secco) è stata

omogeneizzata ed estratta con metanolo (4 x 4 L) e con cloroformio (1 x 4,5 L). L'estratto metanolico è stato inizialmente ripartito tra H₂O e EtOAc e successivamente la fase organica, combinata con l'estratto cloroformico, è stata concentrata sotto vuoto fino ad ottenere una gomma marrone (116,49 g). Questo è stato sottoposto a cromatografia su una colonna medio-grande impaccata con gel di silice 230-400 mesh ed eluita con sistema a gradiente con polarità crescente da *n*-esano 100% a MeOH 100%. Le frazioni MPLC eluite con *n*-esano/EtOAc 7:3, sono state purificate mediante HPLC (eluente *n*-esano/EtOAc 65:35, flusso 0.8 mL/min) ottenendo il coelodiolo (**1**, 5,2 mg) e acido coeloico (**2**, 1,9 mg) allo stato puro.

Coelodiolo (1): Solido amorfo e giallo. $[\alpha]_D^{25} + 4.0$ ($c = 0.2$ mg/mL in CHCl₃); IR (KBr): ν_{\max} 1742 cm⁻¹ in CHCl₃; ¹H e ¹³C NMR (CDCl₃): vedi Tabella 1. ESI-MS: m/z 373 [M+Na]⁺; HR-EIMS: osservato m/z 350.2466 [M+H]⁺; calc. per C₂₁H₃₄O₄, 350.2457.

Acido coeloico (2): solido amorfo giallo opaco. $[\alpha]_D^{25} - 2.0$ ($c = 0.15$ mg/mL in CHCl₃); IR (KBr): ν_{\max} 1742 cm⁻¹ in CHCl₃; ¹H e ¹³C NMR (CDCl₃): vedi Tabella 1. ESI-MS: m/z 373 [M+Na]⁺ e 395 [M-H+2Na]⁺; HR-EIMS: osservato $m/z = 350.2099$ [M+H]⁺; calc. per C₂₀H₃₀O₅, 350.2093.

1,2-dibenzoilazione del coelodiolo. Per la dibenzoilazione è stata eseguita una procedura suddivisa in due fasi. Come primo step, al composto puro sciolto in piridina, sono state aggiunte 2 gocce di benzoil cloruro e dimetil ammino piridina, DMAP, come catalizzatore. La miscela di reazione è stata lasciata per una notte sotto agitazione ad una temperatura di 40 °C. E' stato così ottenuto il derivato 2-monobenzoilato **1a**. La benzoilazione del gruppo idrossilico assiale in posizione 1 è stata realizzata in un secondo step mediante il trattamento del composto **1a** (Fig 8) con il benzoil trifluorometansolfonato (BzOTf). È stata eseguita prima la preparazione di BzOTf: il cloruro di benzoile (1 mmole) è stato fatto reagire con l'acido trifluorometansolfonico (1 mmole) a temperatura ambiente per 20 ore. La soluzione scura ottenuta è stata distillata sotto vuoto con una colonna Vigreux. È stato raccolto un olio incolore (resa 66%, bp 92-94 °C, 2.2 mmHg, densità 1,51 g/mL a 25°C). Al coelodiolo (1 mg) sono stati aggiunti 2,2 equivalenti di BzOTf in CH₂Cl₂ a -78°C per 15 min. In questo modo abbiamo

ottenuto con una resa piuttosto bassa (del 35%), l'1,2- dibenzoil coelodiolo (**1b** in Fig.8) , analizzato mediante dicroismo circolare.

Coelodiolo-1-benzoato (1a): solido amorfo; $[\alpha]_D^{25} = +2$ (*c* 0.1, CDCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.09 (2H, d, *J* = 7.0 Hz, H-2'), 7.59 (2H, t, *J* = 7.0 Hz, H-3'), 7.45 (1H, t, *J* = 7Hz, H-4'), 5.19 (1H, ddd, *J* = 9.5, 3.5, 3.0 Hz, H-2), 4.79 (1H, br s, H-15a), 4.65 (1H, br s, H-15b), 3.73 (1H, d, *J* = 3.5 Hz, H-1), 3.69 (3H, s, OCH₃) 2.93 (1H, br s, H-14), 2.35 (1H, ddd, *J* = 12.5, 3.8, 2.0 Hz, H-12a), 2.12 (1H, dt, *J* = 12.5, 3.5 Hz, H-12b), 1.89 (1H, dd, *J* = 12.5, 3.0 Hz, H-3a), 1.77 (1H, sovrapposto, H-3b), 1.77 (1H, sovrapposto, H-6a), 1.75 (1H, sovrapposto, H-6b), 1.66 (1H, m, H-11a), 1.60 (1H, sovrapposto, H-11b), 1.60 (1H, sovrapposto, H-7a), 1.59 (1H, sovrapposto, H-9), 1.58 (1H, sovrapposto, H-7b), 1.23 (1H, dd, *J* = 13.0, 2.8 Hz, H-5), 1.15 (3H, s, H-17), 1.08 (3H, s, H-20), 0.97 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, s, H-18). ESI-MS: *m/z* 477 [M + Na]⁺.

Coelodiolo-1,2-dibenzoato (1b): solido amorfo; . $[\alpha]_D^{25}$ n.d.; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.09 (4H, d, *J* = 7.0 Hz, H-2'), 7.59 (4H, t, *J* = 7.0 Hz, H-3'), 7.45 (2H, t, *J* = 7Hz, H-4'), 5.36 (1H, ddd, *J* = 9.5, 3.2, 3.0 Hz, H-2), 5.28 (1H, d, *J* = 3.2 Hz, H-1), 4.77 (1H, br s, H-15a), 4.68 (1H, br s, H-15b), 3.70 (3H, s, OCH₃), 2.78 (1H, br s, H-14), 2.37 (1H, ddd, *J* = 12.5, 3.8, 2.0 Hz, H-12a), 2.12 (1H, dt, *J* = 12.5, 3.5 Hz, H-12b), 1.92 (1H, dd, *J* = 12.5, 3.0 Hz, H-3a), 1.80 (1H, sovrapposto, H-3b), 1.78 (1H, sovrapposto, H-6a), 1.77 (1H, sovrapposto, H-6b), 1.66 (1H, m, H-11a), 1.65 (1H, sovrapposto, H-11b), 1.60 (1H, sovrapposto, H-9), 1.59 (1H, sovrapposto, H-7a), 1.58 (1H, sovrapposto, H-7b), 1.25 (1H, dd, *J* = 13.0, 2.8 Hz, H-5), 1.20 (3H, s, H-17), 1.07 (3H, s, H-20), 0.98 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, s, H-18). ESI-MS: *m/z* 581 [M + Na]⁺.

Dicroismo circolare. Gli spettri CD sono stati registrati su uno spettrofotometro per dicroismo circolare Jasco 715 e utilizzando cuvette da 0,1 cm di cammino ottico. Per l'ottenimento dello spettro CD la lunghezza d'onda è stata variata da 220 a 320 nm con una velocità di 100 nm/min. Gli spettri sono stati registrati con un tempo di risposta di 16 s ad una larghezza di banda di 2,0 nm. La temperatura è stata tenuta costantemente a 20°C mediante un sistema contenitore per cuvette termoelettricamente controllato (Jasco

PTC-348). Le curve CD sono state registrate in funzione della temperatura, variando da 20 a 90°C a 294 nm con una velocità di variazione di 10°C/ora.

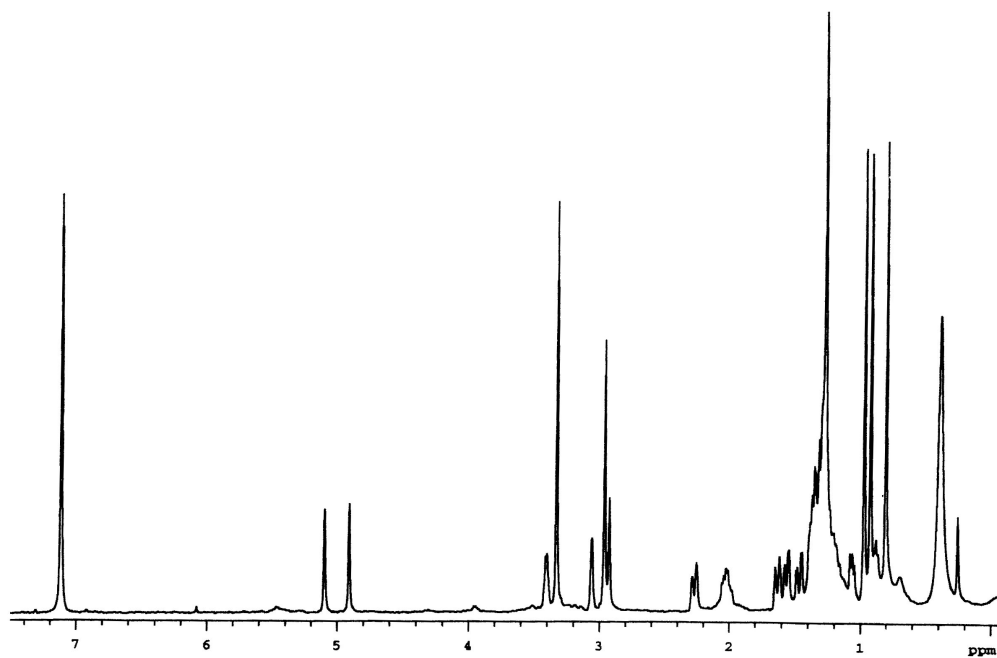
Test farmacologici: La linea cellulare MKN-45 (adenocarcinoma gastrico umano) sono state cresciute in RPMI 1640 integrato con il 20% di siero fetale bovino (BioWhittaker) e 2 mM di L-glutammina (MP Biomedicals). Campioni di 10×10^3 di cellule sono state piastrate in piastre di coltura e lasciate aderire per 24 h a 37° in atmosfera umidificata con il 5% di CO₂. Le cellule sono state incubate in un mezzo contenente concentrazioni differenti di coelodiolo (**1**) e acido coeloico (**2**). Dopo 6 giorni, la percentuale di proliferazione è stata valutata contando le cellule dopo colorazione con una soluzione di blu di tripano (MP Biomedicals) attraverso microscopia in contrasto di fase.

VI. E. DATI SPETTROSCOPICI

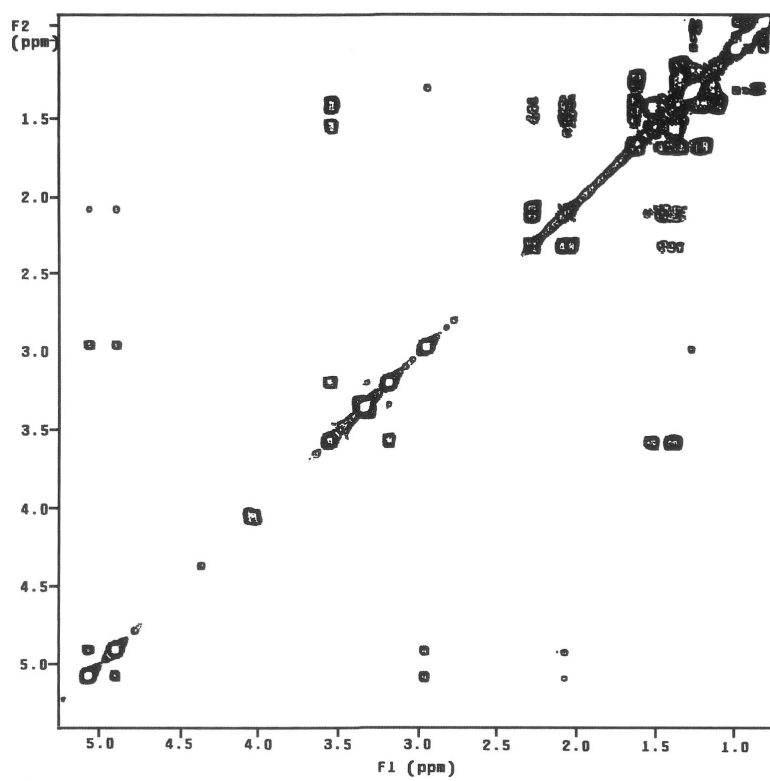
Tabella 1. ^1H e ^{13}C NMR del Coelodiolo (**1**) e dell' Acido Coeloico (**2**) in C_6D_6 .

Pos.	1		2	
	δ_{H} , molt., J in Hz	δ_{C} , molt.	δ_{H} , molt., J in Hz	δ_{C} , molt.
1	3.20, d, 3.5	76.3, d		182.0, s
2	3.60, ddd, 9.5, 3.5, 3.0	74.4, d		
3a	1.57, dd, 12.5, 3.0	33.0, t	9.26, s	204.3, d
3b	1.42, dd, 12.5, 9.5			
4		42.5, s		58.4, s
5	1.16, dd, 13.0, 2.8	48.4, d	1.13, dd, 12.5, 2.5	49.2, d
6a	1.39 ^a	20.5, t	1.36 ^a	21.0, t
6b	1.36 ^a		1.31 ^a	
7a	1.26 ^a	39.6, t	1.30 ^a	38.9, t
7b	1.25 ^a		1.28 ^a	
8		40.2, s		39.4, s
9	1.67, dd, 12.0, 3.0	50.7, d	1.64, dd, 12.0, 3.0	53.1, d
10		42.0, s		51.0, s
11a	1.47, m	24.5, t	1.43, m	24.4, t
11b	1.38 ^a		1.37 ^a	
12a	2.31, ddd, 12.5, 3.8, 2.0	36.0, t	2.23, ddd, 12.0, 3.8, 2.0	36.9, t
12b	2.08, ddd, 12.5, 12.5, 3.5		2.10, ddd, 12.0, 12.0, 3.5	
13		145.0, s		143.7, s
14	2.98, s	64.3, d	2.73, s	63.7, d
15		171.8, s		172.0, s
16a	5.10, bs	109.5, t	5.01, bs	109.9, t
16b	4.90, bs		4.81, bs	
17	1.30, s	16.3, q	1.06, s	16.1, q
18	0.97, s	26.0, q	0.87, s	23.2, q
19	0.87, s	32.1, q	0.92, s	33.0, q
20	1.06, s	17.8, q	1.03, s	19.5, q
OC	3.38, s	51.5, q	3.34, s	51.5, q

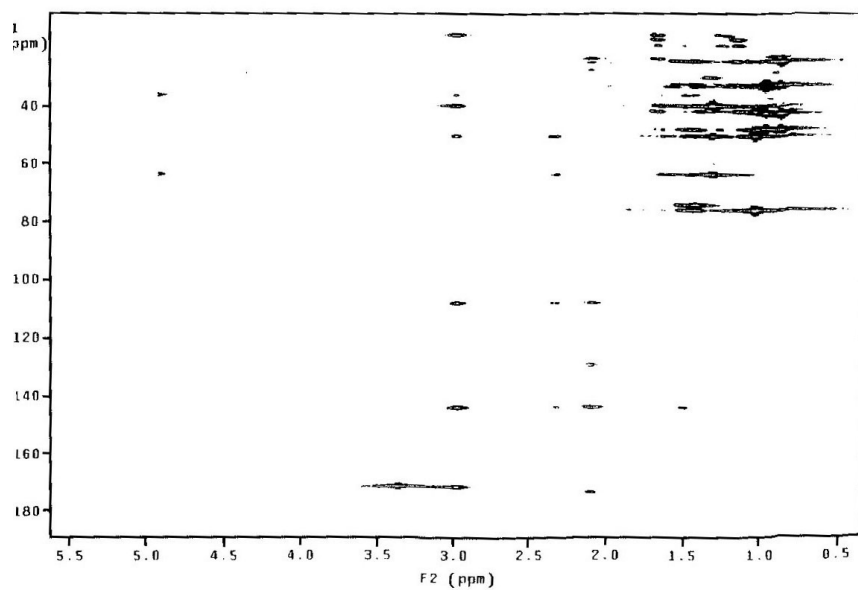
H₃^aSovrapposto con altri segnali.



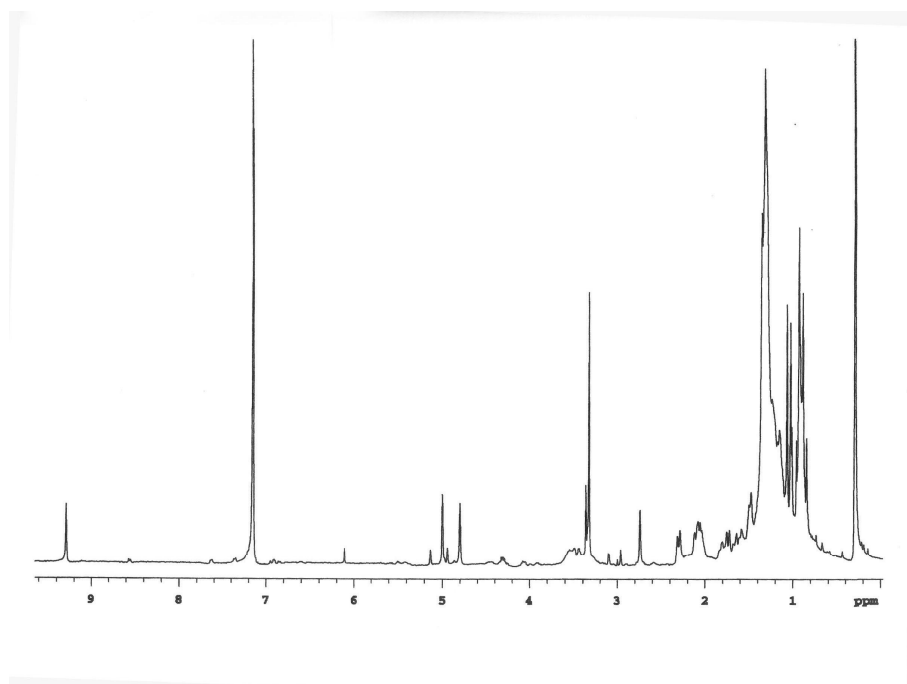
^1H NMR coelodiolo (500 MHz, C_6D_6).



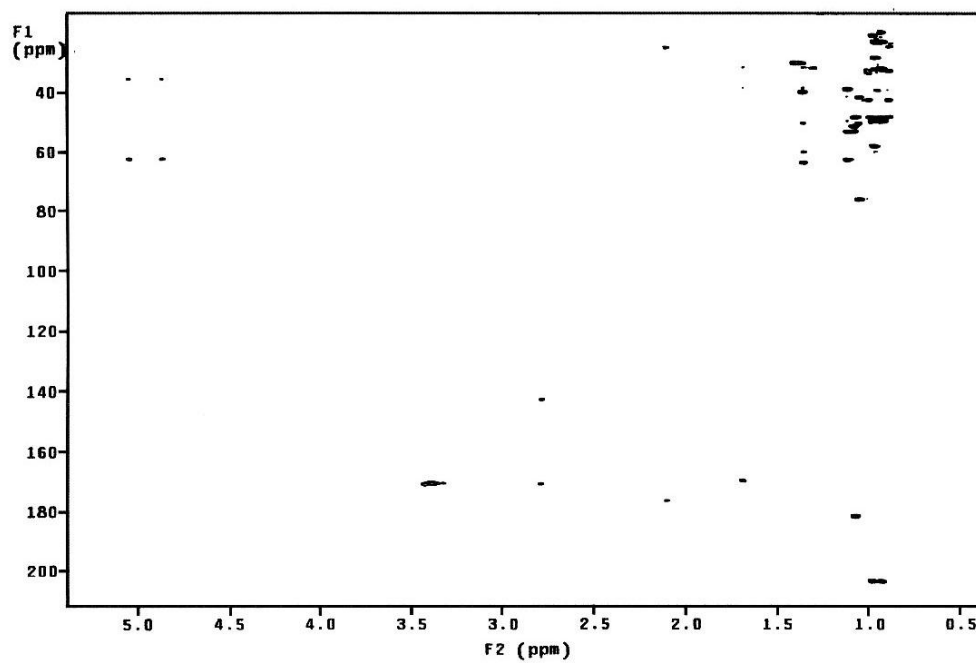
2D COSY NMR coelodiolo (500 MHz, C_6D_6).



2D HMBC NMR coelodiolo (500 MHz, C₆D₆).



¹H NMR acido coeloico (500 MHz, C₆D₆).



2D HMBC NMR acido coeloico (500 MHz, C₆D₆).

VI. F. BIBLIOGRAFIA

1. Moon, B.; Baker, B. J.; McClintock, J. B. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 116-118.
2. Moon, B.; Park, Y. C.; McClintock, J. B.; Baker, B. J. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9057-9062.
3. John, V.; Stoilov, I. L.; Djerassi, C.; Krsuso, P.; Poiner, A.; Scheuer, P. J.; *J. Org. Chem.* **1991**, 1942.
4. Gavagnin, M.; Ungur, N.; Castelluccio, F.; Muniain, C.; Cimino, G. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 269-274.
5. Gavagnin, M.; De Napoli, A.; Castelluccio, F.; Cimino, G. *Tetrahedron Lett.*, **1999**, *40*, 8471-8475.
6. Rudi, A.; Benayahu, Y.; Kashman, Y. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 280-281.
7. de Miranda, D. S.; Brendolan, G.; Imamura, P. M.; Sierra, M. G.; Marsaioli, A. J.; Ruveda, E. A. *J. Org. Chem.*, **1981**, *46*, 4851-4856.
8. Zubia, E.; Gavagnin, M.; Scognamiglio, G.; Cimino, G. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 725-731.
9. (a) Nakanishi, K.; Harada, N. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 3989-3991. (b) Harada, N.; Nakanishi, K. *Circular Dichroic Spectroscopy-Exciton Coupling in Organic Stereochemistry*; Univ. Sci. Books: Mill Valley, USA, 1983.
10. Brown, L.; Koreeda, M. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 3875-3880.
11. Abbiamo preferito numerare l'acido coeloico (**2**) usando lo stesso sistema di numerazione dello scheletro isocopalano. Sebbene, in questo caso, la posizione 2 deve essere saltata, c'è il vantaggio di un più facile confronto delle risonanze ^1H e ^{13}C NMR dell'acido coeloico (**2**) con quelle corrispondenti ai nuclei dell'*ent*-isocopalano coelodiolo (**1**).
12. (a) Kono, Y.; Uzawa, J.; Kobayashi, K.; Suzuki, Y.; Uramoto, M.; Sakurai, A.; Watanabe, M.; Teraoka, T.; Hosokawa, D. *Agric. Biol. Chem.* **1991**,

- 13.** 55, 803-811; (b) Kono, Y.; Kojima, A.; Nagai, R.; Watanabe, M.; Koshino, H.; Uzawa, J.; Suzuki, Y.; Sakurai, A. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 1291-1298.

VII. ANALISI DEL SOFT CORAL *UMBELLULIFERA SP.*

I coralli molli (“soft corals”), rappresentano importanti fonti di terpeni, soprattutto diterpeni appartenenti alla classe dei cembrani.^{1,2} Spesso i cembranoidi si trovano in elevate concentrazioni (fino al 5% del peso secco) nei soft corals e probabilmente hanno un ruolo di difesa chimica contro altri organismi marini.^{3,4} In saggi farmacologici alcuni di essi mostrano significative attività ittiotossiche, citotossiche⁵, antiinfiammatorie⁶ e Ca-antagoniste.⁷

Nel 1981 dall’estratto organico di *Sarcophyton decaryi* furono isolati una serie di diterpeni a scheletro cembranico, tra cui il decariolo e il 3,4-epossinephthenolo.⁸ Successivamente, dall’analisi chimica di estratti di altri due soft corals appartenenti alla stessa famiglia (Nephtheidae), furono isolati sia il decariolo che il sarcoglaucolo⁹ (**Figura 1**) ed anche derivati in cui la ramificazione isopropilica ciclizza (furanocembranoidi) o in cui l’anello macrociclico subisce una scissione (seco-cembranoidi).^{10,11} Tra i seco-cembranoidi descritti in letteratura si possono citare la seco-sethukarailina isolata dal soft coral *Sinularia dissecta*¹¹ ed il mayolide A dal soft coral *Sinularia mayi*.¹²

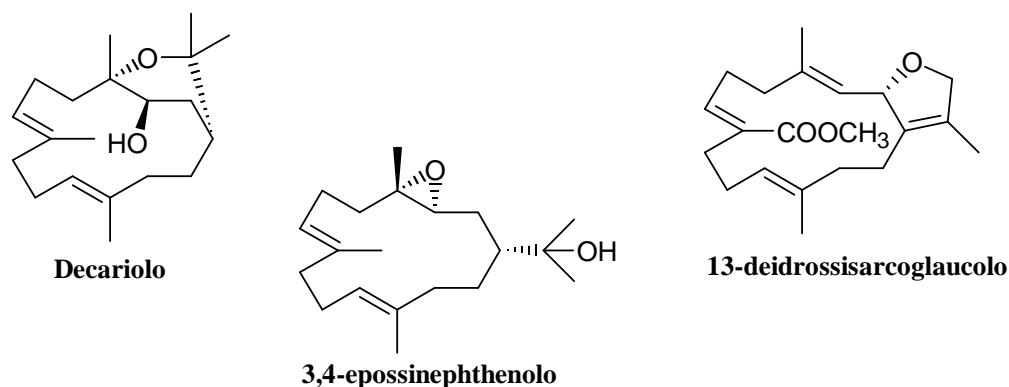


Figura 1

Il decariolo ha dimostrato una buona attività citotossica nei confronti di diverse linee cellulari, con valori di GI_{50} da 0.15 a 8.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$. In particolare, esso mostra una notevole attività inibitoria della crescita cellulare (GI_{50} 0.15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contro MCF7,

adenocarcinoma al seno) e sembra agire come inibitore specifico del ciclo cellulare sulla fase mitotica G2.⁹

Grazie ad una collaborazione con l'Università di Manado in Indonesia, abbiamo avuto la possibilità di studiare il metabolismo secondario del soft coral *Umbellulifera sp.*

Un campione di *Umbellulifera sp.* (famiglia Nephtheidae, ordine Alcyonacea) è stato raccolto lungo le coste di Manado (North Sulawesi, Indonesia) e analizzato per la sua composizione chimica. Il principale componente dell'estratto organico si è rivelato essere il decariolo (1), insieme ad una serie di composti analoghi, sia noti, quali idrossinephthenolo (2), 3,4-epossinephthenolo (3), 3,4-epossicembrene A (4) (**Figura 2**), che nuovi, quali i composti che abbiamo denominato decariolo B (5), C (6) e D (7), analoghi del decariolo (**Figura 3**). Dall'estratto organico di questo organismo è stato anche isolato un nuovo alcaloide, composto strutturalmente non correlato ai precedenti, che abbiamo denominato umbellizoantamina (8) (**Figura 3**).

