

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”**

FACOLTA' DI FARMACIA



Dottorato di Ricerca in
"Scienza del Farmaco"
XX CICLO 2004-2007

“Isolamento e caratterizzazione stereostrutturale di
biotossine marine isolate dai mitili contaminati e da
dinoflagellati del mar Adriatico”

Tutor
Ch.mo Prof.
Ernesto Fattorusso

Dott.ssa
Laura Grauso

Il Coordinatore
Ch. ma Prof.ssa
Maria Valeria D'Auria

INDICE

Capitolo 1

Introduzione	pag 5
1.1 Metodi analitici utilizzati	pag 7
1.1.1 Tecniche di Risonanza Magnetica Nucleare	pag 7
1.1.2 Tecniche di Spettrometria di Massa	pag 11
1.2 Metodi analitici di rivelazione delle biotossine	pag 14
1.2.1 Saggi biologici: tossicità sul topo	pag 16
1.2.2 Saggi di citotossicità	pag 18
1.2.3 Saggi strumentali: LC-MS	pag 18
1.3 Riferimenti bibliografici	pag 20

Capitolo 2

2.1 Il plancton marino	pag 21
2.2 Incremento delle fioriture algali	pag 26
2.3 Conclusioni	pag 31
2.4 Riferimenti bibliografici	pag 32

Capitolo 3

3.1 Le biotossine marine	pag 34
3.2 Tecniche di ricerca nel campo delle tossine marine	pag 37
3.2.1 Raccolta e conservazione delle specie tossiche	pag 39

3.2.2 Saggio biologico	pag 40
3.3 Impatto sulla salute pubblica e sull'esplorazione dell'ambiente marino	pag 41
3.4 Farmaci dal mare	pag 42
3.5 Riferimenti bibliografici	pag 44
Capitolo 4	
4.1 Caratteristiche del metabolismo delle microalghe marine	pag 46
4.2 Metaboliti dei dinoflagellati	pag 48
4.3 Classificazione delle biotossine	pag 49
4.4 Conclusioni	pag 121
4.5 Riferimenti bibliografici	pag 122
Capitolo 5	
5.1 Contaminazione degli invertebrati marini	pag 135
5.2 Procedure di detossificazione degli invertebrati	pag 138
5.3 Riferimenti bibliografici	pag 140
Capitolo 6	
6.1 Le biotossine marine in Italia	pag 142
6.2 Tenori massimi delle biotossine algali nei molluschi eduli	pag 152
6.3 Conclusioni	pag 152
6.4 Riferimenti bibliografici	pag 153

Capitolo 7

7.1 Analisi di una partita di mitili raccolta nel 2004	pag 157
7.2 Risultati e discussione	pag 159
7.3 Parte sperimentale	pag 165
7.4 Conclusioni	pag 167
7.5 Riferimenti bibliografici	pag 167

Capitolo 8

8.1 Analisi di una partita di mitili raccolta nel 2005	pag 174
8.2 Risultati e discussione	pag 175
8.2.1 Determinazione strutturale dell'oxazinina-5	pag 176
8.2.2 Determinazione strutturale dell'oxazinina-6	pag 178
8.2.3 Determinazione strutturale dell'oxazinina-7	pag 181
8.2.4 Conclusioni	pag 182
8.3 Parte sperimentale	pag 184
8.4 Riferimenti bibliografici	pag 190

Capitolo 9

9.1 Gli spiroolidi	pag 204
9.2 Risultati e discussione	pag 210
9.2.1 Identificazione di spiroolidi noti nelle colture di <i>A. ostentfeldii</i>	
Adriatico	pag 210
9.2.2 Delucidazione strutturale del nuovo 27-idrossi-13,19-didesmetil spirolide C	pag 212

9.2.3 Indagine strutturale degli spiroliidi minori mediante LC-MS/MS	pag 215
9.3 Parte sperimentale	pag 217
9.4 Riferimenti bibliografici	pag 219

Capitolo 1

Introduzione

L'interesse nel campo delle sostanze naturali marine ha origini profonde, rintracciabili fin dall'antichità; l'intensa attività che da molti decenni si svolge in questo ambito ha permesso di individuare centinaia di migliaia di nuovi composti, e, al contempo, di pervenire ad importanti considerazioni di ordine generale, tese a chiarire i molteplici aspetti della chimica del mare.

In tal modo, è stato possibile dimostrare che la composizione dei metaboliti primari marini non differisce da quella degli organismi terrestri a testimonianza di un'uniformità delle vie metaboliche di tutti gli esseri viventi.

Profondamente diverso è, invece, il quadro dei metaboliti secondari, dal momento che, per ciascun organismo esiste anche una parte del metabolismo che coinvolge composti peculiari e caratteristici, che possono essere considerati a buon ragione un'espressione dell'individualità della specie. E', tuttavia, possibile inquadrare i composti naturali, isolati da organismi marini, nelle classiche vie biogenetiche dei metaboliti secondari, quali quelle dell'acido mevalonico, delle acetogenine, dell'acido shikimico e degli aminoacidi proteici¹.

Bisogna anche osservare, che l'ambiente marino, profondamente diverso da quello terrestre, ha arricchito tali vie metaboliche con la variante dei legami carbonio - alogeno; fenomeno chiaramente correlato, da un lato alle notevoli quantità di ioni alogeno presenti nel mare, e dall'altro alla capacità di numerosi organismi di trasformare gli anioni alogeno in cationi.

Si deve, inoltre, sottolineare che la conoscenza dei metaboliti secondari marini, allargando man mano i propri orizzonti, ha consentito anche di comprendere il ruolo determinante che essi rivestono nel delicato equilibrio ecologico del mare; attraverso tali mediatori si instaurano, infatti, comunicazioni di tipo chimico tra individui non solo della stessa specie, ma anche di specie diversa. La presenza, poi, della maggior parte di questi composti negli organismi a più basso livello evolutivo, che, nonostante la loro scarsa mobilità, sono sopravvissuti alla legge della selezione naturale, dimostra, in maniera inequivocabile, che alcuni animali e vegetali marini utilizzano delle sostanze chimiche come armi di difesa contro la predazione. Relativamente a quest'ultima funzione, si è visto pure che taluni organismi, incapaci di sintetizzare sostanze in grado di difenderli, riescono a procurarsele tramite l'alimentazione e ad accumularle in parti specializzate del proprio corpo. Ad esempio, i molluschi eduli, incapaci di produrre sostanze ad attività anti-predatoria, riescono ad assimilarle tramite l'alimentazione e ad accumularle in parti specializzate del proprio corpo. E' proprio in questo processo di trasferimento di molecole da un organismo all'altro che va ricercata una delle principali cause della periodica o occasionale tossicità dei molluschi marini eduli.

Nell'ambito di questo attuale tema di ricerca, ho inserito il mio lavoro di tesi, interessandomi dell'analisi chimica di biotossine marine presenti nella specie *Mytilus galloprovincialis* e nei dinoflagellati che le producono. Le analisi effettuate su campioni di mitili raccolti lungo le coste dell'Emilia Romagna hanno messo in evidenza l'enorme variabilità del profilo tossico di quest'area. Pertanto, la gravità del fenomeno e l'attualità del problema, non solo sanitario ma anche

economico, connesso al ritrovamento delle diverse biotossine, hanno focalizzato la mia attenzione su questo campo di ricerca.

1.1 Metodi analitici utilizzati

1.1.1 Tecniche di Risonanza Magnetica Nucleare

Oltre ai comuni esperimenti $^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$, si fa largo uso di esperimenti bidimensionali, che spesso si sono rivelati sufficienti per la completa determinazione strutturale dei composti in esame.

Il vantaggio, nell'uso degli esperimenti bidimensionali, sta nel fatto che vengono ridotti drasticamente i tempi di acquisizione, in quanto da un singolo esperimento è possibile dedurre una quantità di informazioni pari a quella ricavabile soltanto da un grande numero di spettri monodimensionali.

Inoltre, la presenza di due dimensioni rende molto più improbabile la possibilità di sovrapposizione di segnali, cosa che avviene frequentemente negli esperimenti monodimensionali, ottenendo così una migliore risoluzione dello spettro.

Infine, alcuni esperimenti bidimensionali NMR, quali il ROESY e tutti quelli a multiplo quanto, mettono in evidenza anche fenomeni che non sono accessibili mediante esperimenti monodimensionali, portando ulteriori informazioni utili alla costruzione della struttura.

COSY² (CORrelation SpettroscopY)

E' il primo esperimento bidimensionale ad essere stato inventato, e sicuramente, è quello ancora oggi più utilizzato. Si tratta di un esperimento di

correlazione di *chemical shift* omonucleare attraverso l'accoppiamento scalare *spin-spin*. La sua sequenza è costituita da due impulsi di $\pi/2$ separati da un tempo t_1 variabile, nel senso che viene fatto variare durante l'esperimento con incrementi costanti; il secondo impulso trasferisce parte della coerenza creatasi col primo impulso tra nuclei accoppiati scalarmente. Si avranno dunque in corrispondenza di tali nuclei importanti picchi di correlazione, che consentono di stabilire una rete di connessioni fra i protoni di una molecola, fornendo preziose informazioni strutturali come può essere l'individuazione dei diversi sistemi di *spin* presenti nella molecola.

TOCSY³ (*T*otal *C*orrelation *S*pectroscopY)

E' anch'esso un esperimento NMR bidimensionale di correlazione omonucleare, in cui però sono presenti *cross peaks* non solo in corrispondenza di nuclei direttamente accoppiati, ma anche tra qualunque coppia di protoni appartenenti allo stesso sistema di *spin*. Questo esperimento, noto anche col nome di HOHAHA (*H*Omonuclear *H*Artmann *H*Ahn), permette il trasferimento della polarizzazione di un protone a qualunque altro protone che sia ad esso collegato attraverso una serie di accoppiamenti scalari *spin-spin*.

Nella pratica, tuttavia, non si può andare oltre i cinque-sei accoppiamenti; inoltre, un accoppiamento a bassa costante dell'ordine di grandezza di 2 Hz può bloccare la serie di trasferimenti di polarizzazione. Il parametro che regola questi trasferimenti è il *mixing time*, il cui incremento generalmente fa aumentare il numero di correlazioni osservabili, a scapito però della sensibilità dell'esperimento.