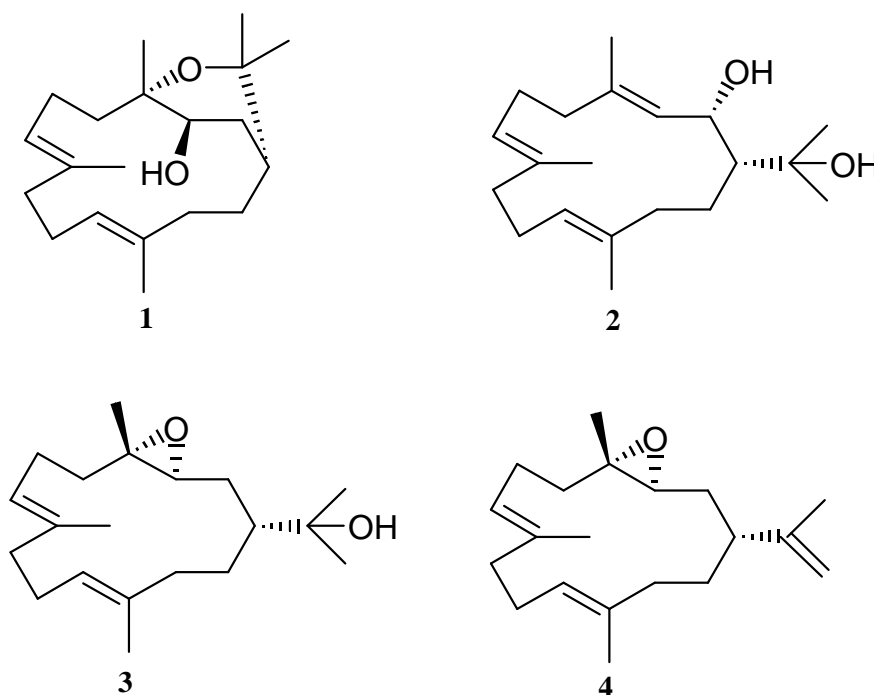


Figura 2

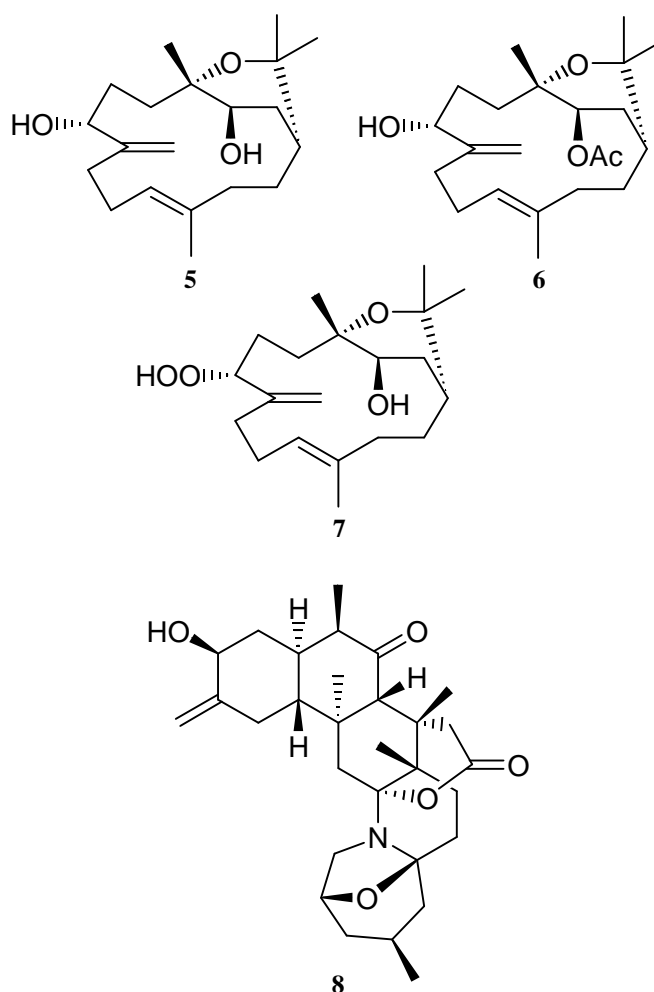


Figura 3

Quest'ultimo composto fa parte di una serie di alcaloidi appartenenti alla classe delle zoanthamine, isolati da zoanthidi marini del genere *Zoanthus* (Phylum Cnidaria, Classe Anthozoa, Ordine Zoanthidea, Famiglia Zoanthidae). La zoanthamina (**Figura 4**), isolata da Faulkner nel 1984 da *Zoanthus sp.*,¹³ è stata identificata come primo membro di questa nuova classe di alcaloidi. Essi sono caratterizzati, non solo da una struttura complessa anche dal punto di vista stereochimico, ma anche da un'importante ed interessante attività farmacologica. Per esempio, zoanthenamide, zoanthamide e 28-deossizoanthenamide¹⁴ (**Figura 4**), inibiscono l'infiammazione indotta da PMA (phorbol myristate acetate) nell'orecchio di topo,¹⁵ oltre a mostrare una potente attività

analgesica, comparabile a quella dell'indometacina. Altri alcaloidi appartenenti alla stessa classe, come norzoanthamina, norzoanthaminone, epinorzoanthamina ed ossizoanthamina (**Figura 4**), inibiscono la crescita di linee cellulari leucemiche murine P-388,¹⁶ con valori di IC₅₀ di 24, 1.0, 2.6 e 7.0 µg/mL, rispettivamente. In particolare, la norzoanthamina ha dimostrato anche di sopprimere la perdita di peso osseo e di forza nei topi ovariectomizzati.¹⁷ attraverso un accrescimento dell'osso trabecolare e corticale; esso esibisce un effetto sulle ossa simile a quello del 17β-estradiolo in topi sottoposti ad ovariectomia e si suppone agisca con un meccanismo diverso rispetto ai noti farmaci antiosteoporotici; proprio per questo motivo, le zoanthamine potrebbero rappresentare dei buoni candidati come farmaci osteoporotici.¹⁸ Le zoanthamine hanno un'origine biosintetica sconosciuta: Faulkner et Al. hanno suggerito un'origine triterpenoidica, mentre Uemura et. Al¹⁹ hanno proposto una via biogenetica appartenente a quella dei polichetidi, ma nessuna ipotesi è stata confermata.

La presenza di un alcaloide appartenente alla classe delle zoanthamine, tipiche di zoanthidi, in un soft coral come *Umbellulifera sp.*, potrebbe essere dovuta a due motivi. In primo luogo potrebbe essere avvenuta una contaminazione dell'organismo da noi studiato da parte di zoanthidi simbiotici; in secondo luogo l'isolamento di uno solo di questi alcaloidi induce a pensare ad uno scambio di metaboliti tra zoanthidi e soft coral. Al di là dell'origine di umbellizoanthamina, tale composto ha destato il nostro interesse soprattutto a livello strutturale, data la sua complessità anche a livello stereochimico.

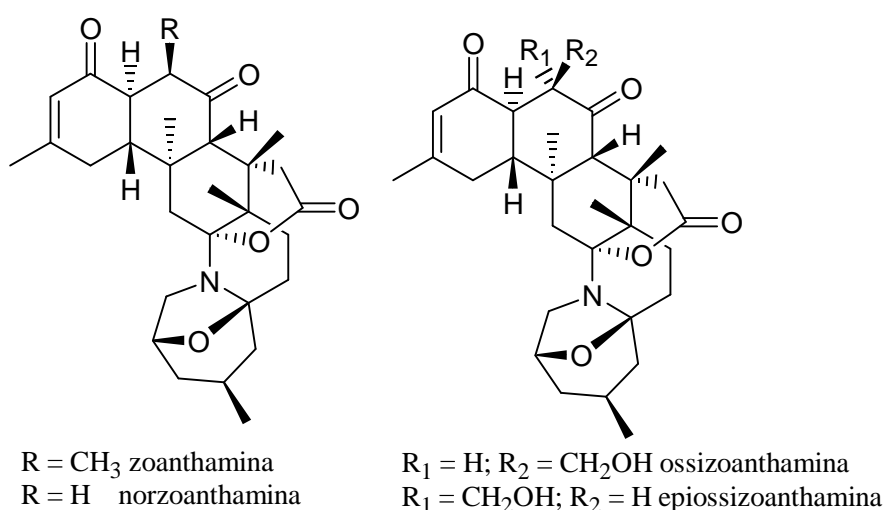


Figura 4.

VII.A. ESTRAZIONE ED ISOLAMENTO

Umbellulifera sp. è stata estratta ripetutamente con MeOH a temperatura ambiente. L'estratto organico totale è stato ripartito tre volte tra acqua ed acetato di etile. La fase acquosa è stata ulteriormente ripartita tre volte con butanolo fresco.

L'estratto in acetato di etile (2.04 g) è stato cromatografato mediante MPLC a fase diretta utilizzando un sistema a gradiente di eluizione a polarità crescente da *n*-esano 100% ad AcOEt 100% e da AcOEt 100% a MeOH 100%. Sono state raccolte 19 frazioni. Le frazioni 3 e 5 eluite rispettivamente con *n*-esano/AcOEt 8:2 e 7:3, corrispondevano al decariolo (**1**, 389.5 mg) e al 2-idrossinephthenolo (**2**, 220.3 mg).

La frazione 1 (146.9 mg) eluita con *n*-esano/AcOEt 9:1 è stata ulteriormente cromatografata mediante HPLC a fase diretta (*n*-esano/AcOEt 95:5) ottenendo il 3,4-epossicembrene A (**4**, 2.6 mg) allo stato puro. In seguito alla purificazione mediante HPLC (utilizzando come eluente *n*-esano/AcOEt 9:1) della frazione 4 (77.5 mg; da MPLC, eluente: *n*-esano/AcOEt 8:2) è stato ottenuto il 3,4-epossinephthenolo (**3**, 0.5 mg) allo stato puro. La frazione 6 (19.0 mg) della MPLC eluita con *n*-esano/AcOEt 75:25 è stata ulteriormente purificata mediante HPLC a fase diretta (eluente *n*-esano/AcOEt 6:4) fornendo il nuovo composto decariolo C (**6**, 1.8 mg) allo stato puro. Dalle frazioni MPLC eluite con *n*-esano/AcOEt 4:6 (29.0 mg) e 6:4 (37.7 mg), in seguito a purificazione mediante HPLC (eluenti *n*-esano/AcOEt 6:4 e 7:3 rispettivamente) sono stati isolati i due nuovi cembrani decariolo B (**5**, 1.8 mg) e D (**7**, 2.8 mg) allo stato puro.

La frazione 14 (9.0 mg) da MPLC eluita con *n*-esano/AcOEt 2:8 è stata ulteriormente purificata mediante HPLC utilizzando *n*-esano/AcOEt 25:75 fornendo il nuovo composto umbellizoanthamina (**8**, 3.0 mg) allo stato puro. Si tratta di un composto strutturalmente non correlato agli altri, ossia di un alcaloide a struttura eptaciclica complessa.

VII. B. DETERMINAZIONE STRUTTURALE DEI COMPOSTI ISOLATI

L'ESI-MS del decariolo B (**5**), $[\alpha]_D - 13.4$ (*c* 0.2, CHCl₃), ha mostrato il segnale nella ionizzazione pseudomolecolare a m/z 345 $[M + Na]^+$, mentre il picco a m/z 322.4756 nel HR-

EIMS ha suggerito per il composto **5** la formula molecolare $C_{20}H_{34}O_3$ indicando la presenza di quattro insaturazioni. Dallo spettro 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, **Tabella 1**) del composto **5** sono stati osservati due singoletti risonanti a δ_H 5.02 e 5.06 ed un tripletto metinico a δ_H 5.29, probabilmente legato ad un C sp^2 . Lo spettro ^{13}C NMR di **5** ha mostrato venti segnali di cui quattro nella regione sp^2 . Gli spettri 1H e ^{13}C NMR del composto **5** (**Tabella 1 e 2**, $CDCl_3$) sono stati analizzati con l'aiuto dell'esperimento 2D NMR HSQC che ha dimostrato la presenza delle seguenti porzioni: (i) quattro gruppi metilici, tutti risonanti come singoletti nello spettro 1H NMR (δ_H 1.19, 1.22, 1.18, 1.62); (ii) un doppio legame geminalmente disostituito (δ_H 5.02, s, e 5.06, s e δ_C 110.7); (iii) un doppio legame trisostituito (δ_H 5.29, δ_C 126.7 e 134.7). Pertanto, tenendo conto delle quattro insaturazioni implicate dalla formula molecolare, il decariolo B (**5**) doveva avere una struttura biciclica. L'analisi dello spettro 2D NMR COSY del composto **5** ha permesso di raggruppare tutti i protoni risonanti come multipletti in tre sistemi di spin (A-C) evidenziati in **Figura 5**. Il primo sistema di spin (**A**) comprende tre metileni e due metini, di cui uno ossigenato (δ_H 3.66, δ_C 71.5); il secondo sistema di spin (**B**) include due metileni ed il metino su Csp^2 (δ_H 5.29, δ_C 126.7); infine, il terzo sistema di spin (**C**) comprende due metileni e un altro metino ossigenato (δ_H 4.14, δ_C 78.8).

Data la presenza di due metini ossigenati, restava da sistemare un solo ossigeno previsto dalla formula molecolare e, attraverso l'analisi dello spettro ^{13}C è stata evidenziata la presenza di un carbonio ossigenato quaternario a δ_C 75.6. Dalle correlazioni $^{2,3}J_{C-H}$ HMBC NMR è stato possibile connettere tra loro le substrutture ricavate dagli altri esperimenti mono- e bidimensionali, permettendo di completare la struttura planare del nuovo composto **5**.

Di particolare importanza sono state le correlazioni $^{2,3}J_{C-H}$ di H-3 (δ_H 3.66) con C-1, C-2, C-4, C-5 e C-16, quelle del protone del metino ossigenato H-7 (δ_H 4.14) con C-8, C-9 e C-20, quelle del protone del doppio legame H-11 (δ_H 5.29) con C-12, C-13 e C-19, di H₃-17 (δ_H 1.19) con C-1, C-15 e C-18 e di H₃-18 (δ_H 1.22) con C-1, C-15 e C-17. Le principali correlazioni HMBC sono riportate in **Figura 5**.

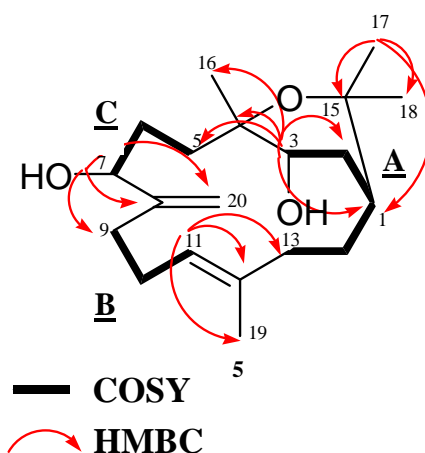


Figura 5

Per quanto riguarda la stereochimica del decariolo B (5), un grosso aiuto è stato fornito dai dati NMR del noto decariolo e dagli accoppiamenti dipolari evidenziati in uno esperimento 2D ROESY NMR.

Per gli stereocentri inclusi nel ciclo a sei termini (C-1/C-15), la sovrapposizione dei chemical shift e delle costanti di accoppiamento del nuovo composto con quelli relativi al decariolo, ci ha fatto supporre la stessa configurazione relativa.

Dall'analisi dello spettro ROESY, abbiamo potuto stabilire la configurazione *E* del doppio legame $\Delta^{11,12}$; sono state infatti osservate le correlazioni dei protoni metilici H₃-19 (δ_H 1.62) con H-10b (δ_H 2.50) e di H-11 (δ_H 5.29) con H-13a (δ_H 2.05). Per determinare la configurazione relativa del carbonio ossigenato in posizione 7 è stato fondamentale l'accoppiamento dei protoni metilici H₃-16 (δ_H 1.18) con H-7 (δ_H 4.14). (Figura 6).

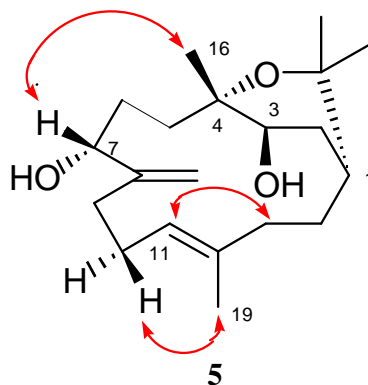


Figura 6

Allo scopo di dedurre la configurazione assoluta dei centri stereogenici del decariolo B (**5**) è stato possibile sfruttare la presenza di gruppi alcolici secondari per l'applicazione del metodo di Mosher modificato.

Il trattamento di due aliquote di decariolo B (**5**) con (*R*) e (*S*)-cloruro MTPA in piridina anidra ha portato ai due corrispondenti esteri di Mosher (*S* e *R* rispettivamente) e le distribuzioni dei valori di $\Delta\delta$ ($\delta_S - \delta_R$), indicavano una stereochimica assoluta *R* sia per C-3 che per C-7 (**Figura 7**).

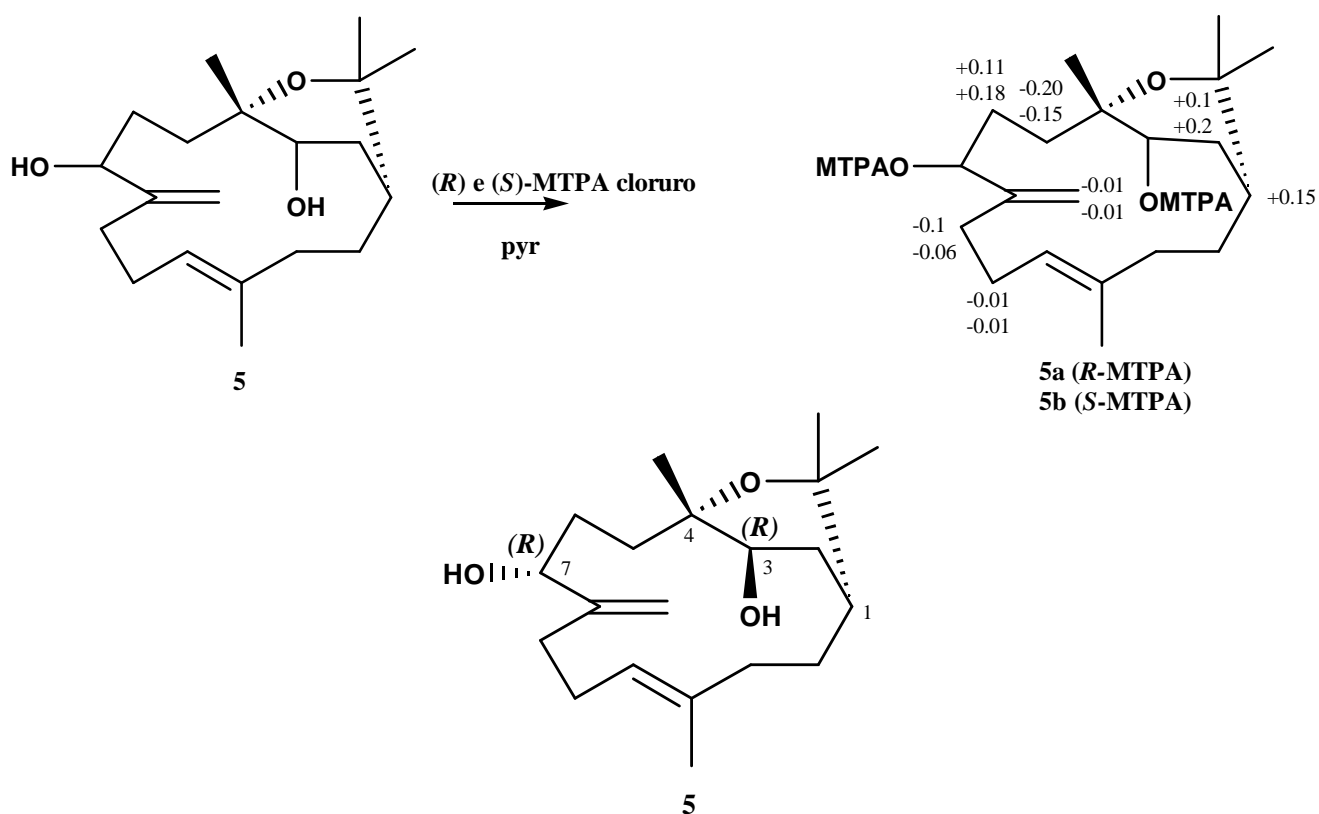


Figura 7

Dalla configurazione di C-3 è stato possibile dedurre anche quella di C-1 e C-4 attraverso le considerazioni sopra riportate.

L'ESI-MS del decariolo C (**6**), $[\alpha]_D + 2.17$ (c 0.2, CHCl_3), ha mostrato il segnale dello ione pseudomolecolare a m/z 387 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, mentre il picco a m/z 364.5043 nel HR-EIMS ha suggerito per il composto **6** la formula molecolare $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_4$ indicando la presenza di cinque insaturazioni. Lo spettro ^1H NMR del composto **6** (**Tabella 1**) è molto simile a quello relativo al composto **5**. Ci sono soltanto due evidenti differenze: (i) lo

spostamento a campi più bassi del protone relativo al metino ossigenato nel decariolo B (**5**) (H-3, δ_H 4.81 invece di δ_H 3.66); (ii) un singoletto tipico di un acetile a δ_H 2.08. La presenza di un acetile nel composto **6** al posto di un gruppo ossidrilico libero al C-3 spiegava sia il grado di insaturazione aggiuntivo previsto dalla formula molecolare, sia lo spostamento a campi più bassi del protone in posizione 3. La conferma sulla struttura planare del composto **6** è stata fornita dall'analisi di un esperimento 2D HMBC NMR. Di fondamentale importanza è stata l'osservazione della presenza di un carbonio quaternario a δ_C 170.89 (**Tabella 2**), tipico valore di un carbonio estereo; in particolare le correlazioni $^{2,3}J_{C-H}$ che hanno permesso di costruire la struttura planare del decariolo C (**6**) sono state quelle di H-3 (δ_H 4.81) con C-1, C-2, C-4, C-5, C-16 ed il carbonile estereo C-21 risonante a δ_C 170.89.

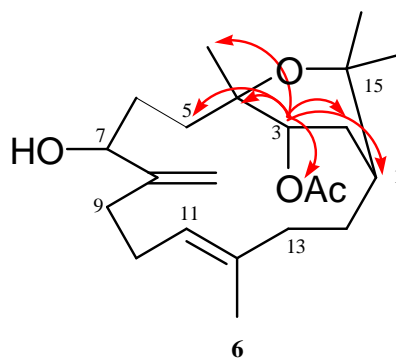


Figura 8

I dati ^{13}C NMR/ 1H NMR e le correlazioni HMBC relative alla porzione C-6/C-14 erano praticamente sovrapponibili a quelle del decariolo B. Le principali correlazioni HMBC sono mostrate in **Figura 8**. Per la determinazione della configurazione assoluta del decariolo C (**6**) abbiamo utilizzato una doppia reazione di acetilazione, sfruttando come riferimento la configurazione nota del composto **5**. Entrambe le molecole sono state acetilate con anidride acetica in piridina anidra e, ottenendo per entrambi i composti lo stesso diacetil-derivato **6a**, abbiamo dedotto che il composto **6** condivide la stessa configurazione assoluta del composto **5** (**Figura 9**).

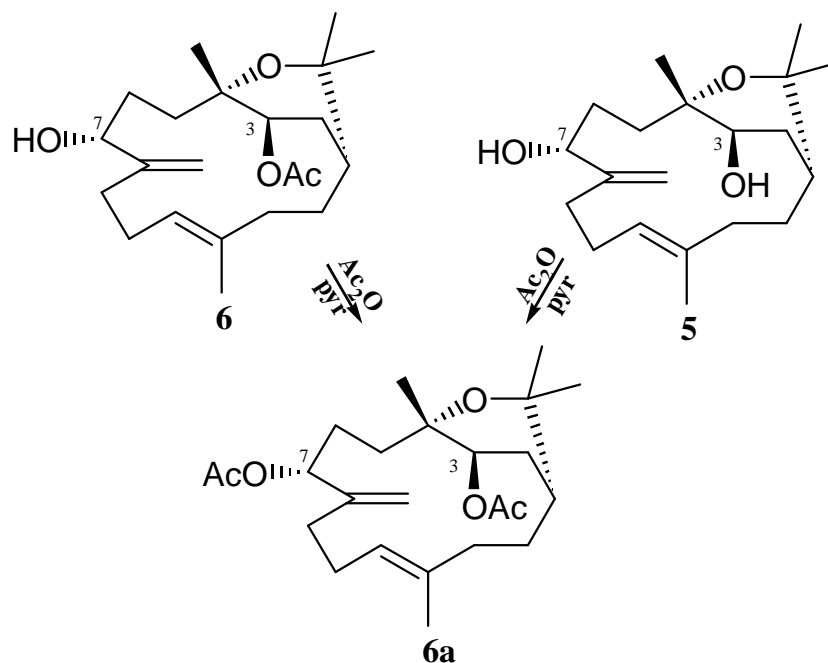


Figura 9

Nello spettro ESI-MS del decariolo D (**7**), $[\alpha]_D - 7.05$ (c 0.2, CHCl_3), è stato osservato un segnale corrispondente allo ione pseudomolecolare ad un valore di m/z 361 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, mentre nello spettro HR-EIMS, il picco a m/z 338.4654 ha indicato per composto **7** la formula molecolare $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_4$, con quattro gradi di insaturazione.