ROESY⁴ (*Rotating-frame Overhauser Spectroscopy*)

E' una correlazione di *chemical shift* omonucleare, che mette in evidenza un fenomeno: il **ROE** (*Rotating-frame Overhauser Effect*), simile al NOE, ma che presenta alcune importanti differenze. Infatti, il ROE, come il NOE, è dovuto all'accoppiamento dipolare (attraverso lo spazio) dei nuclei; tuttavia, mentre il NOE al crescere delle dimensioni della molecola (o più esattamente al diminuire del suo tempo di correlazione τ_c) cambia di segno, passando da positivo a negativo, il ROE è sempre positivo. Il ROESY è quindi particolarmente utile per molecole medie, di peso molecolare intorno a 1000, che si vengono quindi a trovare in una zona di confine tra NOE positivo e negativo e quindi prossimo a zero.

Il ROESY ha una sequenza molto simile all'HOHAHA, per cui spesso sono presenti anche dei picchi dovuti a correlazioni di tipo HOHAHA, che fortunatamente, però, sono facilmente riconoscibili perché presentano una fase opposta a quella dei reali picchi ROESY.

HMQC⁵ (*Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*)

E' una correlazione bidimensionale di *chemical shift* eteronucleare ^1H - ^{13}C tramite la costante di accoppiamento diretta $^1J_{\text{CH}}$. In questo esperimento il segnale acquisito è quello protonico, rispetto all'esperimento HETCOSY, che acquisisce invece sul ^{13}C e che, pertanto, è meno sensibile.

L'inconveniente di questo esperimento è che, a causa della bassa abbondanza isotopica del ^{13}C (1.1%), solo la piccola percentuale di protoni legata ad atomi di ^{13}C fornisce informazioni utili; mentre va eliminato tutto il segnale

relativo ai protoni legati al ^{12}C . Tuttavia, poiché quest'ultimo segnale rappresenta la maggior parte del segnale totale, la sua completa eliminazione è piuttosto difficile, e anche una eliminazione incompleta può lasciare un segnale residuo sufficiente a nascondere i picchi di correlazione.

HMBC⁶ (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*)

E' una correlazione eteronucleare *long-range*, che consente di osservare gli accoppiamenti fra carboni e protoni separati da due o tre legami σ , che presentano ancora una apprezzabile costante di accoppiamento. E' un esperimento, quindi, che come principale vantaggio ha quello di superare l'ostacolo costituito da carboni quaternari nelle determinazioni di strutture organiche.

Nell'HMBC il segnale acquisito è quello protonico, rispetto all'esperimento COLOC, che acquisisce invece sul ^{13}C , con tutti i vantaggi di sensibilità che ne derivano, ma anche con il problema della soppressione del segnale dei protoni legati al ^{12}C . Tale problema, in questo esperimento, è acuito dalla minore intensità dei *cross peak*, dovuta al fatto che l'HMBC sfrutta basse costanti di accoppiamento (3-10 Hz), che rendono la tecnica intrinsecamente meno efficiente dell'HMQC. Inoltre, mentre le $^1\text{J}_{\text{CH}}$ sono tutte simili tra loro, le $^{2-3}\text{J}_{\text{CH}}$ possono essere molto diverse tra loro, per cui diviene impossibile eseguire un esperimento ottimizzato per tutti i loro possibili valori.

1.1.2 Tecniche di Spettrometria di Massa

La spettrometria di massa consiste in un insieme di tecniche analitiche, particolarmente usate in chimica organica, che consentono di misurare le masse molecolari e di determinare quindi la formula di struttura di composti sconosciuti, anche avendone a disposizione piccole quantità.

A differenza delle tecniche spettroscopiche, essa 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.

Una molecola però, per poter essere osservata e misurata nelle sue proprietà di massa, deve essere prima volatilizzata e ionizzata in una componente dello spettrometro detta sorgente di ionizzazione.

Per ottenere uno spettro di massa, infatti, il requisito essenziale è di produrre degli ioni in fase gassosa che saranno successivamente accelerati fino a raggiungere una velocità specifica mediante un campo elettrico, e poi proiettati in un analizzatore di massa appropriato che separa entità di masse diverse ed infine, rivelare ogni composto dotato di carica e con una certa massa sequenzialmente nel tempo. Ciò si traduce più sinteticamente col dire che in uno spettrometro di massa il campione è prima ionizzato in sorgente; gli ioni risultanti sono poi separati in funzione del loro rapporto massa/carica (m/z) nell'analizzatore. Tutti gli analizzatori di massa richiedono per il loro funzionamento un vuoto molto spinto.

Mediante la spettrometria di massa è possibile studiare qualsiasi tipo di composto che sia in grado di essere ionizzato, e i cui ioni possano esistere in fase

gassosa per cui a seconda della natura delle molecole da analizzare è richiesta una differente sorgente di ionizzazione.

ESI⁷ (*Electro Spray Ionization*)

In alcuni casi, in considerazione della struttura chimica dei metaboliti tossici isolati dai microrganismi marini, si è ricorsi a tecniche di ionizzazione ESI.

L'ESI è una tecnica ampiamente usata per l'analisi di biomolecole idrosolubili, molto polari o addirittura cariche, e per realizzare l'accoppiamento tra HPLC e spettrometro di massa. La ionizzazione avviene mediante applicazione di una tensione dell'ordine dei KVolt lungo un capillare nebulizzatore collegato all'uscita di un sistema HPLC. Il risultato è uno spettro in cui i picchi principali sono dovuti alle ioni molecolari recanti una o più cariche e a suoi addotti con il solvente o con i sali. L'ESI è una delle molteplici varianti della *Atmospheric Pressure Ionization (API)*, interfaccia applicata tra l'uscita di un'unità HPLC e l'ingresso di uno spettrometro di massa. Ne risulta la formazione di una nebulizzazione molto fine, da cui il solvente può essere rapidamente rimosso. Le particelle vengono ionizzate mediante applicazione di una tensione elettrica all'ago di nebulizzazione (nell'ESI) o mediante una scarica a corona a pressione atmosferica (nell'APCI), e trascinate dal flusso continuo delle particelle e da un piccolo potenziale elettrico attraverso un piccolo orifizio verso l'analizzatore di massa.

I tipi di analizzatori impiegati più spesso in questo genere di analisi sono quello con filtro di massa a quadrupolo e quello a trappola ionica.

- Negli strumenti con filtro di massa a quadrupolo, sono impiegate quattro barre alle quali è applicata una differenza di potenziale. Gli ioni entrano da un'estremità e viaggiano con velocità costante in direzione parallela ai poli (direzione z) ma acquistano delle oscillazioni complesse lungo le direzioni x e y a causa dell'applicazione contemporanea ai poli di una tensione a corrente continua (dc) e di una tensione a radiofrequenza (rf). Esiste un'oscillazione stabile che consente ad un particolare ione di attraversare da un'estremità all'altra il quadrupolo senza entrare in collisione con i poli; questa oscillazione dipende dal rapporto m/z dello ione. Perciò solo ioni con un preciso valore del rapporto m/z attraverseranno in certe condizioni l'intera lunghezza del filtro. Tutti gli altri acquisteranno oscillazioni instabili e collideranno con i poli perdendosi. La scansione della massa viene condotta variando sia rf che dc , mantenendo però costante il loro rapporto.
- Negli analizzatori a trappola ionica le barre del filtro di massa presentano una disposizione sferica. Mentre quindi nel quadrupolo lineare gli ioni selezionati passano direttamente verso il rivelatore, la trappola di ioni trattiene temporaneamente tutti gli ioni, che vengono rilasciati sequenzialmente verso il rivelatore, variando il campo elettrico. In generale, le trappole ioniche non raggiungono gli intervalli di massa e l'alta risoluzione di altri strumenti del settore, ma sono estremamente versatili, forniscono buona sensibilità ed hanno costi iniziali contenuti.

Esperimenti di MS e MS/MS

Su molti degli analiti investigati vengono eseguiti esperimenti di massa tesi a determinare il peso molecolare ed esperimenti di massa/massa (MS/MS). Tali esperimenti vengono realizzati su strumenti dotati di sistema tandem, in cui, cioè, un primo analizzatore è collegato ad una camera di collisione seguita da un secondo analizzatore. Gli ioni precursori vengono separati, in base al rapporto m/z , nel primo analizzatore e passano uno alla volta nella camera di collisione, nella quale si formano ioni prodotto in seguito agli urti con un gas di collisione (elio o argon) introdotto nella camera. Gli ioni prodotto passano quindi nel secondo analizzatore, dove viene generato uno spettro dei frammenti. Strumenti dotati di sistema tandem MS sono i tripli quadrupoli (dove la frammentazione avviene secondo le modalità descritte) e le trappole ioniche dove tutti e tre i suddetti eventi avvengono in un unico luogo, la trappola. Le informazioni fornite da esperimenti MS/MS sono preziose negli studi chimici strutturali per determinare la struttura soprattutto di molecole di grandi dimensioni, e in quelli confermativi per risolvere miscele complesse di prodotti di cui siano note le modalità di frammentazione.

1.2 Metodi analitici di rivelazione delle biotossine

Le biotossine marine prodotte da microrganismi acquatici e che possono contaminare le acque dolci, i molluschi eduli e i pesci, rappresentano, per le gravi conseguenze che ne possono derivare, un serio motivo di preoccupazione per la salute sia umana che di altre specie animali.

Le biotossine rappresentano una vera e propria sfida per il chimico analitico interessato alla loro rivelazione a causa dell'estrema varietà strutturale e dell'ampio range di polarità e di pesi molecolari che sono propri di tali composti. Sono perciò richiesti metodi analitici che permettano la rivelazione delle biotossine in una varietà di matrici biologiche e che siano applicabili:

- al monitoraggio delle acque dolci;
- allo screening dei molluschi eduli in acquicoltura prima della raccolta;
- a studi di screening, quantitativi, e/o confermatori dei molluschi eduli e del pesce prima della commercializzazione;
- alle analisi dettagliate a scopo di ricerca per definire il profilo tossico nel plankton e nei molluschi, la produzione di tossine dal plankton, l'assunzione, il metabolismo e l'eliminazione delle tossine dai mitili.

Naturalmente e sfortunatamente non esiste un unico metodo che soddisfi tutte le esigenze.

Generalmente i metodi analitici vengono suddivisi in due gruppi: i saggi biologici e le analisi chimico-strumentali.

I saggi biologici includono il saggio di tossicità sul topo o sul ratto, i saggi in vitro di citotossicità, i saggi biochimici di inibizione della fosfatasi o recettoriali, i saggi immunologici ELISA e RIA. Essi sono rapidi, molto sensibili e realizzabili a bassi costi, tuttavia non forniscono informazioni quantitative sul contenuto tossico di un campione biologico, sono soggetti a falsi positivi, e, soprattutto, non forniscono informazioni dettagliate sulla natura delle singole sostanze responsabili della tossicità.

E' per questo motivo che sono richiesti metodi strumentali che rispondano a requisiti di sensibilità, precisione e specificità. I metodi analitici strumentali includono la TLC (*Thin Layer Chromatography*), la GC (*Gas Chromatography*), l'LC (*Liquid Chromatography*), la CE (*Capillary Electrophoresis*) e la MS (*Mass Spectrometry*). Ne sono stati poi sviluppati altri che prevedono la derivatizzazione delle biotossine con opportuni reagenti e la loro successiva rivelazione (Es. HPLC-FLD con derivatizzatore post-colonna) o altri ancora che prevedono la combinazione di due delle suddette metodiche strumentali (GC-MS, CE-MS e LC-MS).

1.2.1 Saggi biologici: tossicità sul topo

Il monitoraggio della presenza delle biotossine marine nei molluschi eduli è stato eseguito mediante saggi di mortalità sui topi, secondo quanto indicato dalla Gazzetta Ufficiale Italiana⁸ per le DSP-tossine e le PSP-tossine.

Saggio di tossicità sul topo per le DSP-tossine

Il metodo si basa sulla inoculazione intraperitoneale dell'estratto dell'epatopancreas di molluschi in topi adulti albini di razza Swiss del peso di 18-20 g. La presenza di tossine genera malessere generale e morte. Il saggio viene eseguito su 20 g di epatopancreas (peso sgocciolato) di molluschi, estratti con 100 ml di acetone in omogeneizzatore e mantenuto per 2 minuti a temperatura ambiente. L'omogeneizzato viene, quindi, filtrato o centrifugato, e estratto altre due volte con 50 ml di acetone ogni volta. I tre estratti riuniti vengono evaporati e il residuo sospeso in 10-15 ml di acqua distillata, che viene

infine estratta con 50 ml di etere etilico. L'estratto etero, dopo evaporazione del solvente, è sospeso in 4 ml di una soluzione fisiologica Tween 60 all'1% e inoculato intraperitoneo in tre topi (nella dose di 1 ml per topo), al fine di accertarne la tossicità. Il test è considerato positivo se la morte del topo avviene entro cinque ore dall'iniezione; se, invece, la morte avviene entro 24 ore o non avviene affatto il test risulta negativo, in quanto la quantità di tossine non è considerata rischiosa per il consumatore.

Saggio di tossicità sul topo per le PSP-tossine

Il metodo si basa sulla inoculazione intraperitoneale dell'estratto dell'epatopancreas di molluschi in topi adulti albini di razza *Swiss* del peso di 18-20 g. La presenza di tossine genera paralisi e morte che interviene entro pochi minuti dall'inoculazione. Il saggio viene eseguito su 100-150 g di molluschi (peso sgocciolato), che vengono prima frullati e poi (pesandone 100 g) estratti con 100 ml di HCl 0.1 N. Il pH viene controllato dopo l'estrazione e deve essere inferiore a 4 (preferibilmente intorno a 3). La miscela viene portata all'ebollizione e lasciata bollire per 5 minuti. Si lascia raffreddare e si ricontrolla il pH che dev'essere nel range 2-4 e comunque non superiore a 4.5. Per abbassare il pH si aggiunge HCl 5 N goccia a goccia. Per alzare il pH si aggiunge NaOH 0.1 N goccia a goccia. Si porta a volume (200 ml) con acqua. L'omogeneizzato viene, quindi, centrifugato, e il soprannatante (di cui si controlla nuovamente il pH, viene iniettato intraperitoneo in tre topi (nella dose di 1 ml per topo). Il test è considerato positivo se la morte del topo avviene entro 5-7 minuti dall'iniezione.

1.2.2 Saggi di Citotossicità

Il metodo⁹ consiste nell'aggiungere ai pozzetti contenenti linee cellulari tumorali, venute a contatto con sostanze citotossiche, il 2,3-bis(2-metossi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilammino)carbonil]-2H-tetrazolio idrossido (XTT), che è ridotto ad un derivato formazanico da cellule vive, acquisendo in tal modo la capacità di assorbire raggi UV, mentre le cellule morte perdono questa capacità di ridurre l'XTT.

Le linee cellulari [P388, WHEI 164 (fibrosarcoma murino), J774 (monociti di topo), RAW 274-7 (macrofagi murini) sono le più usate] sono lasciate in incubazione con i campioni da testare a 37°C per 72 ore; quindi ad ogni pozzetto viene aggiunto l'XTT e, dopo almeno 4 ore di incubazione, si procede ad una misurazione dell'assorbanza a 450 nm. Una scarsa assorbanza è chiaramente segno di forte attività citotossica, misurata quindi in percentuale di inibizione della proliferazione tumorale.

L'attività di ciascuna linea cellulare in risposta al trattamento con il composto testato è calcolata come percentuale di cellule morte = $100 - (\text{OD trattata} / \text{controllo di OD}) \times 100$. I risultati vengono espressi come IC₅₀ (la concentrazione che inibisce la crescita cellulare del 50%).

1.2.3 Saggi strumentali: LC-MS

Tra i metodi strumentali utilizzati per la rivelazione delle biotossine un posto di rilievo è occupato dalle tecniche di accoppiamento della cromatografia liquida con la spettrometria di massa (LC-MS).

L'LC-MS si è dimostrato uno strumento estremamente utile per la determinazione qualitativa e quantitativa delle tossine nel plankton e nei mitili, per l'identificazione di nuove tossine e la ricerca sul metabolismo delle tossine nei molluschi eduli⁷.

Metodi analitici basati sulla combinazione HPLC-MS sono stati sviluppati per le principali classi di biotossine marine: acido domoico e altre ASP tossine, acido okadaico e altre DSP tossine, saxitossina e altre PSP tossine, brevitossina, spirolidi e ciguatossina. E', infatti, questo la sola tecnica che si è dimostrata valida per l'analisi di tutte le tossine e che soddisfa le esigenze sia dei laboratori interessati al monitoraggio che alla ricerca sulle biotossine marine. L'accoppiamento HPLC-Massa fornisce infatti:

- Possibilità di rivelazione universale
- Alta sensibilità, con limiti di rivelazione nell'ordine delle parti per bilione
- Alta selettività e specificità
- Minimo clean-up del campione
- Possibilità di esaminare tossine labili e molto diverse strutturalmente
- Quantificazione accurata e precisa
- Ampio range di risposta lineare
- Possibilità di automazione
- Alta produttività
- Rapidità nella messa a punto di metodi analitici
- Accettabilità legale negli studi confirmatori
- Informazioni strutturali per l'identificazione di nuove tossine, analoghi di tossine note e metaboliti.

L'alto costo iniziale dei sistemi HPLC-MS e la necessità di personale specializzato per l'uso di sistemi HPLC-Massa rappresentano le principali difficoltà per molti laboratori, per quanto recentemente siano stati introdotti strumenti relativamente poco costosi, facili da usare, versatili e di dimensioni ridotte e che così in parte hanno risolto tali problemi.

1.3 Riferimenti bibliografici

1. Fattorusso, E. *Tossine in alimenti marini* **1992**.
2. Bax, A.; *Two dimensional nuclear magnetic resonance in liquids*, Delft University Press, Dordrecht, **1982**.
3. Davis, D.G.; Bax, A. *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*, p. 2820.
4. Davis, D.G.; Bax, A. *J. Mag.Res.* **1985**, *37*, p. 207.
5. Davis, D.G.; Bax A. *J. Mag.Res.* **1986**, *67*, p. 565.
6. Bax, A.; Summers, M.F.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, p.2093.
7. a) Quilliam, M. A.; *Applications of LC-MS in Environmental Chemistry*, Elsevier Science Publ. BV, Amsterdam, **1996**, p. 415
b) Quilliam, A. M.; *Harmful Algae Proc. VIII International Conference on Harmful Algae*, Vigo Spain, **1997**, p. 509
8. Gazzetta Ufficiale n.L 075 del **16/03/2002**, p. 62.
9. Scudiero, D.A.; Shoemaker, R.H.; Pauli, K.D.; Monks, A.; Tierney, S.; Nofziger, T.H.; Currens, M.J.; Seniff, D.; Boyd, M.R.; *Cancer Research* **1988**, *48*, p. 4827.

Capitolo 2

2.1 Il plancton marino

Le acque soleggiate della superficie del mare sono ricche di organismi microscopici monocellulari, che si muovono insieme ai loro piccoli erbivori, costituendo il plancton marino, ovvero esseri viventi che non sono in grado di opporsi al movimento delle correnti, ma che si lasciano trasportare da esse (dalla parola greca *planktos* = errante). Il fitoplancton è costituito da microalghe che si possono presentare isolate (forme unicellulari) o raggruppate in piccole colonie di cellule, che a seconda delle specie crescono in biomassa aumentando sia in dimensioni che in quantità. Questi organismi rivestono un ruolo basilare negli ecosistemi acquatici, in quanto figurano come i produttori primari di materia organica, rappresentando così il primo anello della catena alimentare acquatica; i pesci più piccoli, e alcune specie di alghe, utilizzano il fitoplancton come fonte di nutrimento; questi vengono ingeriti dai pesci più grandi, di cui, a loro volta si nutrono gli uomini.

Come le piante terrestri, il fitoplancton richiede la luce del sole, l'acqua e diversi nutrienti per la sua crescita. Poiché la luce del sole è più intensa e più vicina alla superficie del mare, il fitoplancton rimane in prossimità della superficie delle acque.