Dalla formula molecolare si evince che il decariolo D (**7**) differisce dal decariolo B (**5**) per la presenza di un ossigeno aggiuntivo. La struttura planare del composto **7** è stata determinata mediante il confronto dei suoi dati spettroscopici con quelli relativi al composto **5**. Già nello spettro ^1H NMR (**Tabella 1**, CDCl_3) è stata osservata solo la presenza di un doppio doppietto a δ_{H} 4.35 al posto del segnale a δ_{H} 4.14 relativo ad H-7 nel decariolo B; inoltre lo spettro protonico mostra un singoletto a δ_{H} 7.75 tipico di un protone perossidico. Lo spettro HSQC ha permesso di associare il protone a δ_{H} 4.35 con un carbonio a δ_{C} 91.2 ed anche questo spostamento a campi bassi è in accordo con la presenza della funzionalità idroperossidica. Attraverso l'analisi di uno spettro 2D HMBC NMR del composto **7** è stato possibile confermare la sua struttura planare. Di fondamentale importanza è stata la correlazione $^3J_{\text{C-H}}$ dei protoni dell'esometilene (δ_{H} 5.12 e 5.19) con il carbonio risonante a δ_{C} 91.2. I dati ^{13}C NMR/ ^1H NMR e le correlazioni HMBC relative alla porzione C-6/C-14 erano

praticamente sovrapponibili a quelle del decariolo B. Le principali correlazioni HMBC per il decariolo D sono riportate in **Figura 10**.

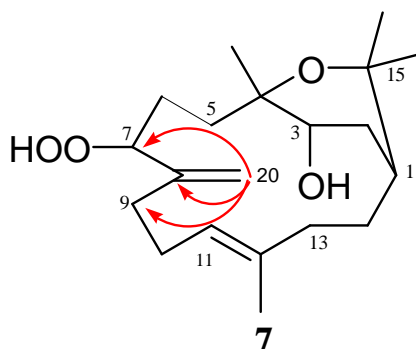


Figura 10

La reazione di riduzione del gruppo idroperossidico a gruppo alcolico con Ph_3P ha fornito una molecola identica al decariolo B (dati NMR ed α) da cui si deduce che i due composti hanno la stessa configurazione assoluta (**Figura 11**).

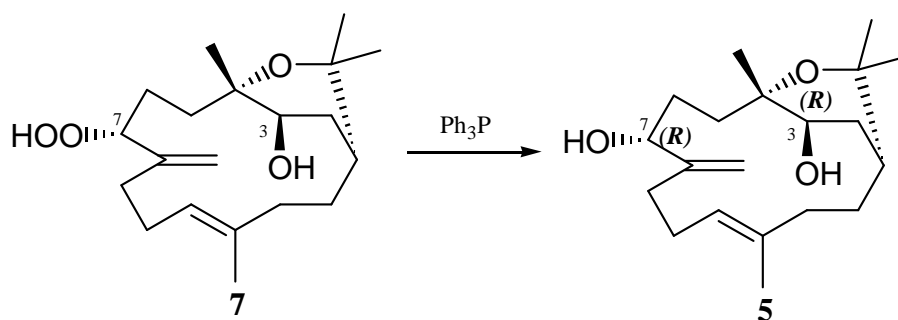


Figura 11

Lo spettro ESI-MS di umbellizoanthamina (**8**) $[\alpha]_{\text{D}} +18.0$ (c 0.2, CHCl_3), ha mostrato un picco dello ione pseudomolecolare a m/z 498 $[\text{M} + \text{H}]^+$, mentre nello spettro HR-EIMS, il picco a m/z 497.6744 ha indicato per il composto **8** la formula molecolare $\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{NO}_5$ corrispondente a 10 gradi di insaturazione. Gli spettri monodimensionali ^1H e ^{13}C NMR di tale composto (C_6D_6 , 500 MHz, **Tabella 3**) hanno mostrato la presenza di

alcuni gruppi caratteristici: (1) un doppio legame esometilenico (δ_{H} 5.18 e 4.87), (2) due segnali corrispondenti a metini ossigenati (δ_{H} 3.52 e 4.28), (3) cinque metili di cui due risonanti come doppietti (δ_{H} 0.63 e 1.0 ppm) e tre come singoletti (δ_{H} 0.69, 0.75 e 0.84 ppm), (4) due carboni carbonilici di cui uno estereo (δ_{C} 174.2) ed uno chetonico (δ_{C} 212.0). Erano state pertanto assegnate solo tre delle insaturazioni previste. Il composto doveva quindi essere eptaciclico. Attraverso un esperimento 2D COSY NMR è stato possibile raggruppare tutti i protoni risonanti come multipletti in quattro sistemi di spin, di cui due estesi: il primo va da H₂-1 (δ_{H} 2.75 e 2.83) a H₂-8 (δ_{H} 0.89 e 1.30) ed il secondo include il metino ossigenato H-16 (δ_{H} 3.52) fino a H-19 (δ_{H} 2.17), inclusi il metile H₃-26 (δ_{H} 0.63), il metilene H₂-14 (δ_{H} 1.49 e 2.20) ed il metino H-13 (δ_{H} 1.29). I sistemi di spin sono indicati in **Figura 12**. Per la determinazione completa della struttura planare del composto **8** è stata necessaria l'analisi dei dati NMR forniti dagli spettri bidimensionali eteronucleari HSQC e HMBC. In particolare attraverso un esperimento HSQC ($^1J_{\text{C-H}}$) è stato possibile assegnare i protoni ai rispettivi carboni. Dall'analisi di un esperimento HMBC ($^{2,3}J_{\text{C-H}}$) è stato possibile connettere tra loro le subunità strutturali precedentemente individuate. Di particolare importanza sono state le correlazioni $^{2,3}J_{\text{C-H}}$ di H₂-8 (δ_{H} 0.89, 1.30) con C-6, C-7, C-9, C-23, C-24 (carbonio carbonilico estereo con δ_{C} 174.2) ed i picchi di correlazione del protone del metino ossigenato a δ_{H} 4.28 con C-1, C-3, C-4, ma soprattutto con C-6; tale correlazione ha permesso di stabilire la presenza di un ponte ossigenato tra C-2 e C-6. Le principali correlazioni $^{2,3}J_{\text{C-H}}$ HMBC sono riportate in **Figura 12**.

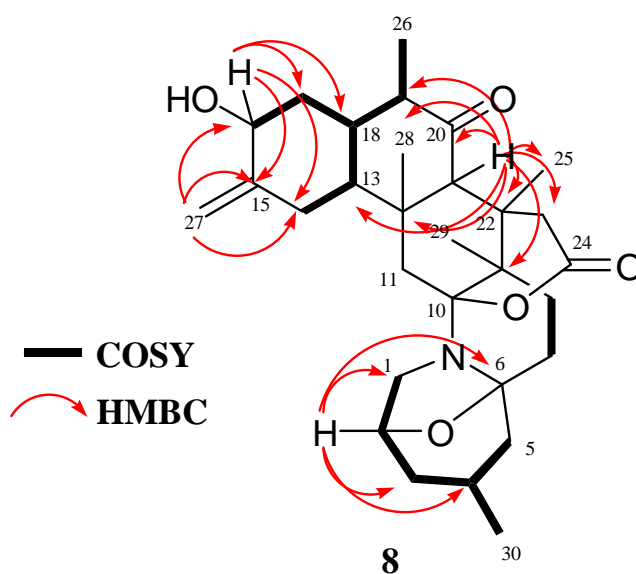


Figura 12

Per la determinazione della configurazione relativa del composto **8** abbiamo utilizzato l'analisi dei valori delle costanti di accoppiamento e le correlazioni ROESY NMR.

Di fondamentale importanza è stata la correlazione tra H-16 e H-18, mentre la costante di accoppiamento H-13/H-18 ($J = 11$ Hz) ha consentito di dedurre una giunzione di tipo *trans* tra i nuclei A e B. Inoltre importanti sono state le correlazioni di H-18 con i protoni metilici H₃-28, di H-13 con i protoni H₃-26, di H₃-26 con H-21 e di questo con H₃-25. Il protone H-21 dà inoltre un effetto NOE con H-13 (che conferma la giunzione tra i cicli di tipo *trans*) e con H₃-29. Un'altra correlazione importante è stata quella osservata di H₃-29 con H-11a che ha permesso di stabilire la configurazione al C-10. Le principali correlazioni ROESY sono riportate in **Figura 13**. Data la completa sovrapposibilità dei dati NMR (chemical shifts e costanti di accoppiamento) relativi all'anello G con quelli della zoanthamina riportata in letteratura, per questa parte strutturale è stato possibile dedurre la stessa configurazione relativa; la struttura della zoanthamina era stata determinata in maniera inequivocabile attraverso studi di diffrazione di raggi X.

Per la determinazione della configurazione assoluta dei centri stereogenici del composto **8**, abbiamo deciso di trarre vantaggio dalla presenza di un unico gruppo alcolico secondario per l'applicazione del metodo di Mosher modificato. Due aliquote del composto sono state trattate con (*R*)- e (*S*)-MTPA cloruro in piridina anidra e sono stati così ottenuti i due esteri (*S*)- e (*R*)- corrispondenti. Dalle differenze di chemical shift ($\Delta\delta_{S-R}$), osservate attraverso un esperimento COSY (500 MHz, CDCl₃), è stato possibile assegnare la configurazione *S* al C-16. Partendo da questo carbonio, attraverso gli effetti NOE precedentemente analizzati ed i valori delle costanti di accoppiamento (J_{H-H}) osservati, è stato possibile assegnare la configurazione assoluta anche degli altri centri chirali. La chiralità dei carboni C-2, C-4 e C-6 è stata assegnata dal confronto dei dati riportati per la zoanthamina.

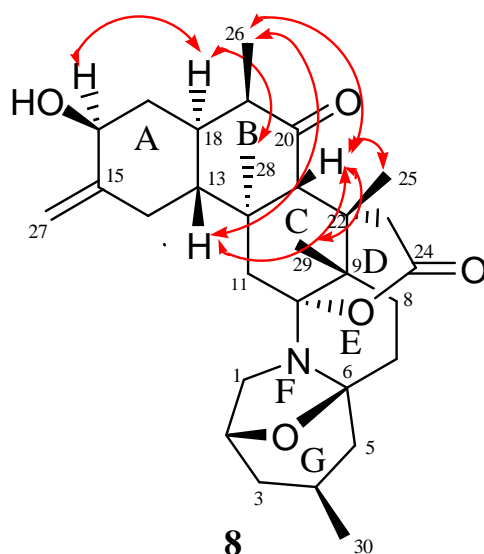


Figura 13

VII. C. MODIFICAZIONI SEMISINTETICHE DEL DECARIOLO

Il decariolo (**1**) ha dimostrato una potente attività antiproliferativa concentrazione-dipendente nei confronti di diverse linee cellulari ed in particolare contro la linea MCF7; esso sembra agire come inibitore ciclo-specifico della crescita cellulare arrestando la mitosi nella fase G2.

Per ottenere informazioni circa l'attività di tale composto, abbiamo pensato di effettuare dei saggi farmacologici sugli analoghi strutturali del decariolo isolati, per comprendere la regione farmacoforica della molecola, nonché stabilire quali cambiamenti strutturali migliorano o peggiorano l'attività antiproliferativa.

La presenza di consistenti quantità di decariolo estratto dal soft coral *Umbellulifera sp.*, ci offriva la possibilità di preparare una serie di derivati semisintetici del decariolo, in modo che, saggiando anche dei derivati semisintetici si potesse avere un maggior numero di informazioni sulle relazioni struttura-attività. A questo scopo abbiamo potuto trarre vantaggio dalla presenza di gruppi reattivi, come doppi legami e gruppi alcolici, effettuando reazioni di acetilazione e metilazione del gruppo ossidrilico e reazioni di

ossidazione dei doppi legami. I composti ottenuti si vanno ad aggiungere agli analoghi naturali del decariolo, sui quali sono stati effettuati i saggi farmacologici.

1) Epossidazione del decariolo:

Una aliquota di decariolo (**1**, 28.8 mg, 0.095 mmol) è stato sciolto in diclorometano anidro. Alla soluzione sono stati aggiunti 16.34 mmol di acido *m*-cloroperbenzoico. La reazione è stata eseguita sotto agitazione per una notte a temperatura ambiente e monitorata mediante TLC. La miscela così ottenuta è stata ripartita tra CHCl₃ ed una soluzione acquosa saturata con NaHCO₃. La fase organica ottenuta (28.8 mg), contenente il prodotto desiderato, è stata purificata mediante HPLC a fase diretta (eluente: *n*-esano/AcOEt 6:4). Sono stati ottenuti tre composti allo stato puro: due corrispondenti al decariolo monoepossidato (**1a** e **1b**, 1.4 e 1.2 mg rispettivamente) e uno corrispondente al decariolo biepossidato (**1c**, 4.4 mg) su entrambi i doppi legami (**Figura 14**).

La struttura dei composti ottenuti è stata determinata attraverso esperimenti NMR mono- e bi-dimensionali, soprattutto per confronto con i dati spettroscopici relativi al decariolo (**1**) di partenza.

In particolare nello spettro ¹H NMR dei due composti mono-epossidati (**1a** e **1b**) abbiamo osservato l'assenza di uno dei due segnali dei doppi legami del decariolo (δ_H 4.89 e 5.26) e la comparsa di un multipletto a δ_H 2.82 per il composto **1a** e δ_H 2.56 per il composto **1b**, valori tipici di protoni epossidici. Dall'analisi dello spettro protonico di **1c** abbiamo osservato l'assenza dei segnali di entrambi i doppi legami del decariolo e la comparsa di due segnali relativi a protoni epossidici (δ_H 2.65 e 2.97).

Per l'assegnazione dei chemical shift di tutti i protoni e i carboni ci siamo avvalsi degli esperimenti COSY, HSQC e HMBC. L'attacco *sin* del MCPBA sui doppi legami *trans* ha portato alla formazione di epossidi *trans* e, per stabilire la configurazione assoluta dei centri stereogenici nei composti ottenuti, sono state utilizzate le correlazioni spaziali in uno spettro ROESY, traendo vantaggio dalla configurazione nota del decariolo.

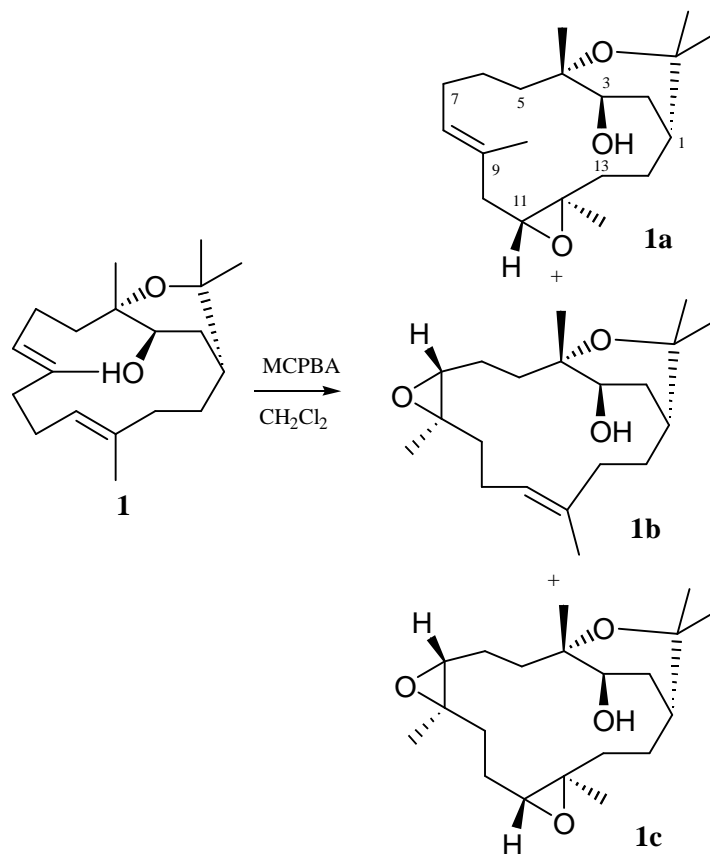


Figura 14.

2) Acetilazione del decariolo:

Un'aliquota di decariolo (**1**, 5.5 mg) è stata sciolta in 250 μL di piridina e trattata con lo stesso volume di anidride acetica. La reazione è stata eseguita per una notte a temperatura ambiente. Il prodotto ottenuto (**1d**) è stato analizzato mediante le tecniche NMR. Nello spettro protonico, confrontato con quello corrispondente al decariolo di partenza, è stato osservato lo spostamento del multipletto corrispondente al metino in posizione 3 da δ_{H} 4.15 a δ_{H} 5.49 ed inoltre la presenza di un singoletto a δ_{H} 2.0 tipico di un gruppo acetilico (**Figura 15**).

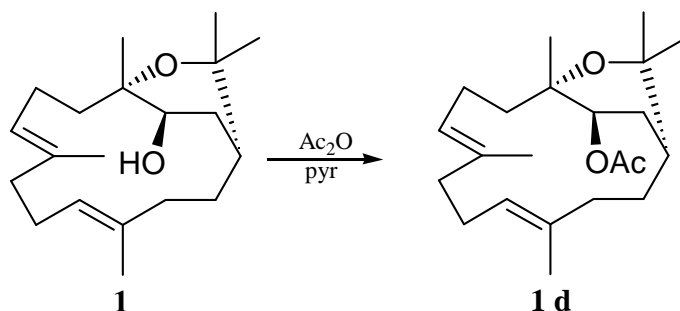


Figura 15

3) Metilazione del decariolo:

Una porzione di decariolo (**1**, 34.0 mg, 0.111 mmol) è stata sciolta in diclorometano anidro aggiungendo un eccesso (150 μ L) di 2,6-di-*t*-butilpiridina e metiltrifluorometansolfonato (60.8 μ L, 0.555 mmol). La reazione è stata eseguita a 0°C, sotto agitazione per una notte. La miscela così ottenuta è stata trattata con una soluzione satura di NaHCO₃. La fase organica, anidrificata con Na₂SO₄, è stata concentrata sottovuoto. Sono stati ottenuti 47.9 mg di prodotto che sono stati successivamente purificati mediante HPLC a fase diretta (eluente: *n*-esano/AcOEt 87:13) fornendo 11 mg di decariolo metilato (**1e**) allo stato puro (**Figura 16**). Il composto **1e** è stato analizzato mediante spettroscopia NMR. Nello spettro ¹H NMR è stato osservato lo spostamento del segnale del metino ossigenato in posizione 3 del decariolo da δ_{H} 4.15 a δ_{H} 3.77, oltre alla comparsa di un segnale metossilico a δ_{H} 3.40. La conferma del composto ottenuto è stata inoltre fornita dallo spettro di massa ESI/MS che ha mostrato un picco dello ione pseudomolecolare a m/z 343.3 [M + Na]⁺ corrispondente proprio al decariolo metilato.

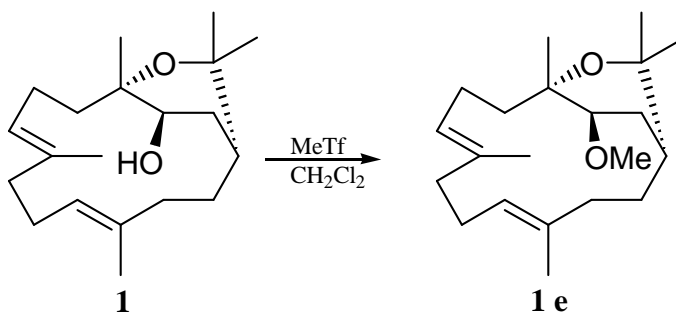


Figura 16

4) Ossidazione del decariolo:

Il biossido di selenio rappresenta uno dei più affidabili e prevedibili reagenti per l'inserimento di ossigeno in posizione allylica. 24.4 mg di SeO_2 sono stati sciolti in 333 μL di diclorometano anidro e 97.6 μL di *terz*-butilidroperossido. La soluzione è stata lasciata sotto agitazione per 30 min a temperatura ambiente. Alla soluzione sono stati aggiunti 49.7 mg di decariolo (**1**). La reazione è stata eseguita per 24 h a temperatura ambiente sotto agitazione. Il prodotto ottenuto è stato trattato con benzene ed è stato ripartito tra acqua ed acetato di etile. La fase organica in acetato di etile (27.6 mg) è stata cromatografata mediante HPLC utilizzando come eluente *n*-esano/AcOEt 5:5 ed ottenendo il prodotto **1f** (0.5 mg), derivato del decariolo, allo stato puro (**Figura 17**).

Nello spettro ^1H NMR del composto **1f** abbiamo osservato la comparsa di due singoletti risonanti a chemical shift tipici di protoni aldeidici (δ_{H} 10.0 e 10.24), la presenza di doppi legami più deschermati rispetto a quelli presenti nel decariolo (δ_{H} 6.17 e 6.73) e la scomparsa dei due singoletti metilici del decariolo (δ_{H} 1.57). Tali dati dimostravano l'ossidazione più spinta dei metili dei doppi legami a gruppi aldeidici. La struttura del prodotto **1f** è stata confermata anche mediante esperimenti bidimensionali.

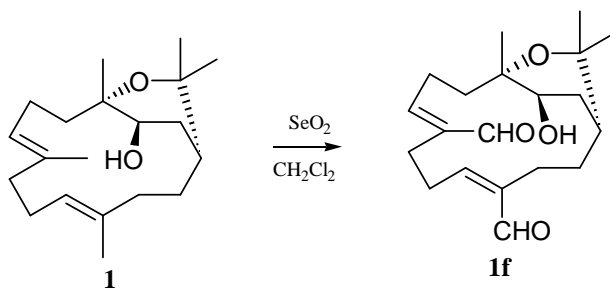


Figura 17

VII. D. ATTIVITA' FARMACOLOGICA

Il decariolo ha dimostrato una buona attività citotossica nei confronti di diverse linee cellulari, con valori di GI_{50} da 0.15 a 8.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$. In particolare, esso mostra una notevole attività inibitoria della crescita cellulare (GI_{50} 0.15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contro MCF7,

adenocarcinoma al seno) e sembra agire come inibitore specifico del ciclo cellulare sulla fase mitotica G2.

Allo scopo di verificare la citotossicità di tale composto e stabilire delle relazioni struttura-attività antiproliferativa, abbiamo deciso di effettuare dei saggi farmacologici sul decariolo, sui suoi analoghi naturali e sui derivati semisintetici. Per tali test abbiamo scelto una linea cellulare a nostra disposizione, la linea C6 (cellule di glioma di ratto).

Quindi, la bioattività dei composti **1-7** (esclusi **3** e **5**) e dei derivati del decariolo **1a-f** è stata studiata su cellule di glioma di ratto, attraverso la valutazione della crescita cellulare. A questo scopo, le cellule sono state trattate di continuo per 48 h con diverse concentrazioni di ogni composto e dopo sono state contate e sottoposte al saggio MTT.

A differenza dei dati riportati in letteratura sulle cellule MCF7, per il decariolo non è stata riscontrata alcuna attività citotossica sulle cellule C6, così come per i composti naturali **2** e **6** e per i semisintetici epossidici (**1a**, **b** e **c**) e **1f**. Gli unici composti per i quali abbiamo osservato una $IC_{50} < 100$ sono stati i naturali **4** e **7** ed i semisintetici **1d** e **1e**. Si tratta dei composti più apolari della serie, pertanto sembra che l'attività dipenda da questo fattore.

I saggi farmacologici sono ancora in corso, pertanto i dati IC_{50} non saranno riportati.

VII. E. PARTE SPERIMENTALE

Strumentazione. Le rotazioni ottiche sono state misurate in $CHCl_3$ su un polarimetro Perkin-Elmer 192 equipaggiato con una lampada al sodio ($\lambda = 589$ nm) ed una microcella di 10-cm. Gli spettri IR (KBr) sono stati misurati su uno spettrofotometro modello Bruker IFS-48. Gli spettri UV sono stati ottenuti in CH_3CN usando uno spettrofotometro Beckman DU70. Gli spettri di massa FAB-MS sono stati ottenuti su un spettrometro di massa FISION Prospec usando una matrice di glicerolo. Gli spettri 1H (500 e 700 MHz) e ^{13}C (500 MHz) sono stati misurati su uno spettrometro Bruker AMX-500; i chemical shift sono riferiti ai segnali dei solventi ($CDCl_3$; $\delta_H = 7.26$, $\delta_C = 77.0$). Le molteplicità dei segnali ^{13}C sono stati determinati con esperimenti DEPT. Le correlazioni omonucleari $^1H-^1H$ sono state determinate mediante esperimenti COSY. Le correlazioni eteronucleari $^1H-^{13}C$ sono state determinate con esperimenti HSQC. Le correlazioni $^1H-^{13}C$ attraverso due e tre legami sono state determinate con esperimenti HMBC ottimizzati per $^{2,3}J$ di 8.0 Hz.