Così come le piante terrestri, inoltre, gli organismi che costituiscono il plancton marino contengono la clorofilla, il pigmento che gli regala la colorazione verde. La clorofilla viene usata dalle piante marine per la fotosintesi, processo

attraverso il quale la luce del sole viene usata come fonte di energia per trasformare le molecole d'acqua e quelle di anidride carbonica in carboidrati, che rappresentano le unità elementari per la loro crescita. L'atmosfera è una ricca fonte di anidride carbonica, infatti, ogni anno milioni di tonnellate di questo gas vengono scaricati sulla superficie degli oceani. In realtà, il fitoplancton ha bisogno anche di tracce di elementi per sopravvivere, come il ferro, il silicio e il calcio, e di macronutrienti, come i nitrati, i fosfati e l'acido silicico, la cui disponibilità dipende dall'equilibrio tra le cosiddette "pompe biologiche" e l'*upwelling* delle acque in profondità, così ricche di nutrienti. Quando la temperatura delle acque superficiali è bassa, le acque più in profondità riescono a risalire in superficie, portando questi nutrienti essenziali verso la superficie, dove il fitoplancton può farne uso. Quando, invece, le acque superficiali sono molto calde, non avviene l'*upwelling* delle acque in profondità, e si ha come risultato l'impedimento anche della risalita dei nutrienti atti al suo sostentamento.

L'organismo unicellulare ha la capacità di percepire le variazioni ambientali ed adattarvisi, quindi, possiede un sistema di percezione delle fluttuazioni che avvengono nel suo ambiente ed ha la possibilità di reagire. La maggior parte dei vegetali planctonici, ad eccezione dei dinoflagellati, è sprovvista di flagelli e tenderebbe quindi a sedimentare lentamente verso il fondo. Il fluttuare nell'acqua del fitoplancton sarebbe unicamente un movimento di caduta più o meno lento, se non fosse regolato dal peso specifico, dalle resistenze di attrito, e dal movimento attivo dei flagelli.

Ciò spiega molte caratteristiche delle alghe planctoniche: la presenza di oli come sostanza di riserva, la formazione di appendici e protuberanze delle pareti

cellulari, l'aggregazione di molte cellule in catenelle ed anche l'osservazione che le appendici che favoriscono il galleggiamento sono più grandi nelle acque calde (a viscosità più bassa) che non in quelle fredde. Per contrastare l'effetto della gravità e rimanere nella zona eufotica alcuni organismi fitoplanctonici dispongono di strutture che riducono il loro peso specifico e favoriscono il loro galleggiamento.

La proliferazione di alghe nel plancton, definita *algal bloom*, è un fenomeno che si verifica periodicamente e in diverse parti del mondo, in concomitanza di particolari eventi climatici e ambientali, tra cui il fenomeno dell'*upwelling*, che rappresenta la causa principale delle "acque colorate" in tutto il mondo¹. La densità cellulare può essere così alta che le acque diventano in alcuni casi rosse (da cui il termine "maree rosse") ma anche verdi o marroni.

In particolare, vengono definiti come "*harmful algal bloom*" i fenomeni associati alla proliferazione di alghe tossiche e/o dannose^{2,3} che in talune situazioni possono avere conseguenze preoccupanti, dal momento che causano delle severe perdite economiche per gli allevatori di molluschi, per i pescatori e per quanti fondano la propria economia sul turismo, senza contare l'ancor più grave minaccia sull'ambiente e sulla salute dell'uomo. Infatti, le microalghe, oltre che per pesci erbivori, rappresentano la principale fonte di nutrimento, per quegli organismi che si alimentano per filtrazione delle acque del mare, quali ostriche, mitili, pettini, e bivalvi in genere. Tali organismi, attraverso la loro attività di "*filter-feeding*", accumulano le fitotossine nei loro tessuti commestibili, quando le fioriture di tali specie tossiche appaiono inaspettatamente in aree dove i mitili sono coltivati⁴⁻⁶. Questi ultimi sono tra gli alimenti marini più consumati in tutto

il mondo, e in caso di proliferazione algale tossica, finiscono per rappresentare quell'anello della catena alimentare responsabile del trasferimento della tossicità dal plancton all'uomo.

La prima citazione di una proliferazione nociva risale addirittura a circa 1000 anni prima di Cristo. Nella Bibbia, infatti, nel libro dell'Esodo (7; 20-21) è riportato: "tutte le acque del fiume divennero sangue. I pesci che erano nel fiume morirono, e il fiume ristagnò, e gli Egiziani non poterono più bere l'acqua del fiume".

In seguito, uno dei primi casi fatali documentati di avvelenamento, dovuti all'ingestione di molluschi bivalvi contaminati a causa di proliferazioni algali, risale al 1793, quando il Capitano George Vancouver approdò nella Columbia britannica, e molti uomini del suo equipaggio morirono in seguito a paralisi e soffocamento, dopo aver ingerito frutti di mare raccolti in una zona oggi conosciuta come "*Poison Cove*". Il Capitano, in seguito, osservò che per gli aborigeni fosse una sorta di tabù mangiare molluschi quando l'acqua del mare appariva "colorata". Solo molti anni dopo le sostanze responsabili di tale contaminazione furono identificate e denominate PSP dall'inglese *paralytic shellfish poisoning*, alcaloidi così potenti, che una quantità di circa 500 µg, facilmente accumulabile in soli 100 gr di molluschi, può rivelarsi fatale per l'uomo.

Da allora, molti episodi simili sono stati registrati nel Nord America e nel mondo intero, fino ai giorni d'oggi, in cui, oltre 2000 casi di avvelenamento umano (fatali nel 15% dei casi), sono annualmente registrati in tutto il globo, in seguito al consumo di pesci o molluschi⁷.

Appare, così, evidente l'entità del danno economico conseguente ad una riduzione del consumo di alimenti marini e della loro esportazione.

Le specie algali tossiche appartengono principalmente ai taxa delle diatomee e dei dinoflagellati; gli altri taxa sono molto meno rappresentati, sia quantitativamente che qualitativamente, e la loro presenza è legata a condizioni particolari.

Le fioriture algali tossiche, a seconda degli effetti da esse prodotti, possono essere classificate in⁹:

- a) Fioriture di specie che causano soltanto una colorazione particolare delle acque, e che sono in grado di crescere a tal punto da causare morie di pesci e di invertebrati in seguito a una deplezione di ossigeno. Appartengono a questo gruppo alcune specie di dinoflagellati, quali *Gonyaulax polygramma*, *Noctiluca scintillans*, *Srippsiella trochoidea*, e di diatomee, *Skeletonema costatum*.
- b) Fioriture di specie che producono potenti tossine, che possono giungere all'uomo attraverso la catena alimentare, provocando una varietà di danni gastro-intestinali e neurologici. Le tossine sono suddivise nel seguente modo:
 - PSP (*Paralytic Shellfish Poisoning*) prodotte da dinoflagellati appartenenti alle classi *Alexandrium*, *Pyrodinium* e *Gymnodinium*, nonché da alcuni cianobatteri.
 - DSP (*Diarrhetic Shellfish Poisoning*), prodotte da dinoflagellati appartenenti alle classi *Dinophysis*, *Prorocentrum* e *Protoceratium*.

- ASP (*Amnesic Shellfish Poisoning*), biosintetizzate da alcune diatomee, quali, ad esempio, *Pseudo-nitzschia multiseriata*, *P. pseudodelicatissima*, *P. australis*, etc.
 - CIGUATERA-tossine, prodotte dal dinoflagellato *Gambierdiscus toxicus* e *Ostreopsis spp.*
 - Tossine prodotte dai Cianobatteri, quali l'*Anabaena circinalis*, la *Microcystis aeruginosa*, la *Nodularia spumigena*, etc.
- c) Fioriture di specie che nella maggior parte dei casi, non sono tossiche per l'uomo, ma dannose, in vario modo, per pesci e invertebrati, come, ad esempio, la diatomea *Chaetoceros convolutus*, il dinoflagellato *Gymnodinium mikimotoi*, il primnesiofita *Prymnesium parvum* ed il rafidofita *Chattonella antiqua*.
- d) Fioriture di specie produttrici di tossine che vengono trasportate nell'areosol, dall'area di fioritura fino alla costa: tossine NSP (*Neurotoxic Shellfish Poisoning*), prodotte dal dinoflagellato *Gymnodinium breve*.

2.2 Incremento delle proliferazioni algali nel mondo

Se le proliferazioni di alghe rischiose per gli uomini sono, in senso stretto, un fenomeno del tutto naturale, nelle ultime due decadi se ne è registrato un considerevole incremento in frequenza, intensità e distribuzione geografica¹⁰⁻¹².

Ad esempio, le fioriture dei dinoflagellati *Alexandrium tamarense* e *Alexandrium catenella* fino al 1970 avvenivano soltanto nelle acque temperate dell'Europa, del Nord America e del Giappone⁸; dal 1990 in poi, invece, si sono

estese anche nell'emisfero meridionale, e quindi nelle acque del Sud Africa, Australia, Nuova Zelanda, India e Filippine.

L'incremento del numero di segnalazioni di fioriture algali, e il conseguente incremento dei casi d'intossicazioni alimentari, sembra essere dovuto a diverse concause:

a) L'aumento dei fenomeni d'eutrofizzazione delle acque. Il fenomeno dell'eutrofizzazione marina costiera è il risultato dell'arricchimento dei nutrienti (essenzialmente nitrati e fosfati) presenti nelle acque. Tale fenomeno è spiegato sia sulla base di cause naturali che antropogeniche¹³. La principale caratteristica che distingue i due tipi di eutrofizzazione è il tempo di comparsa. Infatti, l'eutrofizzazione naturale è un processo a lungo termine che rientra in una scala del tempo di 1.000-10.000 anni. L'eutrofizzazione antropogenica, che avviene più frequentemente nelle aree costiere per apporto di sostanze eutrofizzanti, quali fosfati e nitrati, ad opera dell'uomo, si manifesta in tempi molto brevi, in una scala temporale di circa 10 anni. Tali sostanze eutrofizzanti sono altamente nutritive per le alghe, le quali, in loro presenza, si accrescono a dismisura producendo, per fotosintesi clorofilliana, grandi quantità di ossigeno. Subito dopo la morte, le alghe sono attaccate da batteri aerobi che le ossidano, liberando anidride carbonica. La quantità di ossigeno consumata dai batteri è più elevata se c'è molta sostanza organica da decomporre. In questo modo si crea nell'acqua una notevole diminuzione dell'ossigeno e ciò compromette la vita degli animali, soprattutto nei bacini chiusi come i laghi e nei mari poco profondi e privi di correnti come l'Adriatico.