Le cromatografie liquide a media pressione (MPLC) sono state effettuate usando un sistema Büchi 861 con fase stazionaria SiO₂ (230-400 mesh). Le separazioni con cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) sono state ottenute in modo isocratico su un sistema Beckmann equipaggiato con rivelatore RI e colonne LUNA (SI60, 250 x 4 mm).

Materiale animale, estrazione e isolamento.

Un campione di *Umbellulifera sp.* è stato raccolto nel 2005 lungo le coste di Manado in Indonesia, subito congelato e mantenuto tale fino all'estrazione. Un campione di riferimento è stato depositato nel Dipartimento di Chimica delle Sostanze Naturali dell'Università di Napoli "Federico II". L'organismo (500 g peso secco dopo estrazione) è stato omogeneizzato ed estratto con metanolo (4 x 500 mL) e cloroformio. L'estratto ottenuto è stato concentrato, sottovuoto e poi ripartito tra acqua ed EtOAc.

L'estratto in acetato di etile (2.04 g) è stato cromatografato mediante MPLC a fase diretta utilizzando un sistema a gradiente di eluizione a polarità crescente da *n*-esano 100% ad AcOEt 100% e da AcOEt 100% a MeOH 100%. Sono state raccolte 19 frazioni. La frazione 6 (19.0 mg) della MPLC eluita con *n*-esano/AcOEt 75:25 è stata ulteriormente purificata mediante HPLC a fase diretta (eluente *n*-esano/AcOEt 6:4) fornendo il nuovo composto decariolo C (**6**, 1.8 mg) allo stato puro. Dalle frazioni di MPLC eluite con *n*-esano/AcOEt 4:6 (29.0 mg) e 6:4 (37.7 mg), in seguito a purificazione mediante HPLC (eluenti *n*-esano/AcOEt 6:4 e 7:3 rispettivamente) sono stati isolati i due nuovi cembrani decariolo B (**5**, 1.8 mg) e D (**7**, 2.8 mg) allo stato puro. La frazione 14 (9.0 mg) da MPLC eluita con *n*-esano/AcOEt 2:8 è stata ulteriormente purificata mediante HPLC utilizzando *n*-esano/AcOEt 25:75 fornendo il nuovo composto umbellizoanthamina (**8**, 3.0 mg) allo stato puro. Le separazioni cromatografiche sono state eseguite su colonne LUNA silica (2) 5 μ (250 x 4 mm) ad un flusso di 0.8 mL/min.

Decariolo B (5): Solido amorfo incolore. $[\alpha]_D^{25}$ -13.4 ($c = 3.5$ mg/mL in CHCl₃); ESI-MS: m/z 345 [M + Na]⁺; calc. per C₂₀H₃₄O₃, 322.48; ¹H e ¹³C NMR (CDCl₃): vedi **Tabelle 1 e 2**.

Decariolo C (6): Solido amorfo incolore. $[\alpha]_D^{25} + 2.17$ ($c = 3.5$ mg/mL in CHCl_3); ESI-MS: m/z 387 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; calc. per $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_4$, 364.5020; ^1H e ^{13}C NMR (CDCl_3): vedi **Tabelle 1 e 2**.

Decariolo D (7): Solido amorfo incolore. $[\alpha]_D^{25} - 7.05$ ($c = 3.5$ mg/mL in CHCl_3); ESI-MS: m/z 361 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; calc. per $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_4$, 338.4664; ^1H e ^{13}C NMR (CDCl_3): vedi **Tabelle 1 e 2**.

Umbellizoantamina (8): Solido amorfo incolore. $[\alpha]_D^{25} + 18.0$ ($c = 3.5$ mg/mL in CHCl_3); ESI-MS: m/z 498 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; calc. per $\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{NO}_5$, 497.6718; ^1H e ^{13}C NMR (C_6D_6): vedi **Tabella 3**.

Epossidazione del decariolo: Il decariolo (**1**, 28.8 mg, 0.095 mmol) è stato sciolto in diclorometano anidro. Alla soluzione sono stati aggiunti 16.34 mmol di acido *m*-cloroperbenzoico. La reazione è stata eseguita sotto agitazione per una notte a temperatura ambiente e monitorata mediante TLC. La miscela così ottenuta è stata ripartita tra CHCl_3 ed una soluzione acquosa saturata con NaHCO_3 . La fase organica ottenuta (28.8 mg), contenente il prodotto desiderato, è stata purificata mediante HPLC (eluente: *n*-esano/AcOEt 6:4) utilizzando una colonna Luna silica (2) 5 μ . Sono stati ottenuti i composti **1a** (1.4 mg), **1b** (1.2 mg) e **1c** (4.4 mg).

Decariolo monoepossidato (1a): Solido amorfo. ESI-MS m/z : 345.4 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; HR-EIMS: m/z 322.4733 (calcolato per $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_3$). ^1H NMR (500 MHz): δ 5.54 (t, H-7), 4.10 (t, H-3, $J = 6.02$ e 10.80 Hz), 2.56 (d, H-11, $J = 9.90$), 2.44 (m, H-6a), 2.33 (sovrapposto, H-9a), 2.15, (sovrapposto, H-6b), 2.12 (sovrapposto, H-13a), 2.11 (sovrapposto, H-13b) 1.79 (m, H-5a), 1.70 (ddd, H-2a), 1.65 (s, H₃-20), 1.64 (sovrapposto, H-5b), 1.62 (ddd, H-10a), 1.55 (sovrapposto, H-10b), 1.53 (sovrapposto, H-1), 1.52 (sovrapposto, H-9b), 1.43 (m, H-14a), 1.31 (sovrapposto, H-2b), 1.27 (s, H₃-19), 1.24 (s, H₃-18), 1.17 (s, H₃-16), 1.11 (s, H₃-17), 1.02 (m, H-14b). ^{13}C NMR (400 MHz): δ 131.30 (s, C-8), 128.20 (d, C-7), 77.32 (s, C-4), 75.26 (s, C-15), 70.08 (d, C-3), 64.12 (d, C-11), 61.21 (s, C-12), 41.82 (d, C-1), 37.94 (t, C-5), 36.37 (t, C-6), 36.00

(t, C-13), 34.21 (t, C-9), 32.02 (t, C-14), 30.08 (q, C-18), 30.01 (t, C-2), 26,96 (t, C-10), 23.97 (q, C-16), 21.88 (q, C-17), 15.88 (q, C-19), 14.61 (q, C-20).

Decariolo monoossidato (1b): Solido amorfo. ESI-MS m/z : 345.4 $[M + Na]^+$; HR-EIMS: m/z 322.4005 (calcolato per $C_{20}H_{34}O_3$). 1H NMR (500 MHz): δ 5.02 (dd, H-11, $J = 10.98$ Hz), 3.67 (dd, H-3, $J = 7.67$ e 13.83 Hz), 2.82 (d, H-7, $J = 6.70$ Hz), 2.45 (m, H-10a), 2.12 (sovrapposto, H-10b), 2.12, (sovrapposto, H-13a), 2.11 (sovrapposto, H-13b), 1.98 (m, H-2a), 1.89 (ddd, H-6a), 1.86 (sovrapposto, H-5a), 1.66 (ddd, H-6b), 1.62 (sovrapposto, H-5b), 1.61 (s, H₃-19), 1.60 (sovrapposto, H-1), 1.45 (m, H-14a), 1.45 (sovrapposto, H₂-9), 1.34 (m, H-2b), 1.25 (s, H₃-20), 1.19 (s, H₃-16), 1.17 (s, H₃-18), 1.14 (s, H₃-17), 1.02 (m, H-5b).

Decariolo bieossidato (1c): Solido amorfo. ESI-MS m/z : 361.4 $[M + Na]^+$; HR-EIMS: m/z 338.4255 (calcolato per $C_{20}H_{34}O_4$). 1H NMR (500 MHz): δ 3.73 (dd, H-3, $J = 5.16$ e 10.32 Hz), 2.97 (d, H-7, $J = 6.79$), 2.65 (d, H-11, $J = 7.18$ Hz), 2.23 (sovrapposto, H-9a), 2.08, (sovrapposto, H-13a), 2.07 (sovrapposto, H-13b), 1.98 (sovrapposto, H-6a) 1.96 (m, H-10a), 1.86 (ddd, H-5a), 1.81 (m, H-2a), 1.74 (sovrapposto, H-10b), 1.64 (ddd, H-6b), 1.62 (sovrapposto, H-9b), 1.62 (sovrapposto, H-5b), 1.45 (m, H-14a), 1.41 (m, H-2b), 1.40 (sovrapposto, H-1), 1.32 (s, H₃-20), 1.30 (s, H₃-19), 1.23 (s, H₃-17), 1.20 (s, H₃-16), 1.15 (s, H₃-18), 1.02 (m, H-14b). ^{13}C NMR (400 MHz): δ 76.30 (s, C-4), 75.78 (s, C-15), 71.60 (d, C-3), 68.93 (d, C-7), 64.48 (d, C-11), 61.87 (s, C-12), 61.75 (s, C-8), 43.07 (d, C-1), 37.80 (t, C-5), 34.90 (t, C-9), 35.38 (t, C-13), 30.01 (q, C-18), 30.01 (t, C-2), 25.64 (t, C-14), 25.32 (t, C-10), 23.70 (q, C-16), 23.08 (t, C-6), 22.00 (q, C-17), 17.60 (q, C-20), 15.90 (q, C-19).

Acetilazione decariolo : Il decariolo (**1**, 5.5 mg) è stato sciolto in 250 μ L di piridina e trattato con lo stesso volume di anidride acetica. La reazione è stata eseguita per una notte a temperatura ambiente. E' stato ottenuto il corrispondente derivato acetilato.

Decariolo acetilato (1d): Solido amorfo. ESI-MS m/z : 371.3 $[M + Na]^+$; HR-EIMS: m/z 348.5043 (calcolato per $C_{22}H_{36}O_3$). 1H NMR (500 MHz): δ 5.49 (dd, H-3, $J = 5.82$ e 11.52 Hz), 5.34 (d, H-7, $J = 9.51$ Hz), 5.06 (d, H-11, $J = 11.09$ Hz), 2.60 (m, H-6a), 2.50, (m, H-10a), 2.33 (sovrapposto, H-9a), 2.33 (sovrapposto, H-9b), 2.05

(sovrapposto, H-10b), 2.03 (sovrapposto, H-13a e H-13b), 2.00 (s, H₃-22), 1.86 (sovrapposto, H-6b), 1.84 (sovrapposto, H-5a), 1.82 (sovrapposto, H-2a), 1.57 (s, H₃-19), 1.57 (s, H₃-20), 1.56 (sovrapposto, H-5b), 1.55 (sovrapposto, H-1), 1.30 (sovrapposto, H-14a), 1.28 (sovrapposto, H-2b), 1.16 (s, H₃-16), 1.12 (s, H₃-18), 1.10 (s, H₃-17), 0.89 (m, H-14b).

Metilazione decariolo : Il decariolo (**1**, 34.0 mg, 0.111 mmol) è stato sciolto in diclorometano anidro aggiungendo un eccesso (150 µL) di 2,6-di-*t*-butilpiridina e metiltrifluorometansolfonato (60.8 µL, 0.555 mmol). La reazione è stata eseguita a 0°C, sotto agitazione per una notte. La miscela così ottenuta è stata trattata con una soluzione satura di NaHCO₃. La fase organica, anidrificata con Na₂SO₄ è stata concentrata sottovuoto. Sono stati ottenuti 47.9 mg di prodotto che sono stati successivamente purificati mediante HPLC a fase diretta (eluente: *n*-esano/AcOEt 87:13) fornendo 11 mg di decariolo metilato (**1e**) allo stato puro.

Decariolo metilato (1e): Solido amorfo. ESI-MS *m/z*: 343.3 [M + Na]⁺; HR-EIMS: *m/z* 320.5015 (calcolato per C₂₁H₃₆O₂). ¹H NMR (500 MHz): δ 5.25 (d, H-7, *J* = 9.20 Hz), 4.87 (d, H-11, *J* = 10.35 Hz), 3.77 (dd, H-7, *J* = 5.44 e 11.85 Hz), 3.40 (s, OMe), 2.61 (m, H-6a), 2.51, (m, H-10a), 2.04 (sovrapposto, H-10b), 2.03 (sovrapposti, H-13a e 13b), 1.95 (sovrapposti, H-9a e 9b), 1.89 (m, H-5a), 1.89 (m, H-6a), 1.87 (d, H-2a, *J* = 5.00 e 11.62 Hz), 1.58 (s, H₃-19), 1.57 (s, H₃-20), 1.53 (sovrapposto, H-5b), 1.51 (sovrapposto, H-1), 1.14 (sovrapposto, H-14a), 1.13 (sovrapposto, H-2b), 0.93 (m, H-14b).

Ossidazione allilica decariolo: 24.4 mg di SeO₂ (0.220 mmol) sono stati sciolti in 333 µL di diclorometano anidro e 97.6 µL di *terz*-butilidroperossido. La soluzione è stata lasciata sotto agitazione per 30 min a temperatura ambiente. Alla soluzione sono stati aggiunti 49.7 mg di decariolo (**1**) (0.162 mmol). La reazione è stata eseguita per 24 h a temperatura ambiente sotto agitazione. Il prodotto ottenuto è stato trattato con benzene ed è stato ripartito tra acqua ed acetato di etile. La fase organica in acetato di etile (27.6 mg) è stata cromatografata mediante HPLC utilizzando come eluente *n*-esano/AcOEt 5:5 ed ottenendo il prodotto **1f** (0.5 mg), derivato del decariolo allo stato puro.

Dialdeide del decariolo (1f): Solido amorfo. ESI-MS m/z : 357.4 $[M + Na]^+$; HR-EIMS: m/z 334.4055 (calcolato per $C_{20}H_{30}O_4$). 1H NMR (500 MHz): δ 10.22 (s, C-19), 10.0 (s, C-20), 6.73 (dd, H-7), 6.17 (dd, H-11), 3.85 (sovrapposto, H-10a), 3.81 (dd, H-3), 3.45 (m, H-6a), 2.84, (d, H-9a), 2.77 (d, H-13a), 2.41 (d, H-10b), 2.30 (m, H-9b), 2.30 (m, H-6b), 2.00 (m, H-5a), 1.78 (d, H-2a), 1.73 (sovrapposto, H-13b), 1.70 (sovrapposto, H-5b), 1.44 (sovrapposto, H-1), 1.42 (sovrapposto, H-2b), 1.26 (sovrapposto, H-14a), 1.20 (s, H₃-16), 1.22 (s, H₃-16), 1.20 (s, H₃-17), 1.10 (s, H₃-18), 1.03 (sovrapposto, H-14b).

Culture cellulari e saggi per l'attività citotossica L'attività biologica dei composti isolati è stata analizzata su cellule di glioma di ratto (linea C6) attraverso la valutazione della crescita cellulare e della capacità di sopravvivere. Le cellule sono state cresciute in mezzo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) contenente elevate quantità di glucosio (4.5 g/L) e integrato col 10% di siero fetale bovino (FBS), L-glutamina (2 mM), penicillina (100 unità/mL) e streptomicina (100 μ g/mL).

Le cellule sono state cresciute a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂ umidificata. Le cellule di glioma sono state lavate, raccolte da tripsina e dopo inoculate in un piatto di coltura di 96-celle per piastra alla densità di 10⁴ cellule per piastra. Le cellule sono state cresciute per 24 h, dopo di che il mezzo è stato sostituito con mezzo fresco e le cellule sono state trattate per altre 48 h con i composti da testare. In particolare, 1 o 2 μ L di soluzioni di DMSO contenenti tali composti sono stati aggiunti al mezzo di coltura cellulare per fornire varie concentrazioni; 1 o 2 μ L di solo DMSO (veicolo) sono stati aggiunti al controllo cellulare (concentrazioni finali di 0.5 e 1% v/v, rispettivamente).

Dopo incubazione, il mezzo è stato rimosso e le cellule sono state lavate due volte con una soluzione PBS e dopo sono state incubate con una soluzione di tripsina-EDTA a 37°C per 5 min. La tripsina è stata inattivata dalle cellule risospese nel mezzo contenente il 10% di FBS. Le cellule sono state risospese in una soluzione salina di Hanks' bilanciata. Le cellule vissute, quelle che escludevano lo 0.4 % di blu di tripano, sono state contate con un emocitometro. Contemporaneamente, la vitalità cellulare è stata valutata con una procedura MTT, che misura il livello dell'attività della deidrogenasi mitocondriale usando 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolil

bromuro (MTT) come substrato.²⁰ Il saggio è stato basato sulla capacità riduttiva dei mitocondri viventi per convertire il MTT dissolto in un formazano insolubile. In breve, dopo trattamenti con i composti testati, il mezzo è stato rimosso e le cellule sono state incubate con 20 μL /cella di una soluzione di MTT (5 mg/mL) per 1 h in incubatore umidificato al 5% di CO_2 a 37°C. L'incubazione è stata fermata dalla rimozione della soluzione di MTT e aggiungendo 100 μL /cella di DMSO per solubilizzare il formazano.²¹ L'assorbanza è stata monitorata a 550 nm usando uno Spettrometro a Luminescenza Perkin-Elmer LS 55 (Perkin-Elmer Ltd, Beaconsfield, UK).

.Il significato statistico dei dati è stato determinato attraverso il test ANOVA seguito dal test Newman-Keuls.

Il calcolo della concentrazione dei composti testati necessaria ad inibire la crescita delle cellule nelle 48 h e la vitalità del 50% (IC_{50}) è stato basato su una serie di dati riportati in triplicato e ripetuti per tre volte. I valori di IC_{50} sono espressi come media \pm SEM.

VII. F. DATI SPETTROSCOPICI

Tabella 1. Dati ^1H di decariolo B (5), C (6) e D (7) in CDCl_3 .

Pos.	5	6	7
	δ_{H} , molt., J in Hz	δ_{H} , molt., J in Hz	δ_{H} , molt., J in Hz
1	1.29	1.34	1.30
2a	2.35, m	2.42	2.33
b	2.38, m	2.46	2.38
3	3.66, dd, 6.65, 16.22	4.81, d, 10.21	3.68
5a	1.08,	1.08	1.34
b	1.33, m	1.33	1.06
6a	1.67	1.69	1.62
b	1.71	1.73	1.65
7	4.14, t, 7.04	4.12, dd, 5.92, 10.28	4.35
9a	2.11	2.00	2.11
b	2.33	2.29	2.25
10a	2.22	2.22	2.47
b	2.50	2.48	2.55
11	5.29	5.30, d, 6.69	5.26
13a	2.05	2.06	2.05
b	2.08	2.07	2.09
14a	1.64	1.68	1.70
b	1.79	1.72	1.75
16	1.18, s	1.17, s	1.15, s
17	1.19, s	1.20, s	1.14, s
18	1.22, s	1.22, s	1.19, s
19	1.62, s	1.61, s	1.61, s
20a	5.02, s	5.01, s	5.12
b	5.06, s	5.04, s	5.19
-OAc		2.08, s	
-OOH			7.75, s

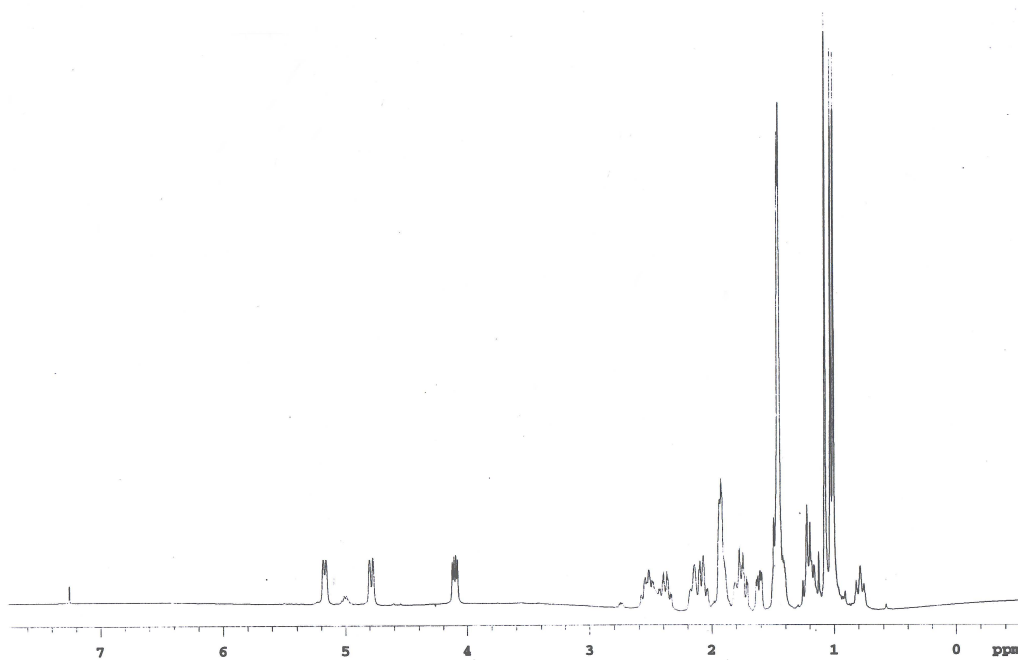
Tabella 2. Dati ^{13}C di decariolo B (5), C (6) e D (7) in CDCl_3 .

Pos.	5	6	7
	δ_{C} , molt.	δ_{C} , molt.	δ_{C} , molt.
1	35.0, CH	34.9, CH	34.9, CH
2	32.3, CH_2	33.0, CH_2	31.4, CH_2
3	71.5, CH	75.93, CH	71.3, CH
4	75.6, C	76.0, C	75.6, C
5	36.6, CH_2	34.71, CH_2	36.4, CH_2
6	28.9, CH_2	37.0, CH_2	31.2, CH_2
7	78.8, CH	78.8, CH	91.2, CH
8	154.0, C	154.1, C	150.0, C
9	29.7, CH_2	30.1, CH_2	30.97, CH_2
10	31.5, CH_2	32.2, CH_2	34.2, CH_2
11	126.7, CH	126.83, CH	126.6, CH
12	134.7, C	134.0, C	135.3, C
13	36.9, CH_2	36.84, CH_2	36.9, CH_2
14	28.6, CH_2	32.2, CH_2	29.3, CH_2
15	75.9, C	70.0, C	75.9, C
16	25.9, CH_3	23.13, CH_3	25.7, CH_3
17	31.1, CH_3	28.8, CH_3	30.9, CH_3
18	24.0, CH_3	24.5, CH_3	23.8, CH_3
19	15.6, CH_3	16.2, CH_3	16.8, CH_3
20	110.7, CH_2	110.0, CH_2	110.3, CH_2
-OAc		170.89, CO	

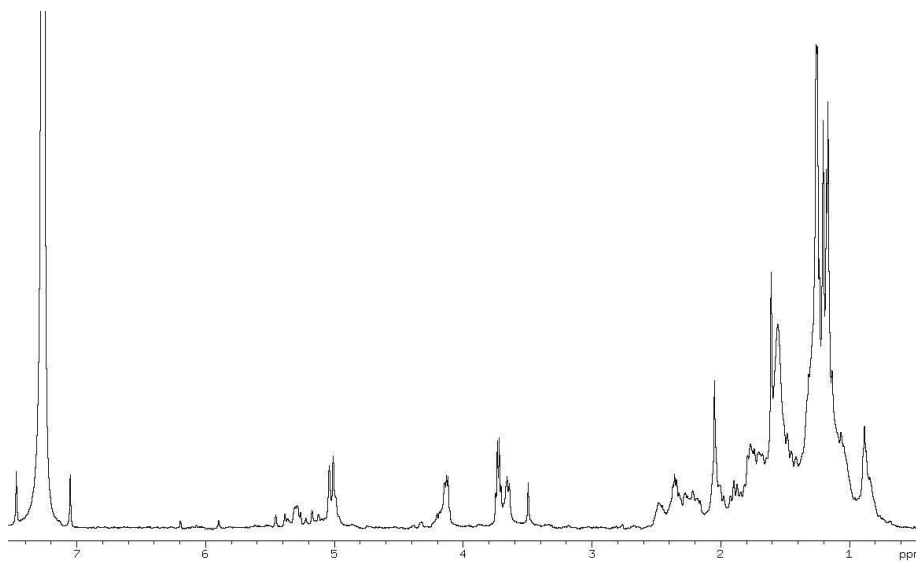
Tabella 3. Dati ^{13}C (175 MHz) e ^1H (700 MHz) NMR di Umbellizoanthamina (**8**) (in C_6D_6).

Pos.	δ_{C} (molt.)	δ_{H} (molt., J in Hz)	Pos.	δ_{C} (molt.)	δ_{H} (molt., J in Hz)
1a	47.0 (CH_2)	2.85 (d, 6.4)	15	160.0 (C)	
1b		2.76 ^[a]	16	71.4 (CH)	3.53 (dd, 9.8, 3.0)
2	74.2 (CH)	4.29 (m)	17a	39.2 (CH_2)	1.28 ^[a]
3a	39.0 (CH_2)	1.41 (m)	17b		1.03 (dd, 11.5, 3.0)
3b		1.29 ^[a]	18	38.1 (CH)	1.52 ^[a]
4	23.1 (CH)	2.38 (m)	19	49.5 (CH)	2.17 (m)
5a	44.9 (CH_2)	2.24 ^[a]	20	212.0 (C)	
5b		1.11 (t, 12.0)	21	54.2 (CH)	2.75 (s)
6	89.9 (C)		22	40.1 (C)	
7a	30.4 (CH_2)	1.81 (dd, 13.2, 4.4)	23a	36.3 (CH_2)	3.95 (d, 20.0)
7b		1.53 ^[a]	23b		2.27 (d, 20.0)
8a	23.7 (CH_2)	1.31 ^[a]	24	174.2 (C)	
8b		0.90 (m)	25	20.7 (CH_3)	0.69 (s)
9	36.1 (C)		26	13.0 (CH_3)	0.64 (d, 7.3)
10	99.8 (C)		27a	105.3 (CH_2)	5.17 (bs)
11a	42.9 (CH_2)	1.87 (d, 14.3)	27b		4.86 (bs)
11b		1.55 (d, 14.3)	28	17.7 (CH_3)	0.84 (s)
12	39.7 (C)		29	17.8 (CH_3)	0.76 (s)
13	52.4 (CH)	1.30 ^[a]	30	21.9 (CH_3)	0.99 (d, 6.4)
14a	33.4 (CH_2)	2.22 ^[a]			
14b		1.47 (dd, 9.5, 2.0)			

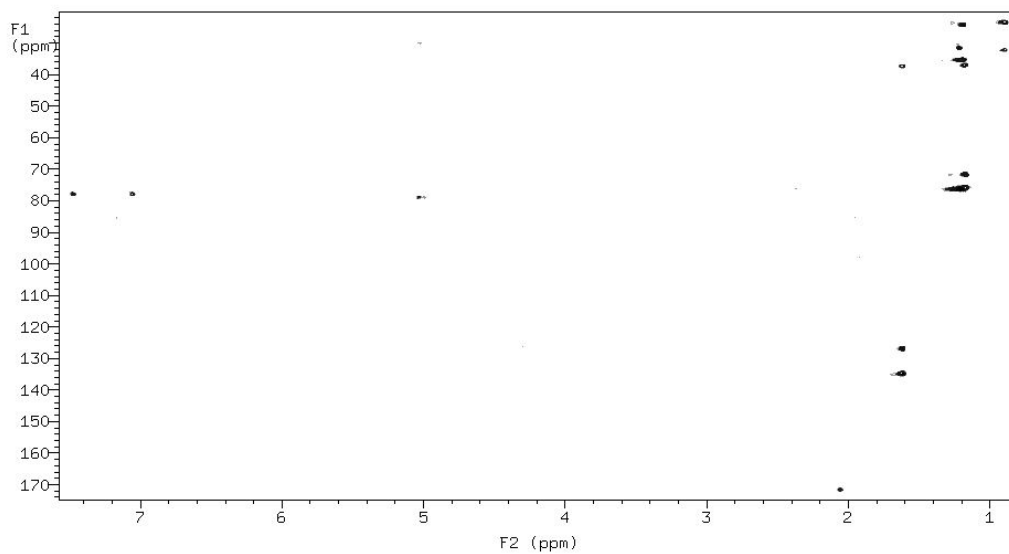
^[a] Sovrapposti con altri segnali.



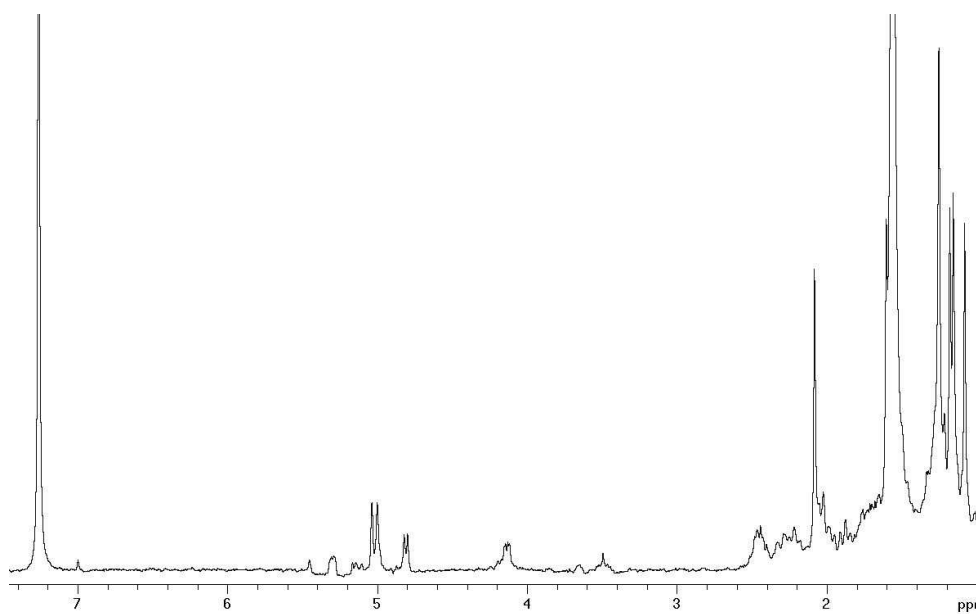
^1H NMR decariolo (500 MHz, CDCl_3).



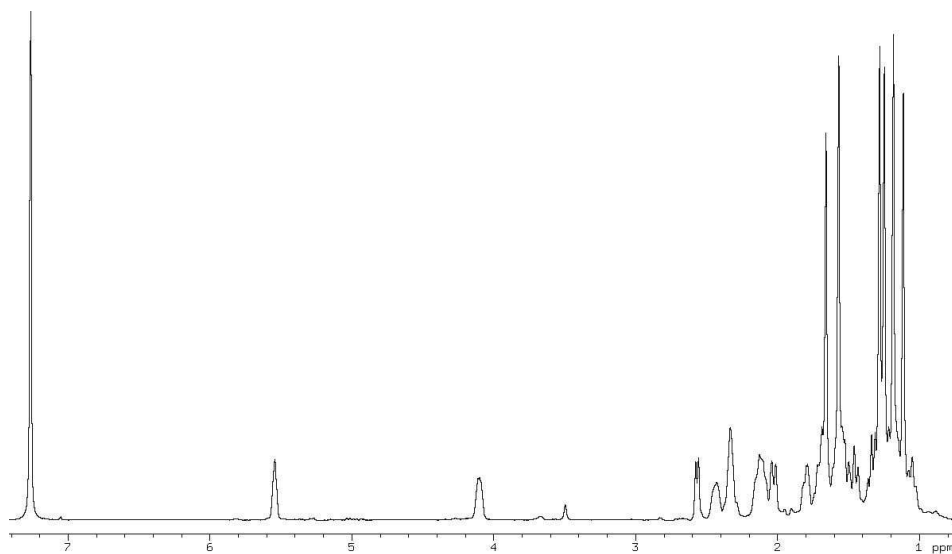
^1H NMR decariolo B (500 MHz, CDCl_3).



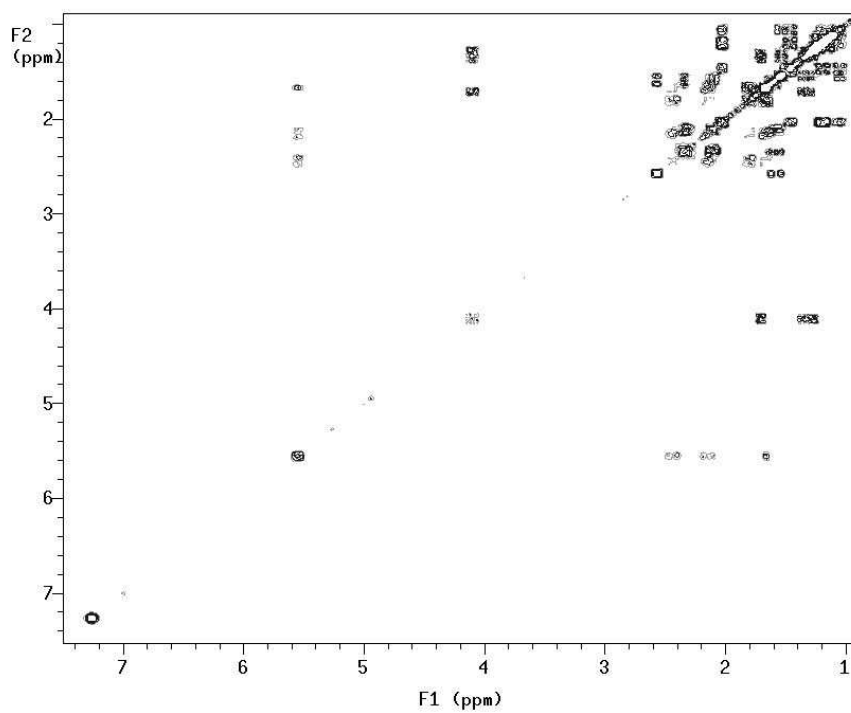
2D HMBC NMR decariolo B (500 MHz, CDCl₃).



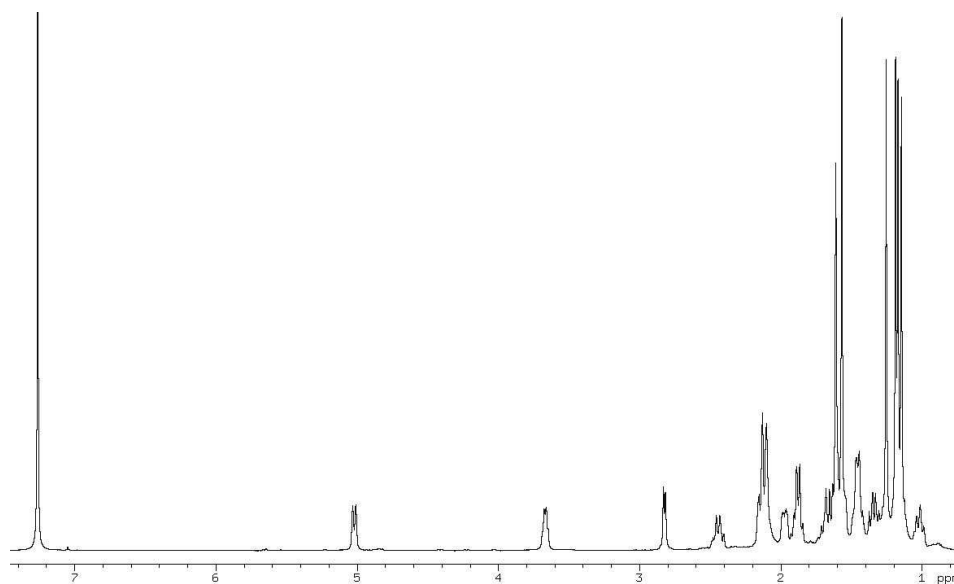
¹H NMR decariolo C (500 MHz, CDCl₃).



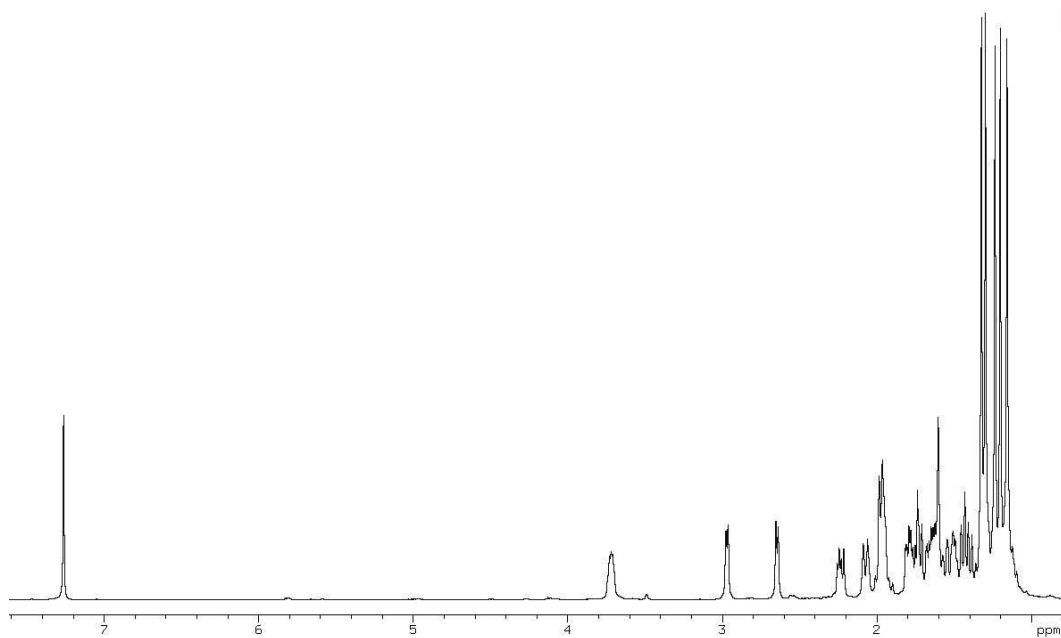
¹H NMR decariolo epossidato 1a (500 MHz, CDCl₃).



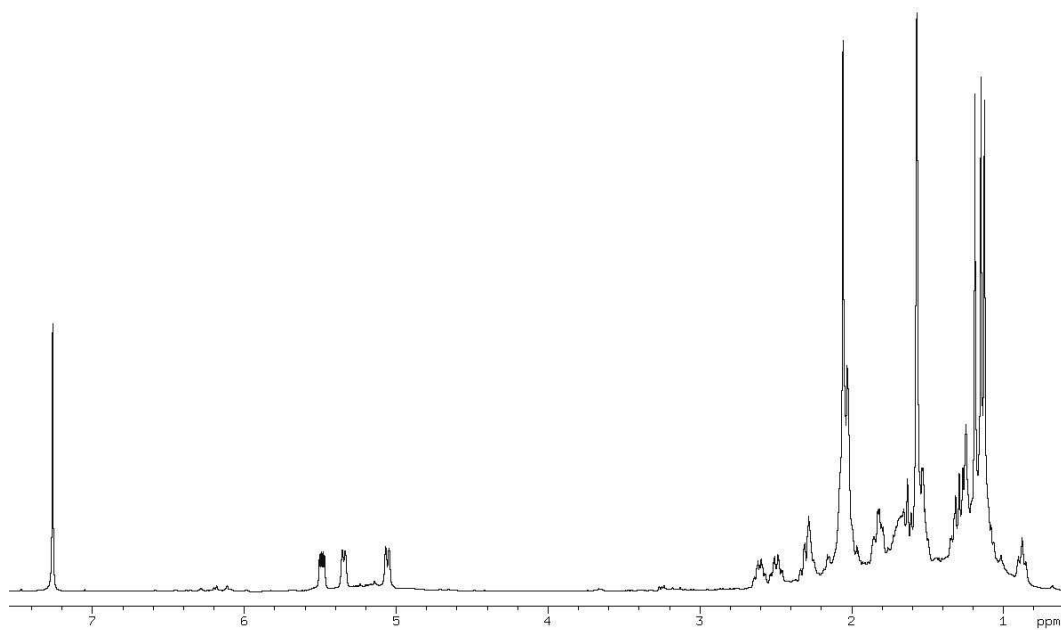
2D COSY NMR decariolo epossidato 1a (500 MHz, CDCl₃).



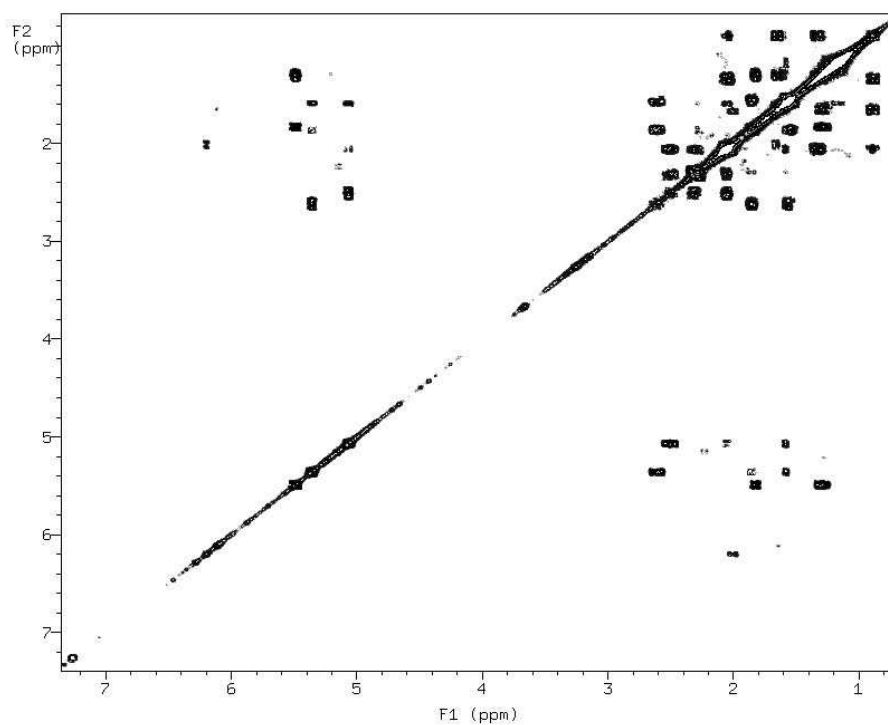
^1H NMR decariolo epossidato 1b (500 MHz, CDCl_3).



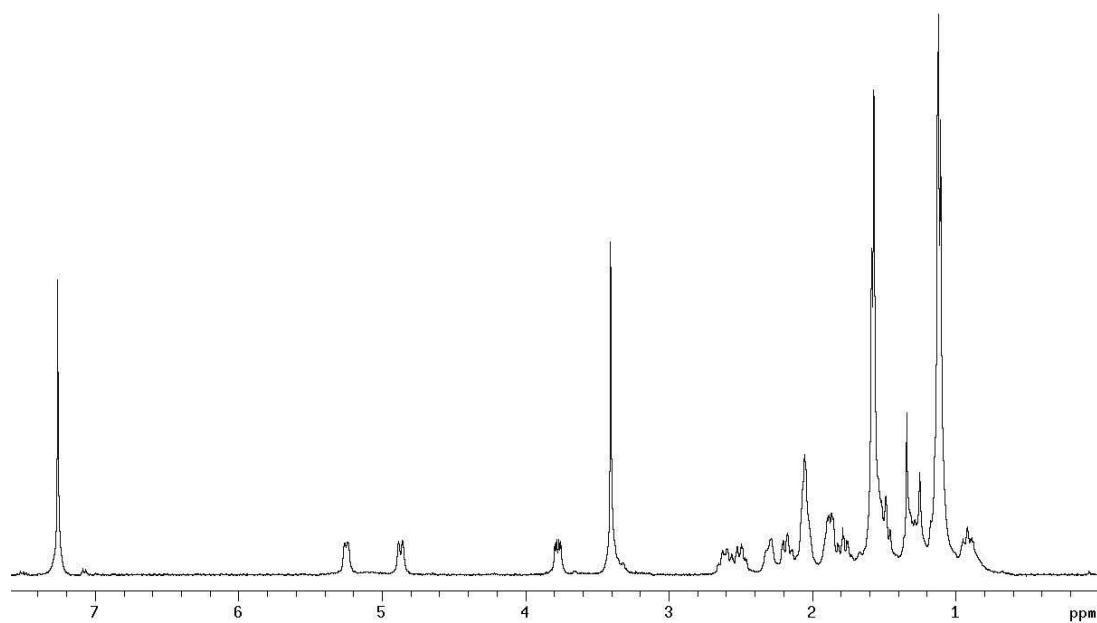
^1H NMR decariolo epossidato 1c (500 MHz, CDCl_3).



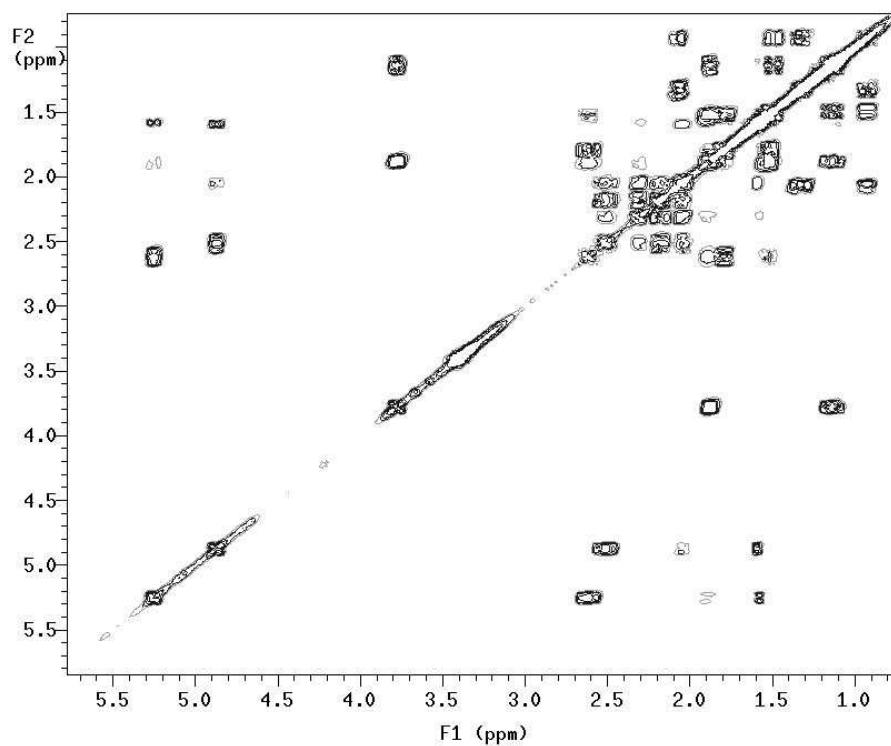
^1H NMR decariolo acetilato (1d, 500 MHz, CDCl_3).



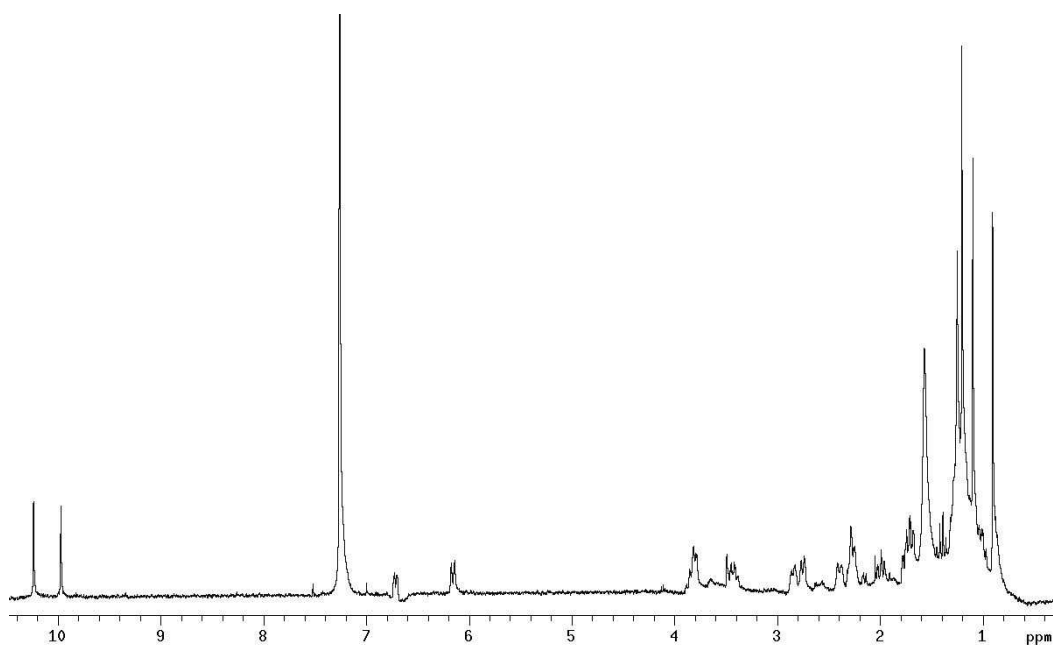
2D COSY NMR decariolo acetilato (1d, 500 MHz, CDCl_3).



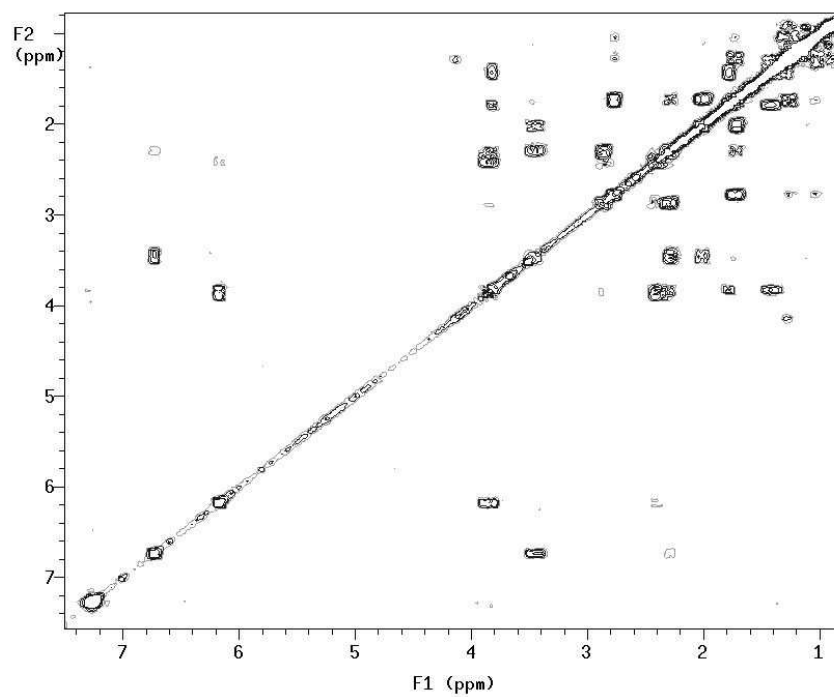
^1H NMR decariolo metilato (1e, 500 MHz, CDCl_3).