Il primo e più importante indice di valutazione dei fenomeni di eutrofizzazione naturale e antropogenica è dato dall'osservazione delle caratteristiche visibili dell'acqua: un'anormale crescita di macroalghe e/o aumento nella biomassa del fitoplancton, determina il fenomeno che viene indicato con il termine di «acqua colorata» e «red tide», come visto in precedenza. Nelle coste europee le «acque colorate» sono dovute ad «*exceptional algal blooms*» (fioriture eccezionali di alghe con più di 10⁶ cellule/litro e di 50 mg/m³ di clorofilla), mentre vi sono anche «*blooms seasonal*» (fioriture stagionali) che non determinano fenomeni visibili in quanto sono dovute a specie di alghe unicellulari che non superano 10³ cellule/litro d'acqua. Ma, se talune specie di microrganismi planctonici non sono influenzati dall'arricchimento in nutrienti delle acque costiere, come il *Gymnodinium breve* e l'*Alexandrium*, molte altre specie sembrano essere stimolate nella crescita dagli scarichi domestici, industriali e agricoli. Il significativo aumento delle fioriture del *Phaeocystis pouchetii*, che per la prima volta è apparso nelle acque tedesche nel 1978, è probabilmente l'esempio meglio conosciuto di questo fenomeno.¹⁴

Per i pericoli che possono derivare dai fenomeni di eutrofizzazione delle acque, Hong-Kong, il Giappone e diverse nazioni europee hanno deciso di ridurre gli scarichi di fosfati e di nitrati almeno del 50% nei prossimi anni: simili sforzi, tuttavia, finiscono per risultare vani, se rimangono iniziative isolate e se, cioè, i paesi vicini continuano ad inquinare le acque marine.

b) L'aumentata conoscenza scientifica di specie tossiche. Le notizie di proliferazioni algali, associate ai danni sulla salute degli uomini e sugli allevamenti di molluschi e pesci occupano uno spazio via via crescente sulle

pagine dei quotidiani, nei programmi televisivi e nella letteratura scientifica. Quindi, c'è un numero sempre maggiore di ricercatori che sorveglia le acque marine, tenendo sotto controllo la proliferazione delle specie tossiche. Un buon esempio è rappresentato dall'*Alexandrium minutum*, che, noto fino al 1988 soltanto in Egitto¹⁵, è stato ora ritrovato anche in Australia, Irlanda, Francia, Spagna, Portogallo, Italia, Turchia, Thailandia, Nuova Zelanda e Giappone¹⁶⁻¹⁷.

Con l'incremento, inoltre, dei problemi connessi alla pesca indiscriminata nelle acque costiere, molte nazioni stanno valutando i vantaggi degli allevamenti di pesci e molluschi.

Queste attività, attraverso un controllo più rigoroso delle acque, portano di conseguenza alla luce la presenza di specie tossiche mai ritrovate in passato. Infatti, un po' dovunque si moltiplicano le comunicazioni scientifiche e sanitarie riguardanti tossine appartenenti alla classe delle PSP, DSP, NSP e ASP.

D'altro canto, gli allevamenti di pesci focalizzano l'attenzione su specie planctoniche, che possono causare seri danni ai delicati tessuti delle branchie¹⁸⁻²⁰.

c) Le deforestazioni e l'eccessivo sfruttamento dell'entroterra. Anche l'antropizzazione delle aree costiere, ed in particolare il progressivo aumento dell'immissione nell'ambiente marino di effluenti urbani, industriali, agricoli e zootecnici, contribuiscono allo sviluppo di alghe tossiche marine o generare variazioni delle specie planctoniche. In Svezia, ad esempio, evidenze sperimentali indicano che le acque fluviali drenate dai terreni agricoli ricchi in azoto e fosforo stimolano la proliferazione di certi cianobatteri, mentre le acque provenienti dalle foreste favoriscono la crescita di tutt'altre specie come il *Prorocentrum minimum*²¹.

d) Le variazioni climatiche. E' opinione comune presso le comunità scientifiche che anche l'effetto-serra e il riscaldamento degli oceani favoriscano lo sviluppo di particolari microalghe, come pure la migrazione di specie da certe aree geografiche verso nuove zone. Ad esempio, il ritrovamento di alcuni fossili testimonia come i progenitori del dinoflagellato *Pyrodinium bahamense*, attualmente confinato solo in alcune aree tropicali, abbia avuto in passato una distribuzione geografica ben più ampia; come, d'altro canto, non è escluso che il *Pyrodinium* nel prossimo futuro possa tornare a proliferare, ad esempio, nelle acque dell'Australia, che già un tempo colonizzava²².

Sono state, inoltre, osservate grosse coincidenze tra la proliferazione del *Pyrodinium* nelle Filippine e in Indonesia con eventi climatici particolari, quali l'ENSO (*El Nino-Southern Oscillation*)²³. Il forte evento ENSO verificatosi tra il 1991 e il 1994 e l'incremento di fioriture di dinoflagellati nello stesso periodo tendono a confermare tale ipotesi.

e) Vettori occasionali di microalghe da un'area geografica all'altra. Infine, anche le acque di zavorra delle navi, insieme alle chiglie delle navi, vanno considerate dei probabili vettori di plancton marino da una parte all'altra del globo. Tale problema è apparso in tutta la sua gravità negli anni '80, quando alcuni dinoflagellati tossici non indigeni sono stati introdotti nelle aree di allevamento di mitili presenti lungo le coste australiane, con disastrose conseguenze economiche²⁴. Al fine di ridurre i rischi associati al trasporto di specie pericolose attraverso le acque delle navi, il 1 novembre 1991 l'Organizzazione Marittima Internazionale ha ratificato alcune linee di condotta, attualmente ancora facoltative, quali il divieto di imbarcare acqua durante la

fioritura di specie tossiche all'interno dei porti, o la possibilità di trattare le acque di zavorra con calore, shock elettrici o con agenti chimici (Cl₂, H₂O₂ etc.)²⁵.

2.3 Conclusioni

Attualmente, il campo della ricerca sulle specie tossiche si sta arricchendo del contributo di studiosi via via sempre più numerosi, dal momento che le ripercussioni sulla salute pubblica e sull'economia del problema delle microalghe tossiche stanno assumendo le forme di una vera e propria emergenza mondiale.

Non c'è dubbio che il crescente interesse nell'utilizzo delle acque costiere per gli allevamenti di pesci e di molluschi stia conducendo ad una maggiore conoscenza scientifica delle specie tossiche delle alghe.

Le nazioni, che vantano sia l'assenza di intossicazioni da alimenti marini che di inquinamento delle acque costiere, stanno concentrando i loro sforzi per impedire l'introduzione, anche non intenzionale, di specie tossiche non-indigene di alghe marine.

E' di notevole importanza, inoltre, che quanti si interessano del controllo delle acque costiere siano coscienti che un aumento di nutrienti, provenienti da attività agricole o di deforestazioni, potrebbe tradursi in un aumento di specie planctoniche tossiche. Infine, gli studi sulle variazioni climatologiche (*El Nino*, effetto-serra, deplezione dell'ozono) possono fornire indicazioni circa la variazione o l'aumento di alghe tossiche nel mare.

Un buon numero, comunque, di programmi internazionali si propone attualmente di studiare e di gestire in modo adeguato le fioriture di alghe nocive e

le loro ripercussioni non solo sull'ambiente, ma anche sull'economia e sulla salute degli uomini.

2.4 Riferimenti bibliografici

1. Ade, P.; Funari, E.; Poletti, R.; *Ann Ist Super Sanità* **2003**, 39(1), p. 53.
2. Anderson, D.M. *Le Scienze*, **1994**, 314, p.74.
3. Hallegraeff, G.M.; Anderson, D.M.; Cembella; A.D. (Ed.) *Manual on harmful marine microalgae*. Paris : UNESCO **1995**
4. Anderson, D.M. *Sci. Am.* **1994**, 271 , p 52.
5. Anderson, D.M. *Nature* **1997**, 338, p.513.
6. Yasumoto, T.; Murata, M. *Chem. Rev.* **1993**, 93, p1897.
7. Dale, B.; Yentsch, C. M. *Oceanus* **1978**, 21, p. 41.
8. Sournia, A.; Chretiennot-Dinet, M. J.; Ricard, M. *J. Plancton Res.* **1991**, 13, p. 1093.
9. *Manual on harmful marine microalgae*, UNESCO, **1995**.
10. Anderson, D.M.; Okaichi, T.; Remoto, T. (ed.). *Red tides: biology, enviromental science and technology*. New york. Elsevier Science Publishing Co.; **1989**, p. 11.
11. Cosper, E.M.; Carpenter, E.J.; Bricelj, V.M. (ed.). *Novel phytoplankton blooms: causes and impacts of recurrent brown tides and other unusual blooms*. Berlin; Springer Verlag; **1989**, p. 449.
12. Hallegraeff, G.M. *Phycologia*, **1993**, 32, p. 77.
13. *Eutrophication in the Mediterranean Sea*, UNESCO, **1988**.

14. Lancelot, C.; Billens, G.; Sournia, A.; Weisse, T.; Colijn, F.; Veldhuis, M.; Davies, A.; Wassman, P. *Ambio* **1987**, *16*, p. 38.
15. Halim, Y. *Vie et Milieu* **1960**, *11*, p. 102.
16. Hallegraeff, G. M.; Bolch, C. J.; Blackburn, S. I.; Oshima, Y. *Bot. Mar.* **1991**, *34*, p. 575.
17. Yuki, K. *Jap. J. Phycol.* **1994**, *42*, p. 425.
18. Bell, G. R.. *Nature* **1961**, *192*, p. 279.
19. Rensel, J. E. In: T. J. Smayda & Y. Shimizu (eds.), *Toxic phytoplankton blooms in the sea.. Developments in Marine Biology*, **1993**, *3*, p. 625.
20. Yang, C. Z.; Albright, L. J. *Diseases Aquat. Organism* **1992**, *14*, p. 105.
21. Graneli, E.; Moreira, M. O. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1960**, *136*, p.89.
22. McMinn, A. *Micropaleontology* **1989**, *35*, p. 1.
23. Maclean, J. L. *Mar. Poll. Bull.* **1989**, *20*, p. 304.
24. Hallegraeff, G. M.; Bolch, C. J. *J. Plankton Res.* **1992**, *14*, p. 1067.
25. Bolch, C. J.; Hallegraeff, G. M. *J. Mar. Env. Eng.* **1993**, *1*, p. 23.

Capitolo 3

3.1 Le biotossine marine

Le tossine sono molecole in grado di indurre manifestazioni fisiologiche dannose negli organismi viventi, anche se assunte in quantità esigue. Secondo l'opinione di Vogt¹, una sostanza può essere definita tossina quando sono rispettati i seguenti requisiti:

- deve essere presente in piante, animali, batteri o altri organismi viventi;
- deve essere estranea all'organismo che colpisce;
- deve avere un effetto tossico riconosciuto sul benessere o sulla vita dell'organismo colpito;
- non deve essere usata come rimedio in pratiche terapeutiche.

Spesso a tossine di origine marina sono stati attribuiti dei nomi di fantasia (saxitossina, tetrodotossina), ma il principio generale nella scelta del nome di una sostanza tossica prevede che il nome dell'organismo in cui è stata rilevata preceda il suffisso tossina. Applicando tale principio di denominazione, bisogna prestare attenzione a quegli organismi in cui sono state riscontrate più tossine, al fine di evitare confusioni.

Tra le specie animali viventi (circa 1 milione), almeno 500000 vivono in ambienti acquatici, un numero destinato ad aumentare con l'esplorazione dei fondali marini. Degli animali marini alcune migliaia di specie sono ritenute tossiche, ma di queste solo una piccola percentuale è stata studiata; infatti, attualmente non sono più di un centinaio le tossine marine, di cui siano conosciute

con esattezza la struttura chimica e la loro azione farmacologia sugli organismi viventi.

Per quanto riguarda il ruolo biologico delle tossine, è ormai opinione comune che esse abbiano una funzione specifica soprattutto nell'ambito della cattura delle prede e in quello della difesa. Infatti, alcune tossine ritrovate nelle spine o nella pelle di alcuni pesci hanno un chiaro ruolo difensivo da più grossi predatori: è stato notato, infatti, come alcuni pesci carnivori rilascino, immediatamente dopo averli addentati, quei pesci che espongono delle tossine sulla propria pelle.

E' stato anche osservato che le tossine prodotte da alcune specie di coralli e di spugne hanno una funzione protettiva non solo contro i predatori, ma anche contro le larve di alcuni animali sessili, che potrebbero fissarsi alle spugne o ai coralli stessi, compromettendone l'esatto svolgimento delle funzioni biologiche.

Alcune tossine marine, inoltre, sembrano avere un significato fisiologico per molti organismi. I pesci che effettuano lunghe migrazioni, per esempio, contengono, come principali lipidi, esteri di cere invece dei più comuni gliceridi; i pesci anziani accumulano grosse percentuali di vitamina A nei loro stomaci; altri pesci accumulano all'interno delle proprie uova tossine che, verosimilmente, hanno un ruolo importante nello sviluppo embrionale.

Al momento, comunque, il significato biologico di molte tossine resta oscuro e in quanto tale costituisce una sfida per i ricercatori.

Nell'ambito di studi biogenetici, le tossine marine sono state spesso marcate, al fine di valutare se esse fossero di derivazione endogena o esogena². E' opinione comune che il gruppo di tossine endogene è costituito da molecole di natura

proteica, in quanto risulta difficile pensare che delle proteine siano accumulate nell'organismo di tanti animali, senza subire alcuna modificazione. Queste tossine, come gli esteri della colina nelle ghiandole salivari dei gastropodi, le ictiotossine e le tossine secrete dalla pelle, vengono comunemente riscontrate in particolari tessuti, senza che vi siano variazioni di sorta tra organismi appartenenti alla stessa specie o che vivono in differenti aree geografiche.

Una tossina viene invece considerata esogena quando improvvisamente o periodicamente, e solo in alcune aree geografiche, fa la sua comparsa in organismi marini, che vengono di solito ingeriti senza provocare alcun danno alla salute.

E' risaputo, anche, che alcuni animali marini, che si nutrono per filtrazione delle acque del mare, accumulano nei propri apparati digerenti le sostanze tossiche rilasciate nell'acqua dagli organismi produttori, senza esserne affetti. Tali animali finiscono così per rappresentare quell'anello della catena alimentare responsabile della trasmissione della tossicità all'uomo. L'ipotesi della catena alimentare è spesso discussa in associazione con la variabilità della tossicità in un organismo, che può derivare dalla frequenza di assunzione di sostanze tossiche, dalla quantità di tossina assunta o dalle condizioni fisiologiche della singola specie: a parità di fonte alimentare e nelle stesse condizioni ambientali alcuni organismi risultano tossici e altri no.

L'ipotesi della catena alimentare è spesso discussa in associazione con la variabilità della tossicità in un organismo, che può derivare dalla frequenza di una dieta tossica, dall'abbondanza della dieta stessa o dalle condizioni fisiologiche, che determinano una ritenzione di tossine all'interno del corpo, anche se ciò non accade in specie simili di organismi, che abbiano, in ogni caso, una dieta parallela.

Ci sono, infatti, grosse differenze tra pesci e animali sessili: un'area in cui si ritrovano pesci tossici potrebbe non essere un'area tossica, se gli organismi tossici vivono con altri organismi non tossici.

Dall'altro lato, quando dei molluschi risultano tossici, si afferma che essi hanno accumulato le tossine tramite la catena alimentare, per il fatto stesso che sono sessili e non possono migrare, per cui, nutrendosi di plancton marino, sono costretti a prelevarlo nelle immediate vicinanze senza possibilità di scelta. I molluschi tendono, inoltre, a concentrare le sostanze tossiche nelle loro ghiandole digestive, poiché il cibo è ingerito dalle cellule fagocitiche dello stomaco, e da qui trasferito alle ghiandole, dove avviene la digestione.

Comunque, una sostanza tossica è generalmente metabolizzata verso una forma non tossica attraverso il sistema di detossificazione dell'organismo, oppure, in alternativa, è rapidamente escreta.

Le ipotesi secondo cui gli animali marini accumulino gradatamente una tossina, che è presente in quantità non sensibili nelle prede, o che un precursore della sostanza tossica sia poi trasformato in tossina nell'organismo del predatore non hanno avuto valide conferme.

Pertanto, la teoria della catena alimentare resta attualmente l'ipotesi più accreditata e universalmente riconosciuta, soprattutto quando una tossina è riscontrata nella dieta dell'organismo.

3.2 Tecniche di ricerca nel campo delle tossine marine

In via del tutto generale, la ricerca su una tossina marina prevede dapprima la raccolta della specie tossica, quindi l'estrazione e la purificazione della tossina,

la determinazione strutturale, e infine la sua sintesi chimica. In tale ricerca sono inclusi anche altri aspetti, quali uno studio epidemiologico, l'attenzione alla salute pubblica, che prevede un monitoraggio della tossicità, il meccanismo farmacologico della tossina e la sua biosintesi.

Nel campo della chimica dei prodotti naturali, operazioni di laboratorio come la separazione, la purificazione, la caratterizzazione e la determinazione strutturale possono essere condotte con le tecniche più moderne. Tuttavia, riesce difficile individuare una procedura universalmente valida, tenendo conto dell'estrema varietà della chimica delle tossine, che possono essere, infatti, proteine, peptidi, lipidi, pigmenti, glicosidi, alcaloidi, composti solforati etc.

Per quanto attiene lo studio epidemiologico, questo può essere condotto intervistando la gente del posto in cui si è registrata la tossicità. Infatti, raccogliere notizie intorno alle circostanze in cui si è verificata un'intossicazione, può rivelarsi molto utile per individuare alcune caratteristiche fisiche della tossina in questione. Ad esempio, aver saputo che si era avuta un'intossicazione fatale, dopo ingestione di una zuppa di granchi, ha consentito in passato agli studiosi di supporre che si trattasse di una tossina idrofila e neurotossica. Sulla scorta di queste informazioni, è stato preparato un estratto acquoso dei granchi ed iniettato in topi: i risultati hanno confermato l'ipotesi.

Purtroppo, ciò non è sempre vero, per cui è necessario raccogliere molti campioni di specie tossiche e determinare un saggio di attività in maniera del tutto empirica.

3.2.1 Raccolta e conservazione delle specie tossiche

Quando un organismo è affetto da una tossina esogena, è necessario raccoglierne molti campioni da vari luoghi e per un lungo periodo di tempo, a causa della grande variabilità di tossicità da individuo a individuo, da luogo a luogo, e nel corso del tempo stesso. Nel caso in cui la tossina sia endogena, non è necessario considerare tutti i fattori di variabilità, di cui sopra.

I campioni tossici sono di norma immediatamente congelati, e in tal modo trasportati nei laboratori di ricerca. Alcuni organismi perdono in breve tempo la loro tossicità, anche se congelati, a causa di azioni enzimatiche; pertanto, al fine di impedire la distruzione delle sostanze tossiche, si procede ad un riscaldamento prima di congelare i campioni. Ad esempio, per mantenere l'attività della ciguaterina, gli stomaci dei pesci, che la contengono, vengono bolliti, prima di essere conservati a -20°C . Quando, poi, ci si trova di fronte a tossine estremamente labili, come quelle di natura proteica, è importante ricorrere a tecniche particolari, per minimizzare la denaturazione. Per questi composti si può utilizzare la conservazione sotto azoto liquido o il congelamento dopo aggiunta di glicerolo.

La conservazione in etanolo, che poi si rivela anche un'estrazione, è risultata utile per la palitossina, ma non è applicabile alle saxitossine contenute ad esempio nei granchi. Infatti, il pH dei tessuti dei crostacei, dopo la morte, si aggira intorno a 9, e le saxitossine sono labili in ambiente alcalino, per cui bisogna adottare delle metodiche, che prevedano la conservazione in mezzi acidi.