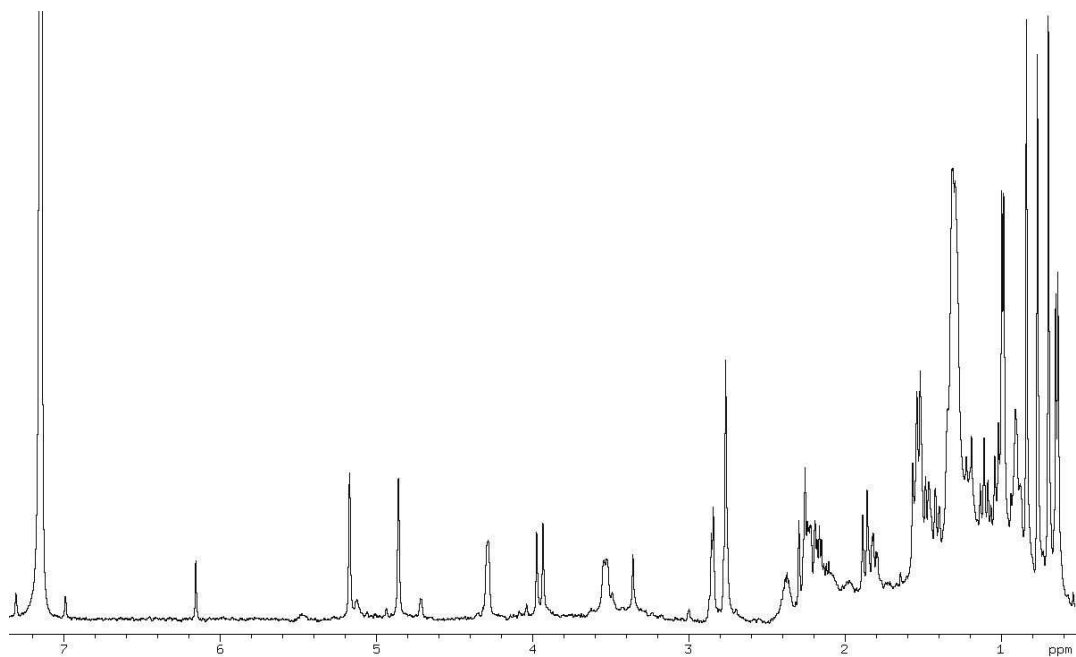
2D COSY NMR decariolo metilato (1e, 500 MHz, CDCl_3).



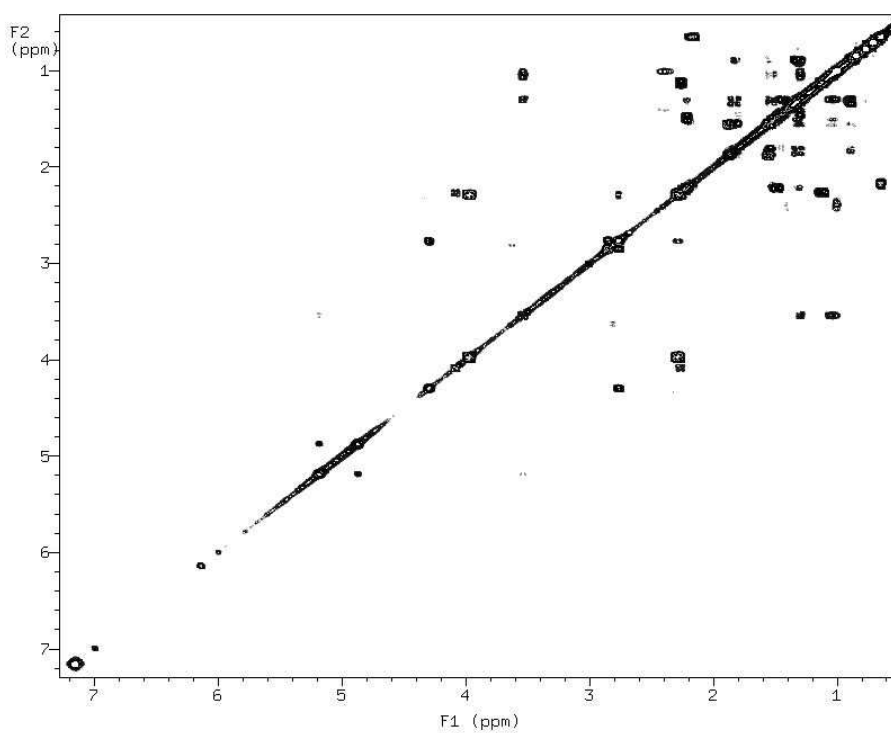
^1H NMR decariolo ossidato (1f, 500 MHz, CDCl_3).



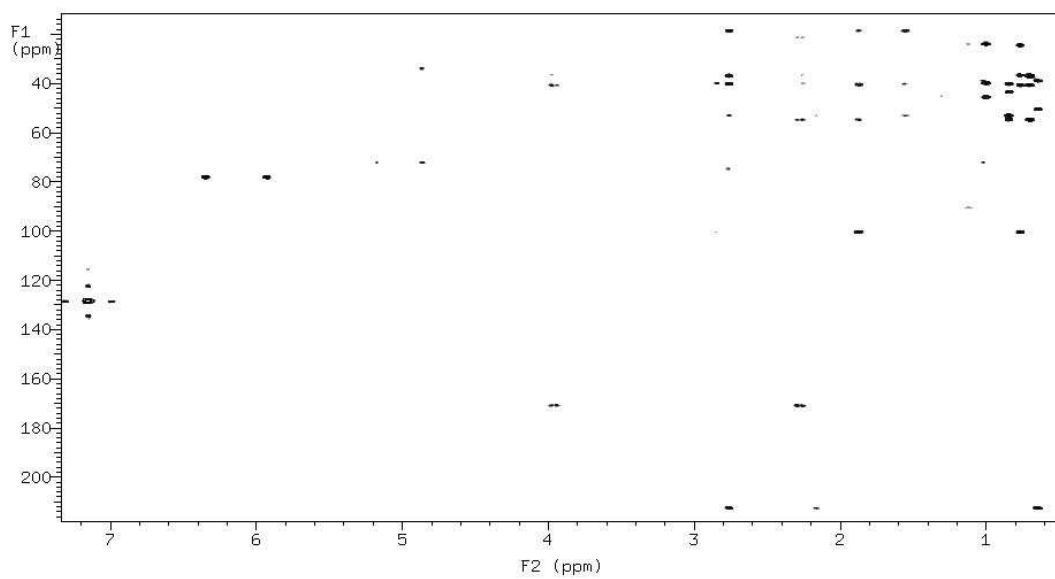
2D COSY NMR decariolo ossidato (1f, 500 MHz, CDCl_3).



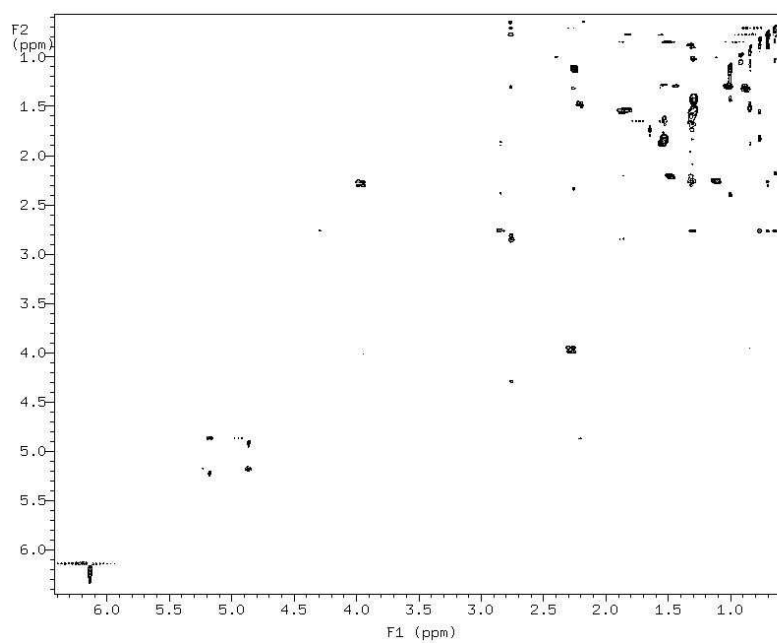
¹H NMR zoanthamina (700 MHz, CDCl₃).



2D COSY NMR zoanthamina (700 MHz, CDCl₃).



2D HMBC NMR zoanthamina (700 MHz, CDCl₃).



2D ROESY NMR zoanthamina (700 MHz, CDCl₃).

VII. G. BIBLIOGRAFIA

1. Krebs, H. C.; *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **1986**, *49*, 208-252.
2. Tursch, B.; Braekman, J. C.; Dalozze, D.; Kaisin, M.; *Marine Natural Products*, ed. P. J. Scheuer, Academic Press, New York, **1978**, vol.2, p. 247.
3. Coll, J. C.; Price, I. R.; Konig G. M. e Bowden, B. F.; *Mar. Biol.*, **1987**, *96*, 129-135.
4. Coll, J. C.; Bowden, B. F.; Alino, P. M.; Heaton, A.; Konig, G.M.; de Nys, R.; Willis, R. H.; Sammarco, P. W. e Clayton, N.M.; *Chem Scripta*, **1989**, *29*, 383-388.
5. Schmitz, F. J.; Bowden, B. F.; Toth, S. I.; *Marine Biotechnology*, eds. D. H. Attaway, O. R. Zaborsky, Plenum Press, New York, **1993**, vol.1, pp. 197-308.
6. Norton, R. S. e Kazlauskas E.; *Experientia*, **1980**, *36*, 276-278.
7. Kobayashi, J.; Ohizumi, Y.; Nakamura, H.; Yamakado, T.; Matsuzaki, T. e Hirata, Y.; *Experientia*, **1983**, *39*, 67-69.
8. Carmely, S.; Groweiss, A.; Kashman, Y.; *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 4279-4284.
9. Gross, H.; Kehraus, S.; Nett, M.; Konig, G. M.; Beil, W.; Wright, A. D.; *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 944-949.
10. Rodriguez, A. D.; Acosta, A. L.; *J. Nat. Prod.*, **1997**, *60*, 1134-1138.
11. Srinivasa Reddy, N.; Goud, T. V.; Venkateswarlu, Y.; *J. Nat. Prod.*, **2002**, *65*, 1059-1060.
12. Kobayashi, M.; *Chem. Pharm. Bull.*, **1988**, *36*, 488-494.
13. Rosser, R. M.; Faulkner, D. J.; Rao, C. B.; Anjaneyulu, S. R.; Sarma, S.; Venkateswarlu, Y.; *J. Org. Chem.*, **1985**, *50*, 3757-3760.
14. Williams, D. R.; Cortez, G. S.; *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 2675-2678.
15. Rao, C. B.; Rao, D. V.; Raju, V. S. N.; *Heterocycles*, **1989**, *28*, 103.
16. Fukuzawa, S.; Hayashi, Y.; Uemura, D.; Nagatsu, A.; Yamada, K.; Ijuin, Y.; *Heterocycl. Commun.*, **1995**, *1*, 207.

17. Kuramoto, M.; Hayashi, Y.; Fujitani, Y.; Yamaguchi, K.; Tsuji, T.; Yamada, K.; Ijuin, Y.; Uemura, D.; *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 5863.
18. (a) Kuramoto, M.; Hayashi, K.; Fujitani, Y.; Yada, M.; Tsuji, T.; Uemura, D.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1998**, 71, 771; (b) Kuramoto, M.; Yamaguchi, K.; Tsuji, T.; Uemura, D.; in *Drugs from the Sea*; Fusetani, N. Ed.; Karger: Basel, 2000; p 98. (c) Yamaguchi, K.; Yada, M.; Tsuji, T.; Kuramoto, M.; Uemura, D.; *Biol. Pharm. Bull.* **1999**, 22, 920.
19. Yamada, K.; Kuramoto, M.; Uemura, D.; in *Pure and Applied Chemistry*, **1999**, 3, 245-254.
20. Hansen, M.B.; Nielsen, S.E.; Berg K.; *J. Immunol. Methods*, **1989**, 119, 203-210.
21. Irace, C.; Scorziello, A.; Maffettone, C.; Pignataro, G.; Matrone, C.; Adornetto, A.; Santamaria, R.; Annunziato, L.; Colonna, A. *J. Neurochem.* **2005**, 95, 1321-1331.

VIII. ANALISI DEL SOFT CORAL *XENIA SP.*

I soft corals appartenenti al genere *Xenia* (ordine Alcyonacea, famiglia Xenidiidae), sono importanti risorse di metaboliti diterpenoidici chiamati xenicani.¹ Tra queste molecole, un gruppo in particolare, strutturalmente caratterizzato da un anello piranico fuso con un anello carbociclico a nove termini a formare un sistema 2-ossabicyclo [7.4.0] tridecano, rappresenta un'interessante classe di metaboliti bioattivi come antitumorali^{2,3} e antibatterici.⁴

Tali metaboliti sono stati classificati in base alla struttura dell'anello a sei termini (anello A); in questo modo, partendo dal 1977, con l'isolamento di un primo membro di questa classe,⁵ sono state identificate quattro famiglie (**Figura 1**): xenicine,⁵ xenialattoli,⁶ xeniolidi A⁷ e xeniolidi B.⁷

E' stato ipotizzato che queste molecole derivino biogeneticamente dal GGPP (geranilgeranilpirofosfato) attraverso un comune precursore, ossia il derivato dialdeidico riportato in **Figura 1**, tramite una ciclizzazione carbocationica transannulare.⁸

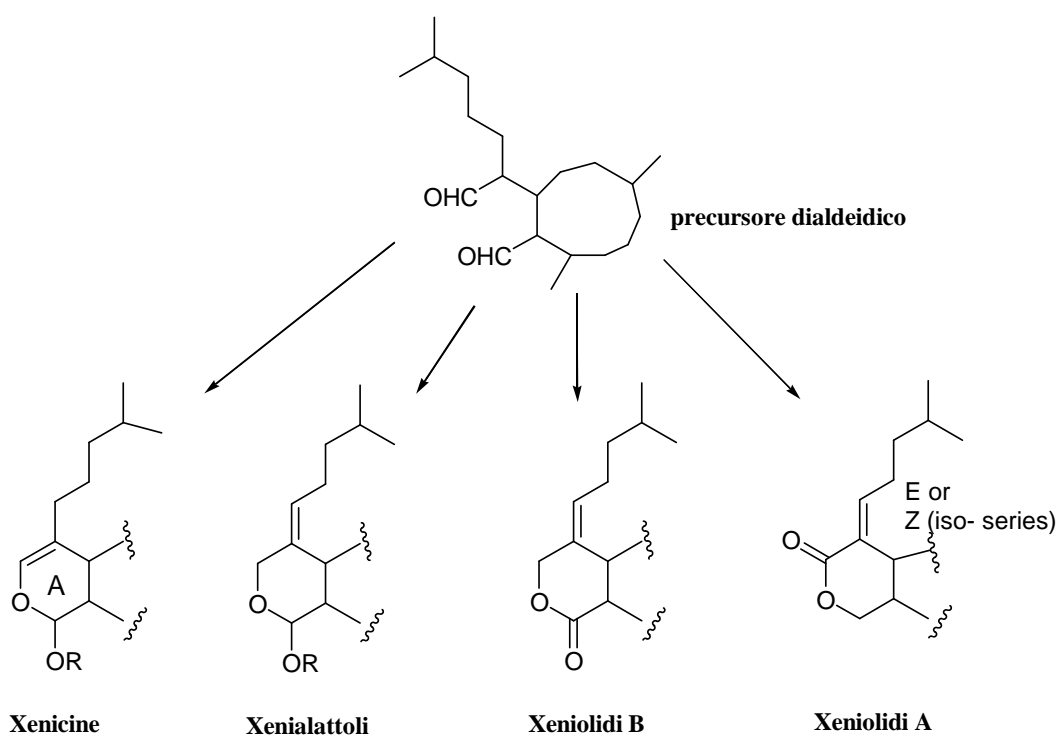


Figura 1

Sono state anche isolate alcune molecole che possiedono l'anello A aperto ed uno scheletro monocarbociclico a nove termini acilato con una serie di acidi grassi saturi da 16 a 20 atomi di carbonio (per es. azamilidi⁹) o con un anello A contratto (per es. xeniaeteri¹⁰ e xeniafillani⁶).

In particolare, dal soft coral *Xenia sp.* raccolto in Indonesia (Sulawesi), sono stati in passato isolati alcuni xeniolidi (xeniolide F e 9-idrossixeniolide F) e isoxeniolidi (isoxeniolide A e 7,8-oxido-isoxeniolide A)¹¹ (**Figura 2**).

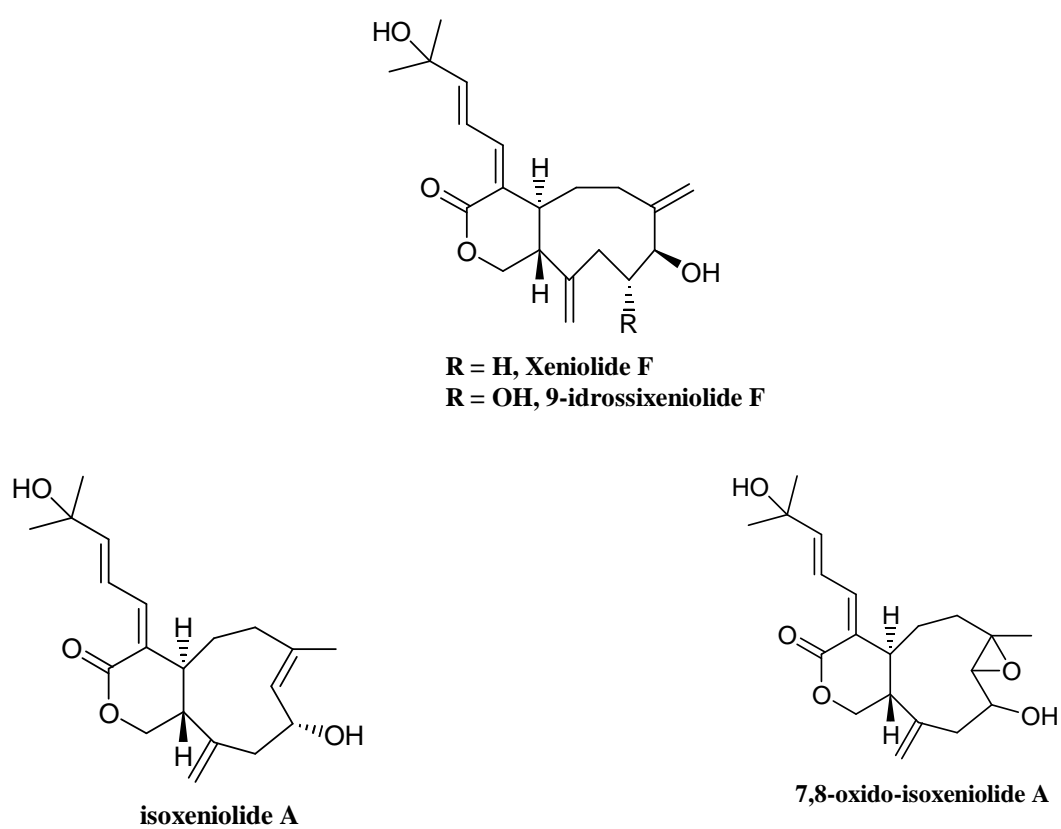


Figura 2

Successivamente fu analizzato l'estratto diclorometanico di altri soft corals appartenenti alla stessa specie (*Xenia blumi* e *Xenia umbellata*) in quanto mostravano una interessante attività citotossica su colture cellulari di A 549 (adenocarcinoma polmonare umano), HT-29 (adenocarcinoma umano al colon) e P-388 (leucemia linfocitica murina).^{12,13}

Dalla purificazione dell'estratto di *X. blumi* furono isolati alcuni diterpeni quali: blumiolide A e B e C, 9-deossi-isoxeniolide A, 9-deossi-7,8-epossi-isoxeniolide A, 9-deacetossi-7,8-epossi-13-epi-xenicina, 9-deossi-7,8-epossi-xeniolide A e blumicina A¹⁴(alcuni di questi riportati in **Figura 3**), mentre da *X. umbellata* furono trovati diterpenoidi con struttura diversa, ma con lo stesso nucleo lattonico e stessa catena dienica laterale¹⁵ (xenibellolo A riportato in **figura 3**).

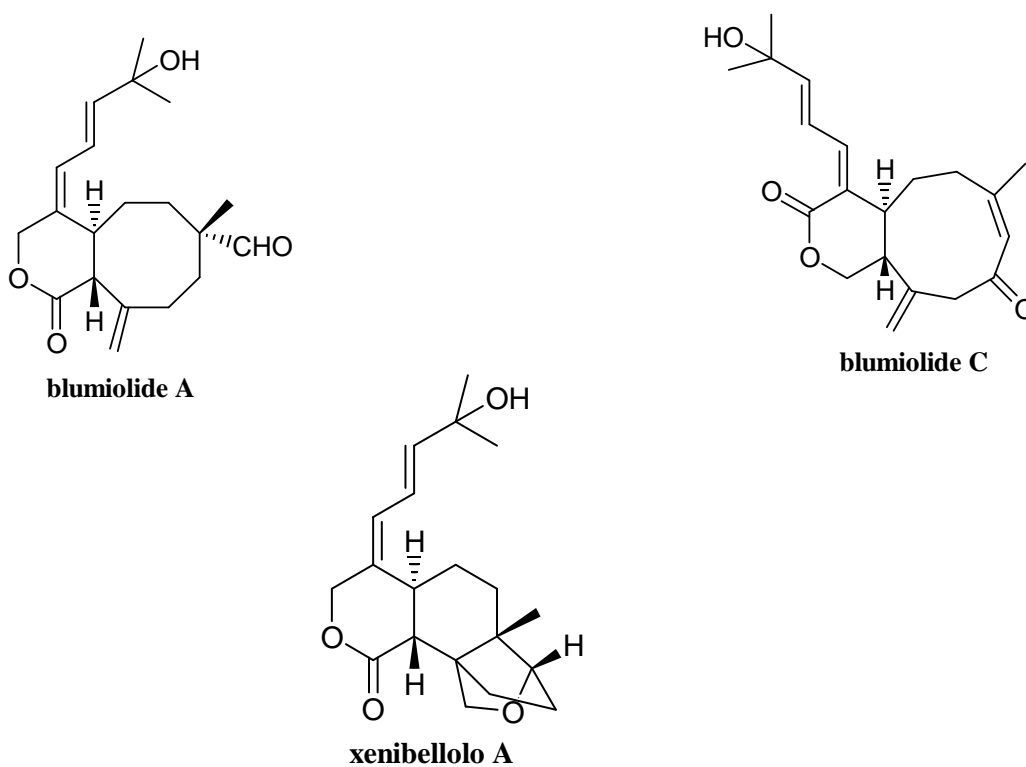


Figura 3.

Tutti i composti isolati furono saggiati per l'attività citotossica ed in particolare il blumiolide C mostrò una potente attività antiproliferativa nei confronti di cellule P-388 e HT-29. Il blumiolide A aveva solo una moderata attività. Altri analoghi (xenicani) isolati da *Xenia florida*, chiamati florxenilide A e B hanno pure mostrato attività citotossica contro le cellule WiDr (cancro umano al colon) a 4.5 e 3.7 μM , rispettivamente.¹⁶

Abbiamo deciso di esaminare l'estratto organico del soft coral *Xenia sp.*, raccolto lungo le coste di Manado in Indonesia. Si tratta di una specie particolarmente diffusa in tutta l'area degli oceani Indiano e Pacifico; completamente privo di uno scheletro calcareo, questo soft coral forma colonie in cui si può distinguere una zona a forma di tronco d'albero, detta "conenchima" da cui si diramano i piccoli polipi, lunghi e sottili, terminanti ognuno con un piccolo stoma circondato da otto tentacoli piumati. Il conenchima principale è solitamente di colore giallo chiaro, con riflessi rosa o verdi, mentre i singoli individui sono di colore variabile dal rosso al rosa al verde, a volte iridescenti, a causa delle alghe simbiotiche, le Zooxantelle, che vivono nel loro interno. Molte specie di *Xenia* eseguono con i loro polipi movimenti ritmici di pulsazione: questi non servono alla cattura di microorganismi ma creano proprio gli scambi tra l'acqua e le molte zooxantelle che sono la principale fonte di vita dell'animale stesso.



Xenia sp.

Dall'analisi chimica di *Xenia sp.* abbiamo ottenuto sette xenicani diterpenoidici; quattro di questi metaboliti sono nuovi composti che mostrano un inusuale sistema 2,6-dialcossipirano e, pertanto, è possibile introdurre una nuova classe di xenicani chiamati "xenimanadine" (A-D, **1-4**, **Figura 4**).

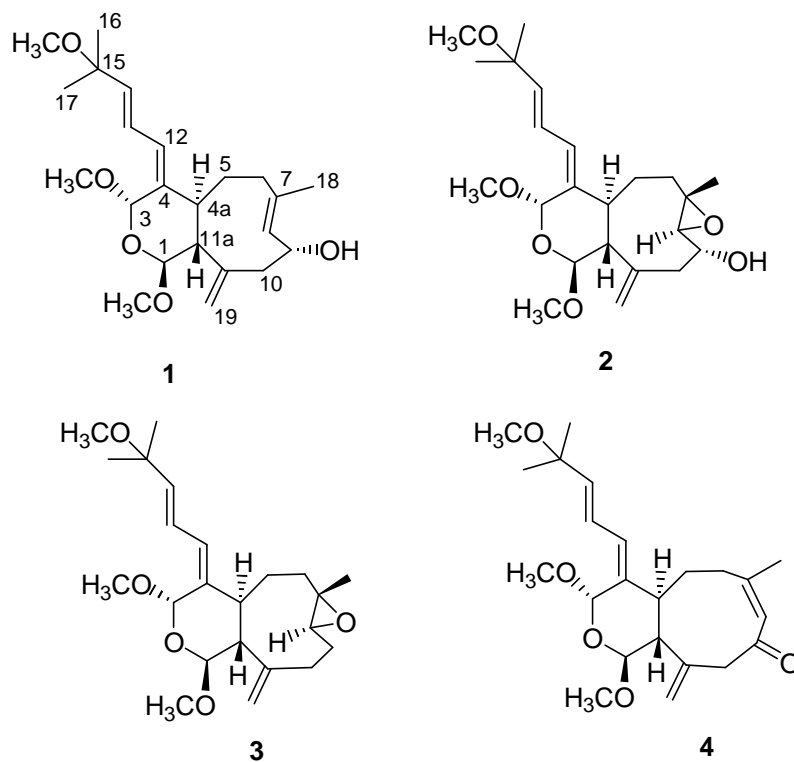


Figura 4

Gli altri tre metaboliti isolati sono composti noti appartenenti alla classe di xeniolidi (**5-7**, **Figura 5**).

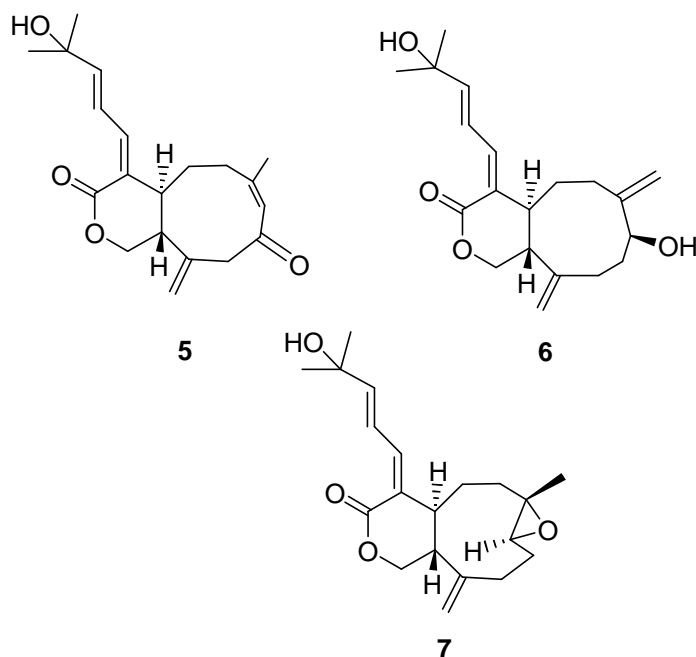


Figura 5

VIII. A. ESTRAZIONE ED ISOLAMENTO

Un campione di *Xenia sp.* è stato raccolto nel parco marino Bunaken di Manado (Nord Sulawesi, Indonesia) ed estratto ripetutamente con metanolo. L'estratto metanologico è stato ripartito tra acqua ed acetato di etile fino ad ottenere un solido organico di colore bruno che è stato successivamente cromatografato mediante MPLC su colonna impaccata con gel di silice, utilizzando miscele di *n*-esano/EtOAc a polarità crescente. Le frazioni ottenute sono state ulteriormente purificate mediante HPLC per fornire sette xenicani diterpenoidici puri: le nuove xenimanadine A-D (**1-4**, **Figura 4**) ed i noti blumiolide C (**5**),¹⁷ xeniolide F (**6**)¹⁸ e deossioxidoisoxeniolide A (**7**)¹⁷.

I composti **5-7** sono stati identificati mediante confronto dei dati spettroscopici ottenuti per queste molecole con quelli riportati in letteratura.^{17,18}

VIII. B. DETERMINAZIONE STRUTTURALE

Lo spettro ESI-MS (ioni positivi) di xenimanadina A (**1**) ha mostrato un picco dello ione pseudomolecolare a m/z 415 $[M + Na]^+$, mentre la formula molecolare $C_{23}H_{36}O_5$, implicante sei insaturazioni, è stata assegnata ad **1** attraverso lo spettro di massa HR-EIMS. Lo spettro ^{13}C NMR di **1** ($CDCl_3$, **Tabella 2**) mostrava 22 segnali (le risonanze di due carboni sono coincidenti), otto dei quali sono stati collocati nella regione sp^2 dello spettro. Lo spettro 1H NMR di **1** ($CDCl_3$, **Tabella 1**), ha mostrato una serie di segnali ben risolti tra δ_H 4.40 e 6.70, tre singoletti metilici a δ_H 3.10 e 3.60, una serie di multipletti tra δ_H 1.50 e 2.60 ed infine tre singoletti metilici a δ_H 1.70 (3H), 1.30 (6H). Tutti questi segnali protonici sono stati assegnati ai corrispondenti carboni direttamente legati attraverso un esperimento HSQC. Le informazioni ottenute indicavano la presenza di 3 gruppi metossilici, 2 diossimetini (δ_H 4.47, δ_C 104.5; δ_H 5.46, δ_C 100.0) e quattro doppi legami (quattro degli otto carboni sp^2 sono monoprotonati, uno è diprotonato e tre non sono protonati). Di conseguenza, tenendo in considerazione i gradi di insaturazione implicati dalla formula molecolare, la xenimanadina A (**1**) deve essere un composto biciclico.

Lo spettro COSY di **1** ha mostrato la presenza di due sistemi di spin, (A)-(C), indicate in grassetto in **Figura 6**: la porzione (A) include una sequenza di tre doppi legami metinici; il sistema di spin (B) inizia con il diossimetino a δ_H 4.47 e termina con un metilene relativamente deschermato risonante a δ_H 2.15 e 2.13; la porzione (C) include il quarto doppio legame metinico, accoppiato con un protone carbinolico (δ_H 4.47; δ_C 68.0), e con un metilene allilico (δ_H 2.35 and 2.53).

Una serie di correlazioni $^{2,3}J_{H,C}$ evidenziate attraverso uno spettro g-HMBC (Fig. 6) ci ha permesso di connettere le subunità strutturali già individuate e, includendo anche le restanti parti non accoppiate, di disegnare la struttura planare della xenimanadina A (**1**). In particolare, i tre picchi di correlazione di H₃-18 (δ_H 1.70) ci hanno permesso di congiungere le porzioni (B) e (C); analogamente, i picchi di correlazione esibiti dai protoni del doppio legame esociclico a δ_H 4.91 e 4.94 (H₂-19) indicavano la presenza dell'anello ciclononanico. Le importanti informazioni ricavate dai picchi di correlazione g-HMBC dei due protoni ossimetinici: le correlazioni $^{2,3}J$ di H-3 con C-1, C-4, C-4a, e

C-12 indicavano la struttura dell'anello A, la sua giunzione con l'anello a nove termini e la posizione di legame della porzione (A). Il legame di questa porzione al carbonio dimetilato C-15, è stato dedotto dai picchi di correlazione mostrati dai protoni metilici H₃-16/H₃-17. Infine, i carboni leganti i tre gruppi metossilici sono stati identificati sulla base delle correlazioni ³J dei corrispondenti protoni metilici.

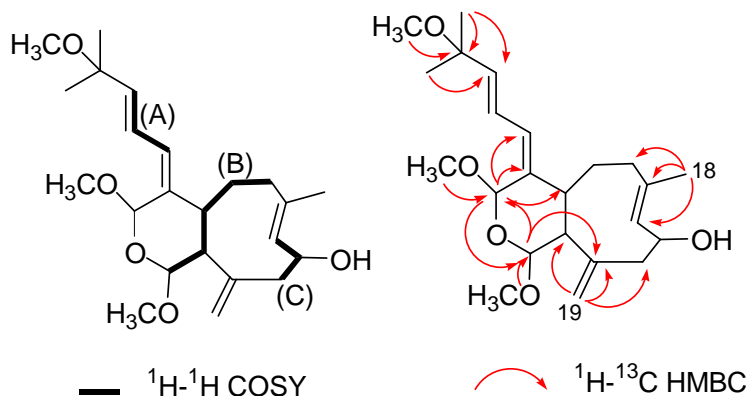


Figura 6

Una volta chiarita la struttura planare della xenimanadina A (**1**), bisognava definire la configurazione dei cinque carboni chirali e dei tre doppi legami. Per questo scopo è stata fondamentale l'analisi dei valori delle costanti di accoppiamento e le informazioni ricavate da un esperimento ROESY (**Figura 7**). La geometria *Z* del doppio legame $\Delta^{4,12}$ è stata dedotta sulla base dei picchi di correlazione ROESY H-3/H-13 e H-12/H-4a; analogamente, la geometria *E* del doppio legame $\Delta^{7,8}$ è stata indicata dalla correlazione ROESY H-8/H₂-6. Come per il doppio legame $\Delta^{13,14}$, la sua geometria *E* è stata facilmente dedotta considerando il largo valore della costante di accoppiamento $J_{\text{H-13/H-14}}$ (15.8 Hz). La configurazione relativa dei quattro carboni chirali intorno all'anello a sei termini è stata dedotta sulla base degli accoppiamenti scalari e dipolari. La giunzione *trans* tra i due anelli è stata suggerita dalla correlazione ROESY H-11a/H-5 β e dalla costante di accoppiamento $J_{\text{H-11a/H-4a}} = 10.6$ Hz, che presuppone un'orientazione pseudo-diassiale. Le correlazioni ROESY H-1/H-4a e 1-OMe/H-11a confermano la giunzione *trans* tra i nuclei e suggerivano anche un'orientazione *trans* di H-1 e H-11a; inoltre la costante di accoppiamento $J_{\text{H-1/H-11a}} = 8.8$ Hz è in accordo con un'orientazione pseudo-diassiale. L'orientazione relativa di H-3 è stata stabilita in base alla correlazione ROESY di 3-OMe con H-4a, indicativa di una relazione *trans* tra H-3 e H-4a. La configurazione relativa del restante carbonio chirale della molecola (C-9) è stata

suggerita dal picco di correlazione tra H-11a e H-9, indicativa di un'orientazione *cis* di questi due protoni sull'anello a nove termini.

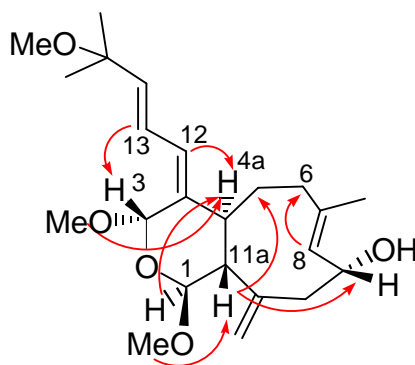


Figura 7

La presenza di un gruppo alcolico secondario nella struttura della xenimanadina A (**1**), ci ha offerto la possibilità di passare dalla determinazione della stereochimica relativa a quella assoluta, attraverso l'applicazione del metodo di Mosher modificato.¹⁹A questo scopo, due aliquote di **1** sono state trattate con cloruro (*R*)-e (*S*)-MTPA in piridina anidra per dare i corrispondenti esteri (*S*)- (**1a**) and (*R*)- (**1b**) MTPA, rispettivamente. La differenza $\Delta\delta$ (*S*-*R*) dei valori trovati (vedere **Figura 8**) ci ha permesso di stabilire la configurazione *R* al C-9 e, conseguentemente, di dedurre la stereostruttura completa della xenimanadina A (**1**) come riportata in **Figura 4**.

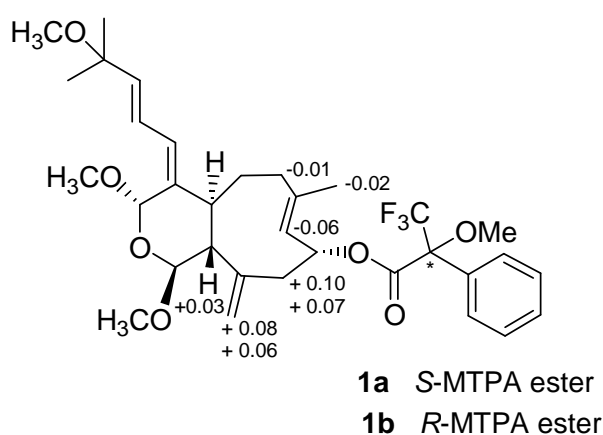


Figura 8

La determinazione stereostutturale delle xenimanadine B-D (**2-4**) è stata eseguita con lo stesso metodo descritto per la xenimanadina A (**1**). Una ispezione accurata degli spettri COSY, HSQC e g-HMBC è stata utile per dedurre le loro strutture planari e le assegnazioni strutturali sono riportate nelle Tabelle 1 e 2, mentre, come riportato sopra, la loro stereochimica è stata dedotta sulla base delle delle costanti di accoppiamento scalari e gli accoppiamenti dipolari. Per queste molecole, la configurazione assoluta non è stata determinata, ma comunque, le loro strutture sono riportate in Figura 4, estendendo la configurazione assoluta sopra dedotta per la xenimanadina A (**1**).

Ci sono solo alcune significanti differenze tra queste molecole e la xenimanadina A. Queste differenze sono ristrette alla funzionalizzazione dell'anello a nove termini e, di conseguenza, le risonanze H/C del ciclo a sei termini e della catena laterale con i due doppi legami coniugati risultavano essere coincidenti. (vedere Tabelle 1 e 2).

La Xenimanadina B (**2**) è strettamente legata alla xenimanadina A, infatti la sua formula molecolare mostra un solo atomo di ossigeno in più ($C_{23}H_{36}O_6$). Un'analisi preliminare degli spettri 1H e ^{13}C NMR di **2** (Tabelle 1 e 2) rivelava l'assenza del doppio legame $\Delta^{7,8}$, mentre il grado di insaturazione aggiuntivo era dovuto ad un gruppo epossidico (δ_{C-7} 60.5; δ_{H-8} 2.88, δ_{C-8} 67.0). Lo spettro COSY di **2** mostrava l'accoppiamento del doppietto epossidico (δ_H 2.88) con un protone carbinolico a δ_H 3.78, che, a sua volta, era accoppiato con i protoni H₂-10 (δ_H 2.66 e 2.46). Le correlazioni g-HMBC (H₃-18 con C-6, C-7 e C-8; H₂-19 con C-10, C-11, eC-11a) ci hanno consentito di legare questa porzione alla parte (B), così da portarci alla struttura planare di questa xenimanadina. I picchi di correlazione ROESY H-8/H-6 α rivelavano la geometria dell'anello epossidico, mentre l'accoppiamento spaziale H-8/H-4a connetteva questa geometria con quella dei centri chirali appartenenti al ciclo a sei termini. Infine, l'accoppiamento spaziale H-11a/H-9 indicava l'orientazione *cis* di questi due protoni.

La Xenimanadina C (**3**) mostrava la stessa formula molecolare della xenimanadina A ($C_{23}H_{36}O_5$). Gli spettri COSY e HSQC di **3** rivelavano che, anche in questo caso, la subunità C-7/C-10, includeva un gruppo epossidico seguito da due metileni in sequenza (1.50 e 1.45, 2.43 e 2.26). Gli accoppiamenti g-HMBC H₂-19/C-10, H₃-18/C-6, H₃-18/C-7, e H₃-18/C-8 ci hanno consentito di legare questa subunità alla restante parte della molecola, costruendo così la struttura planare della xenimanadina C (**3**). Lo spettro

ROESY rivelava che il composto **3** possedeva la stessa geometria dell'epossido presente nel composto **2** (picchi di correlazione H₃-18/H₂-9 e H-8/H-4a).

La formula molecolare della xenimanadina D (**4**), C₂₃H₃₄O₅ attraverso un esperimento HR-EIMS, include due atomi di idrogeno in meno rispetto al quella della xenimanadina A (**1**). L'analisi dello spettro ¹³C NMR di **4** (CDCl₃, Tabella 2) suggeriva che un gruppo chetonico coniugato (segnale a δ_C 203.3) potrebbe contare per il grado di insaturazione addizionale presente. L'analisi combinata degli esperimenti COSY, HSQC e g-HMBC suggeriva che tutte le differenze tra i composti **3** e **1** consistevano nella sostituzione del gruppo alcolico secondario con un gruppo chetonico, localizzandolo al C-9. Quindi, il metino sp² H-8 e H₂-10 risuonavano, entrambi a campi bassi, come singoletti a δ_H 5.93 (1H) a δ_H 3.32 (2H), rispettivamente. Le correlazioni g-HMBC H-8/C-9, H-8/C-10, e H₂-19/C-10 hanno dimostrato di essere particolarmente utili per definire la struttura di questa porzione, mentre le correlazioni ROESY di H₃-18 con H-8 indicavano la geometria Z del doppio legame.

Le Xenimanadine A-D costituiscono un importante gruppo di diterpenoidi e possono essere considerati come una quinta famiglia di derivati pirano-ciclononano nella classe degli xenicani (vedere fig. 1). La loro funzionalità 2,6-dimetossitetraidropiranica sembra ricordare la struttura del precursore dialdeidico ipotizzato, che, è importante notare, non è mai stato isolato. La presenza di questa funzionalità potrebbe far pensare che i composti **1-4** siano degli artefatti prodotti durante il processo di estrazione con metanolo. Sfortunatamente, a causa di insufficienza di materiale, non abbiamo potuto fare luce su questo problema ripetendo l'estrazione con un solvente diverso; comunque, l'assenza nel nostro estratto di stereoisomeri al C-1 e/o al C-3 rende improbabile la formazione dei composti **1-4** durante la fase di estrazione. Inoltre, diversi dati presenti in letteratura dimostrano l'origine naturale delle xenimanadine A-D: i) Un derivato xenicano dialdeidico (**8**, **Figura 9**), che possiede un anello riarrangiato a nove termini, è stato recentemente isolato da *Xenia umbellata*.²⁰ Molto interessante è che, questa molecola mostrava non essere reattiva nei confronti del metanolo, solvente utilizzato durante la procedura di purificazione; ii) un singolo membro della famiglia delle xenimanadine, chiamato composto **9** (Fig. 9),²¹ è stato trovato prima del nostro studio ed è assente nel nostro campione. E' da notare che, questo composto è stato ottenuto utilizzando una procedura completamente priva di metanolo (estrazione in CH₂Cl₂;

cromatografia in miscele esano/EtOAc),²¹ tale da dimostrare che i soft corals del genere *Xenia* sono capaci di sintetizzare questi derivati metossilati; iii) questa abilità è stata confermata dal recente isolamento del composto **10** (Fig. 9) da *Xenia elongata*,² anche in questo caso ottenuto attraverso una procedura in assenza di metanolo.

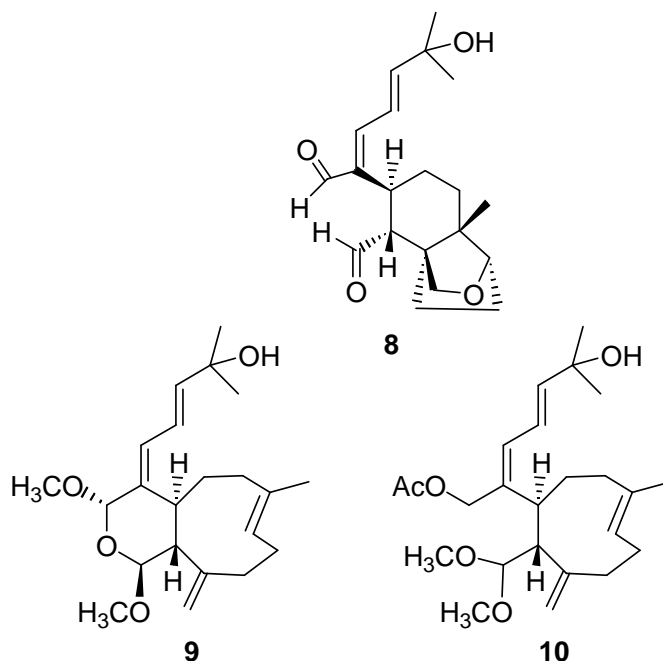


Figura 9

I composti **5** e **7** sono citotossici contro la linea cellulare tumorale P-388 (leucemia linfoctica di topo) con IC_{50} di 0.2 e 4.7 $\mu\text{g/mL}$, rispettivamente.¹⁷ Al contrario, le xenimanadine A-D (**1-4**) hanno dimostrato di non essere citotossiche ($IC_{50} > 20 \mu\text{g/mL}$) contro diverse linee cellulari. Il confronto di strutture e di attività di xenimanadina D (**4**) e blumiolide C (**5**) indica chiaramente che l'anello A deve esercitare un ruolo importante nel determinare le potenzialità citotossiche di questi composti.

VIII. C. PARTE SPERIMENTALE

Strumentazione. Le rotazioni ottiche sono state misurate in CHCl_3 su un polarimetro Perkin-Elmer 192 equipaggiato con una lampada al sodio ($\lambda = 589 \text{ nm}$) ed una microcella di 10-cm. Gli spettri IR (KBr) sono stati misurati su uno spettrofotometro

modello Bruker IFS-48. Gli spettri UV sono stati ottenuti in CH₃CN usando uno spettrofotometro Beckman DU70. Gli spettri di massa FAB-MS sono stati ottenuti su un spettrometro di massa FISION Prospec usando una matrice di glicerolo. Gli spettri ¹H (500 e 700 MHz) e ¹³C (500 MHz) sono stati misurati su uno spettrometro Bruker AMX-500; i chemical shift sono riferiti ai segnali dei solventi (CDCl₃; δ_H = 7.26, δ_C = 77.0). Le molteplicità dei segnali ¹³C sono stati determinati con esperimenti DEPT. Le correlazioni omonucleari ¹H-¹H sono state determinate mediante esperimenti COSY. Le correlazioni eteronucleari ¹H-¹³C sono state determinate con esperimenti HSQC. Le correlazioni ¹H-¹³C attraverso due e tre legami sono state determinate con esperimenti HMBC ottimizzati per ^{2,3}J di 8.0 Hz. Le cromatografie liquide a media pressione (MPLC) sono state effettuate usando un sistema Büchi 861 con fase stazionaria SiO₂ (230-400 mesh). Le separazioni con cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) sono state ottenute in modo isocratico su un sistema Beckmann equipaggiato con rivelatore RI e colonne LUNA (SI60, 250 x 4 mm).

Estrazione ed isolamento: Un campione di *Xenia sp.* (40.0 g, peso secco) è stato raccolto nel marzo 2006 nel parco marino Bunaken di Manado (North Sulawesi, Indonesia) ad una profondità di 2-5 m. Una piccola parte di campione è conservata presso il Dipartimento per lo Studio del Territorio e delle sue Risorse, Università di Genova. *Xenia sp.* è stato estratto (3 × 3 L) con metanolo a temperature ambiente fino ad ottenere una gomma bruna che è stata ripartita tra acqua ed EtOAc fino ad ottenere una frazione organica (1.16 g). Questa è stata successivamente cromatografata mediante MPLC su gel di silice (230-400 mesh), colonna (750 × 25 mm), usando un sistema eluente a gradiente da *n*-esano/EtOAc 8:2 ad EtOAc. La prima frazione (*n*-esano-EtOAc, 8:2) è stata purificata mediante HPLC analitica, utilizzando *n*-esano-EtOAc (85:15) come eluente, ottenendo la xenimanadina C (**3**, 1.5 mg). Una seconda frazione (*n*-esano-EtOAc, 7:3) è stata purificata mediante HPLC analitica usando *n*-esano-EtOAc (7:3) come eluente, portando alle xenimanadine B (**2**, 3.8 mg) e D (**3**, 3.9 mg). La frazione ottenuta dall'eluizione con *n*-esano-EtOAc, 6:4 è stata purificata mediante HPLC usando *n*-esano-EtOAc (65:35) come eluente, ottenendo la xenimanadina A (**1**, 6.0 mg). La frazione eluita con *n*-esano-EtOAc, 1:1 è stata purificata mediante HPLC

usnado *n*-esano-EtOAc (1:1) come eluente, ottenendo deossioxidoisoxeniolide A (**7**, 1.0 mg). La frazione ottenuta da *n*-esano-EtOAc, 4:6 è stata purificata mediante HPLC usando *n*-esano-EtOAc (1:1) come eluente, portando al blumiolide C (**5**, 2.1 mg). Infine, la frazione eluita con EtOAc è stata purificata mediante HPLC usnado *n*-esano-EtOAc (1:9) come eluente, ottenendo lo xeniolide F (**6**, 1.9 mg).

Xenimanadina A (1). Solido amorfo incolore; $[\alpha]_D^{22} -4$ (*c* 0.11, CHCl₃); ¹H e ¹³C NMR (CDCl₃) vedere Tabelle 1 e 2, rispettivamente; ESI-MS (ioni positivi) *m/z* 415 [M + Na]⁺, 431 [M + K]⁺; HREIMS *m/z* 374.2468 [M - H₂O] (calc. per C₂₃H₃₄O₄ 374.2452).

Xenimanadina B (2). Solido amorfo incolore; $[\alpha]_D^{22} +8$ (*c* 0.15, CHCl₃); ¹H e ¹³C NMR (CDCl₃) vedere Tabelle 1 e 2, rispettivamente; ESI-MS (ioni positivi) *m/z* 431 [M + Na]⁺, 447 [M + K]⁺; HREIMS *m/z* 390.2418 [M - H₂O] (calc. per C₂₃H₃₄O₅ 390.2406).