3.2.2 Saggio biologico

Il saggio biologico è comunemente usato come buon indicatore di tossicità, dal momento che risulta piuttosto complesso determinare piccole quantità di tossina mediante un saggio chimico senza interferenze da parte dei contaminanti, benché molti studiosi preferiscano quest'ultimo. Diversi animali, o preparazioni tessutali sono abitualmente impiegati nei test farmacologici; in ogni caso, i topi sono gli animali da laboratorio più utilizzati nel campo di ricerca delle tossine marine. Normalmente è la letalità l'indice della tossicità, tranne che in pochi casi, in cui si osservano midriasi, se si somministra la surugatossina, oppure l'insorgenza di dermatiti, in seguito ad esposizione alle tossine dell'alga *Microcoleus lyngbyaceus*.

Il saggio su topo è particolarmente utile per le neurotossine, quali la tetrodotossina e le saxitossine, che sono in grado di uccidere un topo di circa 20 g, mediante iniezione intraperitoneale, in quantità dell'ordine di 0.2 µg. La relazione, inoltre, tra la dose e il tempo di morte permette non solo di valutare con buona approssimazione la quantità di tossina presente nei campioni, ma anche di ricavare informazioni circa la natura della tossina stessa, dal momento che la curva tra il tempo di morte e la dose letale è specifica per ogni classe di tossine³.

Questa tecnica, comunque, non è applicabile a quelle tossine che uccidono il topo troppo lentamente. In aggiunta, è necessario prestare molta attenzione a quegli estratti che uccidono il topo in breve tempo, in quanto anche alte concentrazioni di sali inorganici possono causare una rapida morte del topo, esattamente come le neurotossine.

Alcune tossine, poi, come le saponine e la tetrodotossina, mostrano una grande differenza di tossicità a seconda se vengano somministrate oralmente o intraperitonealmente, al punto che la tossicità per via orale si abbatte di circa 40-50 volte. Pertanto, le tossine presenti nel cibo vanno testate sia oralmente che mediante iniezione.

Anche i ratti e i gatti sono impiegati comunemente nelle prove di tossicità per via orale, poiché in questi casi i topi presentano notevoli problemi.

Nel momento in cui il topo dovesse risultare insensibile al saggio biologico, si può ricorrere ad altre prove, quali l'attività emolitica o all'ittiotossicità.

Ad ogni modo, sia che si proceda con il saggio sul topo, sia che si ricorra all'attività emolitica o all'ittiotossicità, è molto importante l'accuratezza con cui si prepara la soluzione della tossina da testare, al fine di esser certi di averla effettivamente solubilizzata e di non averla denaturata.

3.3 Impatto sulla salute pubblica e sull'esplorazione dell'ambiente marino

Gli organismi marini tossici determinano una vasta gamma di reazioni. Infatti, l'avvelenamento alimentare dovuto ad ingestione di cibi di origine marina non solo mette a rischio la vita e la salute degli uomini, ma al tempo stesso erge grossi ostacoli dinanzi allo studio delle risorse marine di tipo alimentare.

Gli episodi di avvelenamento alimentare rendono l'opinione pubblica allarmata e scettica verso tutti gli alimenti marini, con gravi ripercussioni sull'industria ittica. Del resto negli ultimi anni si sono verificati numerosi casi di intossicazioni, e di questi, stando a dati ufficiali, almeno il 40-50% sono dovuti ad organismi marini. E' un problema di salute pubblica che talune specie di

molluschi provochino una rapida morte negli uomini, così come è altrettanto un problema sanitario l'incidenza di dermatiti in molti nuotatori delle Hawaii causate dall'alga *Microcoleus lyngbyaceus*. Le maree rosse determinano morie generalizzate di coltivazioni di molluschi, di pesci e di animali domestici, e rendono non più utilizzabili grandi riserve di acqua potabile.

Come si accennava prima, le fioriture di microalghe nel mare impediscono anche lo studio degli organismi marini, al fine del loro utilizzo in un regime alimentare. In ogni modo la ricerca di nuove risorse proteiche nell'ambiente marino porta gli studiosi ad imbattersi in nuove specie animali, che prima di poter essere utilizzate come alimenti non devono risultare tossiche.

Normalmente per accertare la bontà di una nuova specie, si cerca dapprima di raccogliere le opinioni, di chi abita lungo le coste dove gli esemplari sono stati ritrovati; quindi, la compagnia di pesca provvederà a sottoporli a test di tossicità, dopodiché si potrà passare al loro inserimento nel commercio.

3.4 Farmaci dal mare

Lo studio delle tossine marine, oltre a contribuire a ridurre i casi di intossicazioni alimentari, può favorire anche la ricerca e la messa a punto di nuovi farmaci. Infatti, certi organismi marini sono stati impiegati a lungo come medicinali; ad esempio l'olio dello stomaco di certi pesci è stato sfruttato come fonte di vitamine A e D; l'insulina è stata estratta dalle balene e dai tonni; l'alga rossa *Digenia simplex* ha trovato impiego per molto tempo come antielmintico; l'agar-agar e l'acido alginico sono attualmente usati nelle formulazioni farmaceutiche.

Comunque, non è economicamente vantaggioso estrarre e purificare un farmaco da un organismo procurato in precedenza; pertanto molte sostanze di origine naturale sono state soppiantate da quelle di origine sintetica e solo pochi organismi marini attualmente trovano impiego nel campo farmaceutico. Tuttavia, i mari e gli oceani vanno sempre considerati come potenziali serbatoi di nuovi farmaci, in virtù della variegata vita marina.

Una tossina, dal momento che è una sostanza che possiede nella sua struttura uno o più gruppi funzionali dotati di una forte attività biologica, può trovare agevolmente applicazione nel campo farmaceutico o come reagente farmacologico. Inoltre, anche se una molecola di origine marina non è utilizzabile direttamente come farmaco, può servire da modello per la sintesi o il miglioramento di altri medicinali.

Recentemente, si è cercato di sviluppare molto l'indagine degli organismi marini, al fine di individuare nuovi farmaci antitumorali, antibiotici, emolitici, analgesici, antispasmodici, ipotensivi o ipertensivi⁴⁻²¹. E tale attività ha condotto ad almeno due importanti risultati: il primo è rappresentato dalla tetrodotossina, che è stata utilizzata come reagente farmacologico; il secondo è un nuovo insetticida derivato dalla nereistossina.

La tetrodotossina a causa della sua elevata tossicità non è mai stata usata come farmaco, nonostante i continui sforzi e tentativi da parte dei ricercatori; ma verso la fine degli anni '60 si è scoperto che la tetrodotossina inibisce selettivamente la permeabilità al sodio delle membrane nervose, con una conseguente paralisi dei nervi periferici. Poiché la paralisi è di tipo reversibile, la

tetrodotossina si è rivelata un efficace strumento per la delucidazione del meccanismo dell'eccitazione nervosa.

Per quanto attiene la nereistossina, bisogna dire che tra i pescatori era ben noto il fatto che le mosche morissero nel momento in cui venivano a contatto con il *Lumbrinereis brevicirra*, comunemente usato come esca. Il costituente tossico è stato isolato nel 1934, ma la sua struttura chimica è rimasta a lungo sconosciuta.

Oggi la nereistossina è servita da modello per la sintesi di molti e efficaci insetticidi.

Al momento sembra, comunque, essere più promettente l'impiego delle tossine come reagenti farmacologici; infatti, dopo la tetrodotossina, anche la saxitossina, la palitossina e la surugatossina sono in fase di studio per un loro eventuale impiego nella sperimentazione farmacologica.

3.5 Riferimenti Bibliografici

1. Vogt, W. *Toxicon* 1970, 8, p. 251.
2. Hashimoto, Y.; Kamiya, H. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **1970**, 36, p. 425.
3. McFarren, E. F. *Food Technol.*, **1971**, 25, p. 234.
4. Hashimoto, Y.; Konosu, S.; Yasumoto, T.; Kamiya, H. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish* **1969**, 35, p. 316.
5. Halstead, B. W.; "Poisonous and venomous marine animals of the world", Vol. 1, **1965**; Vol. 2, **1967**; Vol. 3, **1970**; U. S. Government Printing Office, Washington, D. C.
6. Russell, F. E.; Saunders, P. R. "Animal toxins", Pergamon press, Oxford, **1967**.

7. Baslow, M. H. "*Marine pharmacology*", Williams & Wilkins, Baltimore, **1969**.
8. Freudenthal, H. D. "*Drugs from the sea*", Marine technology society, Washington, D. C., **1968**.
9. Youngken, H. W. "*Food-drugs from the sea, Proceedings 1969*", Marine technology society, Washington, D. C., **1970**.
10. Worthen, R. "*Food-drugs from the sea, Proceedings 1972*", Marine technology society, Washington, D. C., **1973**.
11. Martin, D. F.; Padilla, G. M. "*Marine pharmacognosy*", Academic press, New York, 1973.
12. Scheuer, P. J. "*Chemistry of marine natural products*", Academic press, New York, **1973**.
13. Scheuer, P. J. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **1964**, 22, p. 265.
14. Scheuer, P. J. *Adv. Food Res.*, **1970**, 18, p. 141.
15. Scheuer, P. J. *Naturwissenschaften*, **1971**, 58, p. 549.
16. Russell, F. E. *Adv. Mar. Biol.* **1965**, 3, p. 255.
17. Russell, F. E. "*Fish physiology*", **1969**, Vol. 3, pag. 401, Academic press New York.
18. Der Marderosian, A. *J. Pharm. Sci.*, **1969**, 58, p. 1.
19. Der Marderosian, A. "*Drugs from the sea*", **1968**, pag. 19, Marine Technology Society, Washington, D. C.
20. Youngken, H. W.; Shimizu, Jr. and Y. "*Chemical Oceanography*", **1975**, Vol. 4, pag. 269, Academic press, New York.
22. Ruggieri, G. D. *Science*, **1976**, 194, p. 491.

Capitolo 4

4.1 Caratteristiche del metabolismo delle microalghe marine

Negli organismi marini, e soprattutto negli invertebrati, sono stati ritrovati molti metaboliti dalle strutture e dall'attività biologica piuttosto insolite; ancora oggi persistono seri dubbi circa la loro vera origine o i loro precursori.