Xenimanadina C (3). Solido amorfo incolore; $[\alpha]_D^{22} +24$ (*c* 0.12, CHCl₃); ¹H e ¹³C NMR (CDCl₃) vedere Tabelle 1 e 2, rispettivamente; ESI-MS (ioni positivi) *m/z* 415 [M + Na]⁺, 807 [2M + Na]⁺; HREIMS *m/z* 361.2390 [M - OCH₃] (calc. per C₂₂H₃₃O₄ 361.2379).

Xenimanadina D (3). Solido amorfo incolore; $[\alpha]_D^{22} +6$ (*c* 0.20, CHCl₃); ¹H e ¹³C NMR (CDCl₃) vedere Tabelle 1 e 2, rispettivamente; ESI-MS (ioni positivi) *m/z* 413 [M + Na]⁺, 429 [M + K]⁺; HREIMS *m/z* 390.2397 (calc. per C₂₃H₃₄O₅ 390.2406).

Preparazione degli esteri MTPA di Xenimanadina A

Alla soluzione di xenimanadina A (**1**) (1.0 mg) in 0.3 mL di piridina anidra è stato aggiunto un eccesso di cloruro (*R*)- o (*S*)-MTPA e la miscela è stata lasciata a temperatura ambiente per 12 h sotto agitazione. La miscela di reazione è stata diluita con etere, lavata con H₂O e con una soluzione satura acquosa di NaCl. La fase organica è stata disidratata con Na₂SO₄, concentrata sottovuoto e purificata mediante HPLC (eluente *n*-esano/EtOAc 9:1) per darel'estere (*S*)-MTPA **1a** (0.8 mg) e l'estere *R*-MTPA **1b** (0.7 mg), rispettivamente.

Estere (S)-MTPA di Xenimanadina A. Olio incolore. ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ_{H} 7.53 (3H, MTPA fenile, m); 7.42 (2H, MTPA fenile, m); 6.60 (1H, H-13, dd, $J = 15.8$, 11.3 Hz); 6.09 (1H, H-12, d, $J = 11.3$ Hz); 5.91 (1H, H-9, t, $J = 7.0$ Hz); 5.60 (1H, H-14, d, $J = 15.8$ Hz); 5.43 (1H, H-3, s); 5.17 (1H, H-8, d, $J = 7.0$ Hz); 4.89 (1H, H-19, s); 4.87 (1H, H-19, s); 4.43 (1H, H-1, d, $J = 8.8$ Hz); 3.61 (3H, MTPA-OMe, s); 3.59 (3H, 3-OMe, s); 3.42 (3H, 1-OMe, s); 3.17 (3H, 5-OMe, s); 2.52 (1H, H-10, dd, $J = 14.0$, 7.0 Hz); 2.32 (1H, H-4a, sovrapposto); 2.30 (1H, H-10, sovrapposto); 2.11 (2H, H-6, m); 1.89 (1H, H-5, m); 1.79 (3H, H-18, s); 1.71 (1H, H-11a, dd, $J = 10.6$, 8.8 Hz); 1.55 (1H, H-5, m); 1.30 (6H, H-16 e H-17, s). ESI-MS (ioni positivi) m/z 631 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

Estere (R)-MTPA di Xenimanadina A. Olio incolore. ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ_{H} 7.56 (3H, MTPA fenile, m); 7.42 (2H, MTPA fenile, m); 6.60 (1H, H-13, dd, $J = 15.8$, 11.3 Hz); 6.10 (1H, H-12, d, $J = 11.3$ Hz); 5.92 (1H, H-9, t, $J = 7.0$ Hz); 5.60 (1H, H-14, d, $J = 15.8$ Hz); 5.43 (1H, H-3, s); 5.23 (1H, H-8, d, $J = 7.0$ Hz); 4.81 (2H, H-19, s); 4.41 (1H, H-1, d, $J = 8.8$ Hz); 3.59 (3H, 3-OMe, s); 3.56 (3H, MTPA-OMe, s); 3.40 (3H, 1-OMe, s); 3.17 (3H, 5-OMe, s); 2.42 (1H, H-10, dd, $J = 14.0$, 7.0 Hz); 2.32 (1H, H-4a, dd, $J = 10.6$, 4.5 Hz); 2.23 (1H, H-10, d, $J = 14.0$ Hz); 2.12 (2H, H-6, m); 1.89 (1H, H-5, m); 1.81 (3H, H-18, s); 1.68 (1H, H-11a, dd, $J = 10.6$, 8.8 Hz); 1.55 (1H, H-5, m); 1.30 (6H, H-16 e H-17, s). ESI-MS (ioni positivi) m/z 631 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

VIII. D. DATI SPETTROSCOPICI

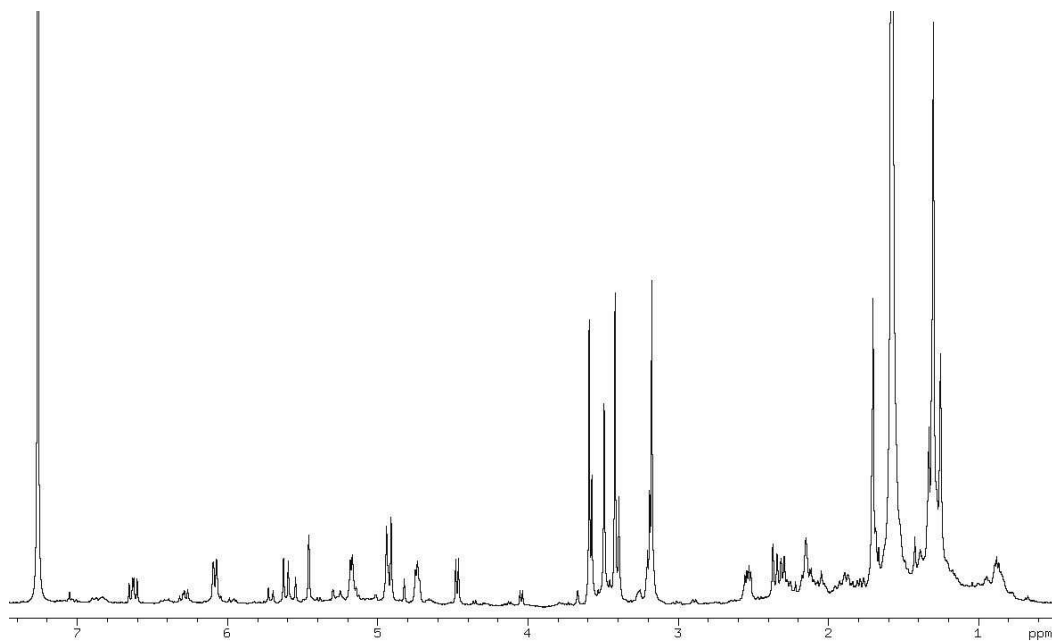
Tabella 1. Dati ^1H NMR di Xenimanadine A-D (1-4) in CDCl_3 a 500 MHz

Pos.	1	2	3	4
	δ_{H} , molt., J in Hz	δ_{H} , molt., J in Hz	δ_{H} , molt., J in Hz	δ_{H} , molt., J in Hz
1	4.47, d, 8.8	4.53, d, 8.8	4.48, d, 8.8	4.71, d, 8.5
1-OMe	3.42, s	3.45, s	3.43, s	3.45, s
3	5.46, bs	5.50, bs	5.48, bs	5.51, bs
3-OMe	3.59, s	3.60, s	3.59, s	3.54, s
4a	2.30, bdd, 10.6, 4.5	2.37, bdd, 10.6, 4.5	2.32, bdd, 10.6, 4.5	2.31, bdd, 10.6, 4.5
5	1.88, m	1.94, m	1.92, m	1.71, m
	1.53, m	1.67, m	1.61, m	1.71, m
6	2.15 ^a	2.16, m	2.20, m	2.87, m
	2.13 ^a	1.14, m	1.12, m	2.24, m
8	5.17, bd, 7.0	2.88, d, 7.2	2.89, dd, 11.4, 2.7	5.93, s
9	4.74, bt, 7.0	3.78, m	1.50 ^a	
			1.45 ^a	
10	2.53, dd, 14.4, 7.0	2.66, dd, 13.5, 7.0	2.43, bt, 10.8	3.32, s
	2.35, bd, 14.4	2.46, bd, 13.5	2.26, m	3.32, s
11a	1.69, dd, 10.6, 8.8	2.08, dd, 10.6, 8.8	2.13, dd, 10.6, 8.8	2.51, m
12	6.08, d, 11.3	6.07, d, 11.3	6.04, d, 11.3	5.92 ^a
13	6.63, dd, 15.8, 11.3	6.60, dd, 15.8, 11.3	6.58, dd, 15.8, 11.3	6.43, dd, 15.8, 11.3
14	5.61, d, 15.8	5.63, d, 15.8	5.60, d, 15.8	5.66, d, 15.8
15-OMe	3.17, s	3.17, s	3.15, s	3.14, s
16	1.30, s	1.30, s	1.26, s	1.26, s
17	1.30, s	1.30, s	1.30, s	1.30, s
18	1.70, s	1.42, s	1.37, s	1.81, s
19	4.94, bs	5.12, bs	4.98, bs	5.08, bs
	4.91, bs	5.01, bs	4.91, bs	5.02, bs

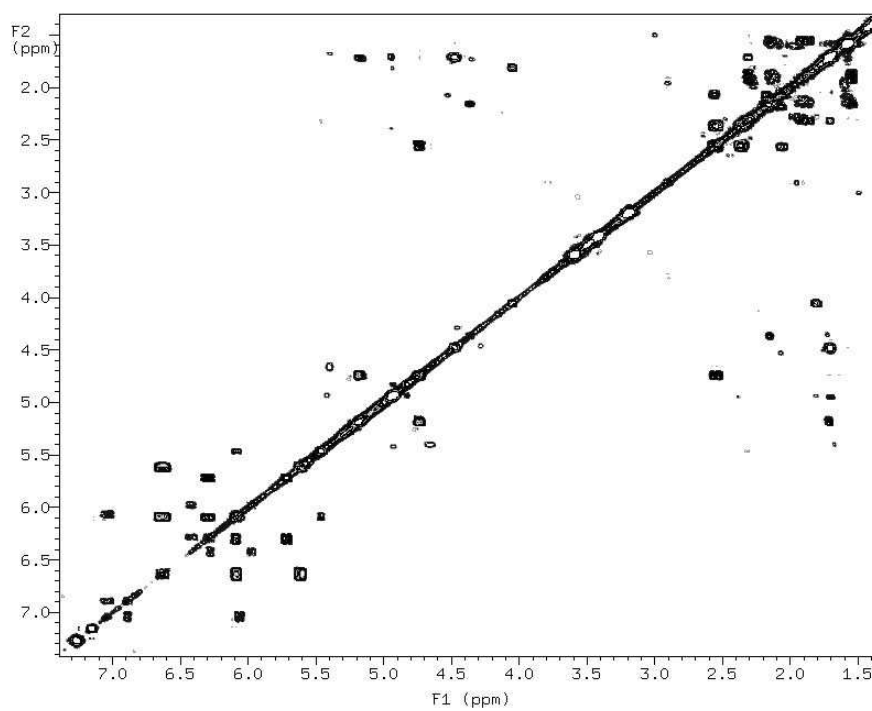
^a Sovrapposti con altri segnali

Tabella 2. Dati ^{13}C NMR di Xenimanadine A-D (**1-4**) (CDCl_3)

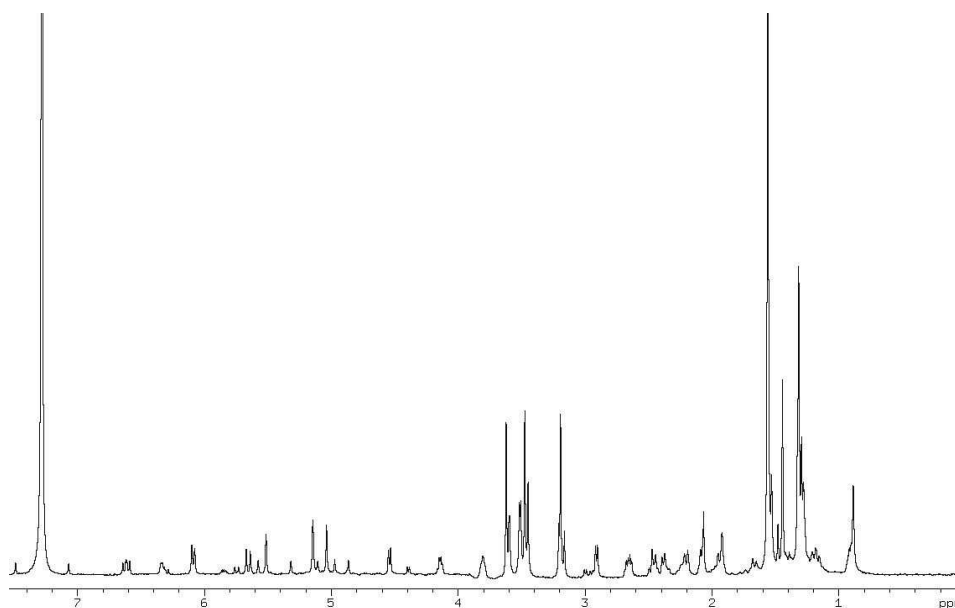
Pos.	1	2	3	4
	δ_{C} , molt.	δ_{C} , molt.	δ_{C} , molt.	δ_{C} , molt.
1	104.5, d	104.4, d	104.4, d	100.0, d
1-OMe	57.2, q	57.0, q	57.1, q	57.7, q
3	100.0, d	99.7, d	99.7, d	97.9, d
3-OMe	55.5, q	55.3, q	55.2, q	54.8, q
4	139.5, s	135.9, s	135.5, s	138.7, s
4a	51.3, d	51.6, d	51.7, d	50.6, d
5	36.0, t	36.1, t	35.4, t	32.6, t
6	40.5, t	40.6, t	40.6, t	30.3, t
7	133.5, s	60.5, s	59.9, s	146.6, s
8	131.5, d	67.0, d	62.4, d	130.0, d
9	68.0, d	69.0, d	27.8, t	203.3, s
10	47.2, t	44.9, t	33.9, t	51.6, t
11	150.5, s	150.0, s	139.0, s	143.4, s
11a	56.1, d	54.8, d	54.3, d	53.3, d
12	128.7, d	129.0, d	128.8, d	128.7, d
13	126.2, d	126.1, d	126.1, d	126.8, d
14	140.6, d	141.3, d	141.1, d	141.2, d
15	75.2, s	75.8, s	75.7, s	74.9, s
15-OMe	50.9, q	50.6, q	50.6, q	50.5, q
16	26.1, q	26.0, q	26.2, q	26.1, q
17	26.1, q	26.0, q	30.1, q	26.1, q
18	18.0, q	17.6, q	18.3, q	27.4, q
19	112.7, t	114.4, t	105.5, t	116.0, t



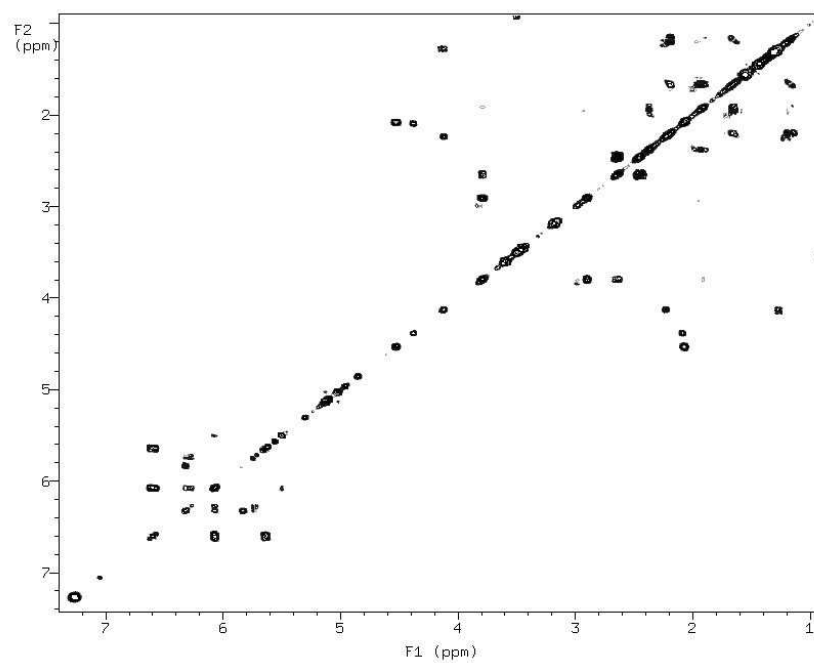
^1H NMR xenimanadina A (500 MHz, CDCl_3).



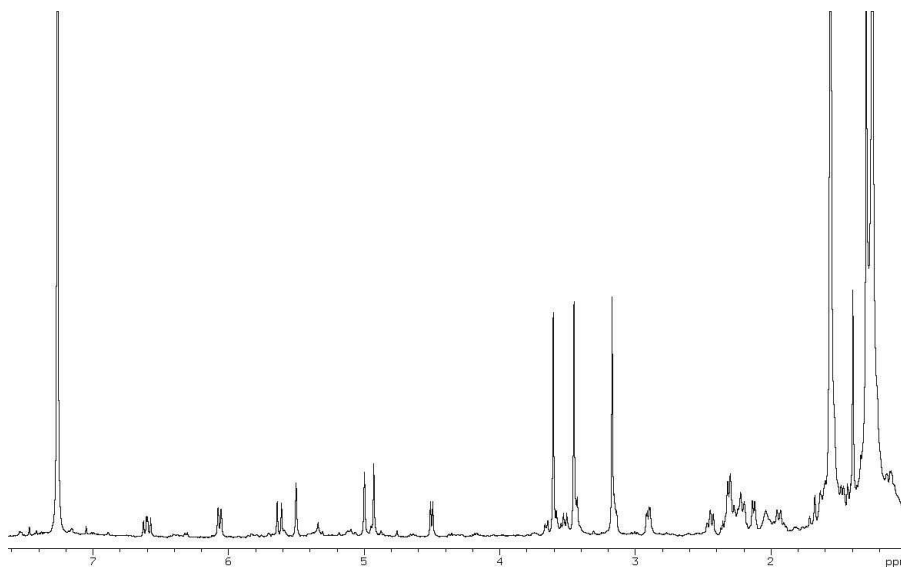
2D COSY NMR xenimanadina A (500 MHz, CDCl_3).



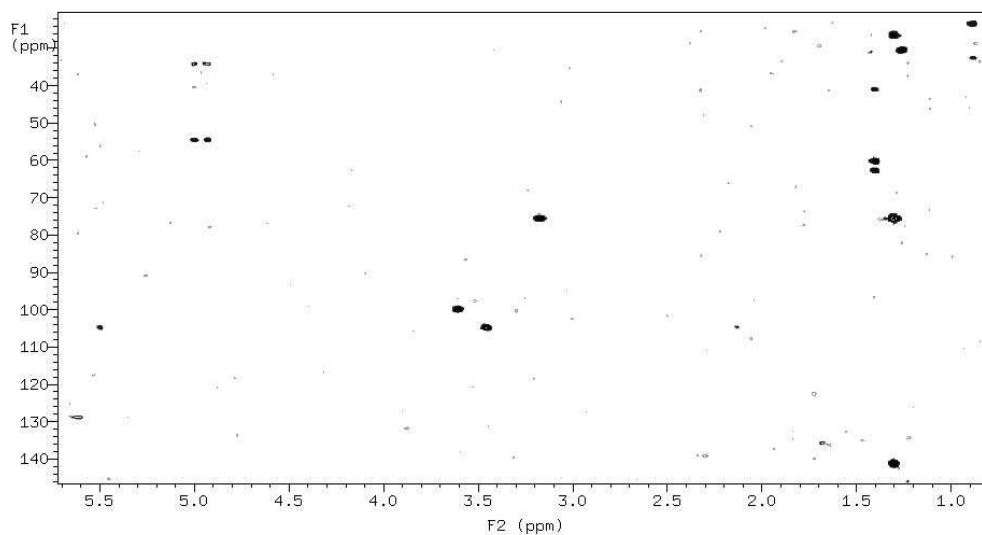
^1H NMR xenimanadina B (500 MHz, CDCl_3).



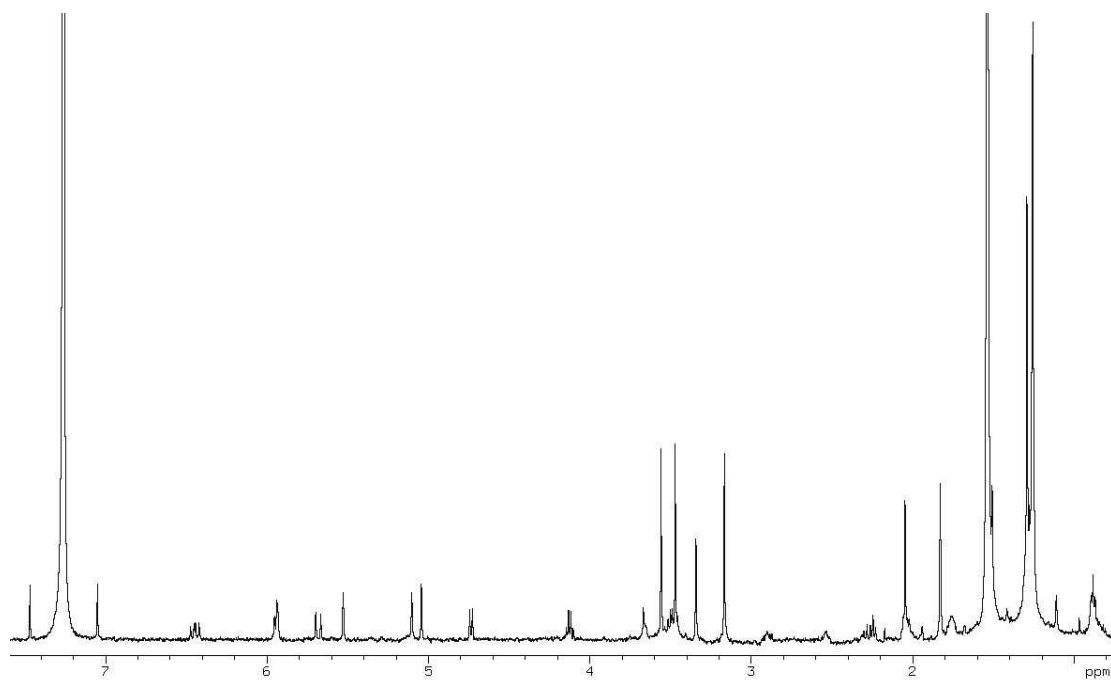
2D COSY NMR xenimanadina B (500 MHz, CDCl_3).



^1H NMR xenimanadina C (500 MHz, CDCl_3).



2D HMBC NMR xenimanadina C (500 MHz, CDCl_3).



¹H NMR xenimanadina D (500 MHz, CDCl₃).

VIII. E. BIBLIOGRAFIA

1. Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Hu, W.-P.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 31, and previous reports of the same series.
2. Andrianasolo, E. H.; Haramaty, L.; Degenhardt, K.; Mathew, R.; White, E.; Lutz, R.; Falkowski, P. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1551.
3. Cheng, Y.-B.; Jang, J.-Y.; Khalil, A. T.; Kuo, Y.-H.; Shen, Y.-C. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 675.
4. Bishara, A.; Rudi, A.; Goldberg, I.; Benayahu, Y.; Kashman, Y. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 12092.
5. Vanderah, D. J.; Steudler, P. A.; Ciereszko, L. S.; Schmitz, F. J.; Ekstrand, J. D.; Van Der Helm, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 5780.
6. Kashman, Y.; Groweiss, A. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 3814.
7. Kashman, Y.; Groweiss, A. *Tetrahedron Lett.* **1978**, 4833.
8. Iwagawa, T.; Amano, Y.; Nakatani, M.; Hase, T.; Shiro, M.; *Chem. Lett.* **1995**, 695-696.
9. Iwagawa, T.; Amano, Y.; Nakatani, M.; Hase, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1996**, *69*, 1309-1312.
10. Iwagawa, T.; Amano, Y.; Hase, T.; Shiro, M. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 11111.
11. Anta, C.; González, N.; Santafé, G.; Rodríguez, J.; Jiménez, C. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 766-768.
12. Geran, R. I.; Greenberg, N. H.; MacDonald, M. M.; Schumacher, A. M.; Abbott, B. *J. Cancer Chemoter. Rep.* **1972**, *3*, 1-91.
13. Hou, R. S.; Duh, C. Y.; Chiang, M. Y.; Lin, C. N.; *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 1126-1130.
14. El-Gamal, A. A. H.; Chiang, C. Y.; Huang, S. H.; Wang, S. K.; Duh, C. Y. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1336-1340.
15. El-Gamal, A. A. H.; Wang, S. K.; Duh, C. Y. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2023-2025.
16. Cheng, Y. B.; Jang, J. Y.; Khalil, A. T.; Kuo, Y. H.; Shen, Y. C. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 675-678.
17. El Gamal, A. A. H.; Chiang, C.-Y.; Huang, S.-H.; Wang, S.-K.; Duh, C.-Y. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1336.

18. Anta, C.; Gonzalez, N.; Santafé, G.; Rodriguez, J.; Jiménez, C. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 766.
19. Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4092.
20. El-Gamal, A. A.; Wang, S.-H.; Duh, C.-Y. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2023.
21. Duh, C.-Y.; El-Gamal, A. A.; Chiang, C. Y.; Chu, C.-J.; Wang, S.-K.; Dai, C.-F. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1882.