E' stato, comunque, dimostrato che molti di questi composti non sono metaboliti primari, ma sono originati da alcuni produttori primari, quali le microalghe, i batteri o i funghi, dai quali vengono poi trasferiti ad altri organismi, mediante processi di simbiosi, di associazione, attraverso la catena alimentare o altre forme di alimentazione¹.

Esiste una teoria piuttosto accreditata, secondo cui anche quella che potrebbe sembrare una specie pura, in realtà, vive una relazione di endosimbiosi.

Di conseguenza, alcuni metaboliti potrebbero formarsi attraverso la collaborazione di due o più organismi. Pertanto, c'è la possibilità che ciò che noi consideriamo metaboliti delle microalghe derivi da batteri o da altri microrganismi associati alle alghe. Andrebbe anche notato che molte alghe microscopiche, che si sospetta producano interessanti metaboliti, non sono state coltivate sotto condizioni estremamente controllate e poco si sa circa la loro effettiva capacità di produrre specifici metaboliti come singole specie.

Le microalghe marine rappresentano la categoria di viventi più diffusa negli oceani, e non ne esiste una stima definita del numero totale delle specie, dal momento che di volta in volta ne vengono scoperte di nuove. Attualmente se ne conoscono circa 10000, suddivise in cinque grosse classi²:

- 1) *Clorophyta* (alghe verdi)
- 2) *Crhysophita* (alghe gialle e diatomee)
- 3) *Pyrrophyta* (dinoflagellati)
- 4) *Eugelnophyta*
- 5) *Cyanophyta* (alghe blu-verdi)

La posizione filogenetica e le caratteristiche fisiologiche degli organismi sono aspetti rilevanti nello studio del loro metabolismo e della biochimica.

In ogni modo, la tassonomia e la relazione filogenetica delle microalghe rappresentano degli argomenti spinosi, su cui i tassonomisti non hanno mai trovato un accordo ³. Questo è il motivo per cui esistono numerose discrepanze circa i nomi delle specie, la loro posizione e la mappa tassonomica, con grandi confusioni all'interno della letteratura chimica.

Un importante esempio è costituito dai *Cyanophita*, comunemente definiti “alghe blu-verdi” o più semplicemente “blu-verdi”; molti studiosi, però, li collocano tra i batteri con il nome di “cianobatteri”, rifiutandosi di includerli tra le alghe a causa della loro natura procariotica. Tuttavia, si tratta di organismi fotosintetici con molte peculiarità delle alghe; al tempo stesso, si ritiene che la maggior parte delle alghe fotosintetiche, o almeno i loro cloroplasti, abbiano la propria origine esattamente nei *Cyanophyta*.

Un altro argomento sospeso nella tassonomia delle microalghe è se gli organismi non fotosintetici debbano essere inseriti o meno nel regno vegetale. Ad esempio, un gran numero di dinoflagellati manca di clorofilla ed è eterotrofo, e in quanto tali i succitati dinoflagellati vengono spesso classificati come protozoi nel

regno animale. D'altro canto, gli *Euglenoidi*, a dispetto della loro attività fotosintetica, sono tradizionalmente inclusi nel regno animale. Il tentativo, comunque, di classificare questi organismi solo sulla scorta della loro capacità di fotosintesi risulta evidentemente vano, nel momento in cui ci si imbatte in organismi fotosintetici ed eterotrofi in specie strettamente correlate, o addirittura all'interno della stessa specie. Infatti, molti dinoflagellati fotosintetici possono divenire eterotrofi, a seconda delle condizioni ambientali.

Recentemente, è stato proposto il regno dei *Protoctista*, al fine di comprendere tutti quegli organismi che non sono in senso stretto né piante né animali⁴. E probabilmente questa classificazione diventerà più comune nel prossimo futuro.

4.2 Metaboliti dei dinoflagellati

I dinoflagellati sono organismi provvisti di flagello e possono essere sia fotosintetici che eterotrofi. Attualmente se ne conoscono più di 4000 specie⁵, oltre ai molti dinoflagellati fossili, che sono altresì considerati una delle risorse di petrolio. La posizione filogenetica dei dinoflagellati è unica e al confine tra i procarioti e gli eucarioti, al punto che alcuni studiosi hanno proposto di definirli “mesocarioti”⁶. I cicli biologici di questi organismi sono piuttosto variegati e molti di essi adottano forme di vita di tipo simbiotico. Alcuni dinoflagellati sono bioluminescenti, e probabilmente sono i principali responsabili della luminescenza degli oceani.

La chimica dei dinoflagellati è centrata sulle loro produzione di tossine e di pigmenti; mentre, soltanto poche specie sono state studiate al fine di individuarne

il metabolismo secondario. La seguente tabella (tab.1) mostra i principali metaboliti secondari dei dinoflagellati:

Tabella 1. Principali metaboliti secondari dei dinoflagellati

ORGANISMI	METABOLITI
Amphidinium spp. Alexandrium tamarense	macrolidi: amfidinolidi
A. catenellum, A. acatenella, Pyrodinium bahamense, Gymnodinium catenatum	eterocicli: saxitossina, derivati della goniautossina
Dinophysis spp.	polieteri: acido okadaico, macrolidi
Gambierdiscus toxicus	eteri policiclici: ciguatossina, macrolidi
Goniodoma, Gymnodinium breve	eteri policiclici: brevitossine, emibrevitossine
Prorocentrum concavum	polieteri: acido okadaico e macrolidi

Quindi, tra i metaboliti secondari dei dinoflagellati vanno annoverati la saxitossina e i suoi derivati, gli eteri policiclici, i macrolidi e i composti aciclici ossigenati e i composti coinvolti nella bioluminescenza e nei cicli circadianici.

4.3 Classificazione delle biotossine

Le fitotossine accumulate dai molluschi eduli esercitano un particolare fascino per i chimici a causa della loro struttura atipica, per la loro natura tossica e per la loro storia. Esse hanno alcune delle strutture più complesse conosciute in natura, con pesi molecolari da molto bassi a molto alti, e possono essere da molto polari ad altamente lipofile. Presentano caratteristiche multifunzionali, un elevato grado di chiralità, e producono effetti tossici molto diversi, ed a tal proposito sono

denominate e classificate in base agli effetti farmacologici in DSP, PSP, ASP, NSP e CIGUATERA-tossine. Un gruppo a parte per farmacologia e chimica è rappresentato dalle tossine prodotte dai cianobatteri. Esistono, tuttavia, anche altre biotossine marine che non sono ascrivibili a nessuna delle suddette classi, ma non per questo sono meno pericolose e diffuse: le yessotossine, le pectenotossine, la palitossina, la tetrodotossina, la neosurugatosina e la prosurugatosina, e due gruppi di composti di recentissima scoperta, gli azaspiracidi e gli spirolidi.

PSP Tossine

Le tossine PSP sono potenti neurotossine responsabili dell'intossicazione alimentare umana definita “avvelenamento paralitico da molluschi” e indicata con la sigla PSP (*paralytic shellfish poisoning*), il cui capostipite è rappresentato dalla saxitossina (STX). Una volta prodotte dai dinoflagellati vengono trasferite ad organismi filtranti, che le accumulano e, successivamente, da questi ultimi direttamente all'uomo. Il legame tra la tossicità da molluschi e dinoflagellati è stata stabilita per la prima volta da Sommer, prima della seconda guerra mondiale, nell'ambito di una ricerca sullo sviluppo della PSP nella baia di San Francisco⁷. I lavori di Sommer, e tutti gli altri lavori successivi, hanno dimostrato che le saxitossine sono prodotte nel periodo di crescita dei dinoflagellati, e accumulandosi nelle ghiandole digerenti degli organismi filtranti, come i bivalvi, si distribuiscono attraverso un trasferimento di tipo trofico.

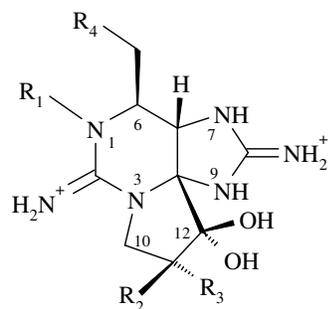
Recenti ricerche hanno permesso di ipotizzare che le saxitossine siano prodotte nei dinoflagellati anche da batteri endosimbionti⁸; infatti, è stata individuata una dozzina di composti strutturalmente correlati nei dinoflagellati

Alexandrium, *Gymnodinium* e *Pyrodinium* spp. D'altra parte, anche cianobatteri che proliferano nelle acque dolci, quali *Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena circinalis*, e *Lyngbya* sp. producono PSP tossine in associazione con altre neurotossine (anatossina-a e anatossina-as) ed epatotossine (cylindrospermopsina and microcystine).

I sintomi da PSP nell'uomo compaiono molto rapidamente dopo il consumo di molluschi contaminati, spesso dopo mezz'ora; la rapidità dell'attacco sembra essere proporzionale alla quantità di tossine ingerite.

Finora sono state isolate 12 saxitossine da dinoflagellati, classificate in 4 gruppi, sulla base del tipo e della posizione di alcune funzioni (figura 1). La molecola modello (la saxitossina, STX, **1**)⁹ è una tetraidropurina formata da due unità guanidiniche fuse attraverso un legame azachetalico stabile. La molecola possiede inoltre un diolo geminale.

La neosaxitossina (NEO, **2**) è una molecola quasi identica alla STX dal punto di vista spettroscopico e chimico, ma differisce da quest'ultima per un gruppo ossidrilico sul N-1¹⁰. La saxitossina e la neosaxitossina formano il primo gruppo delle PSP-tossine; le rimanenti 10¹¹ sono raggruppate in tre classi sulla base della sostituzione del gruppo 11-OH solfatato (II gruppo); della N-sulfoconiugazione sul gruppo carbamoilico (III gruppo); o sulla doppia sulfoconiugazione all'11-OH e al gruppo carbamoilico (IV gruppo).



STX = saxitoxin
 NEO = neosaxitoxin
 GTX = gonyautoxins

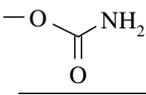
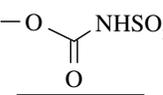
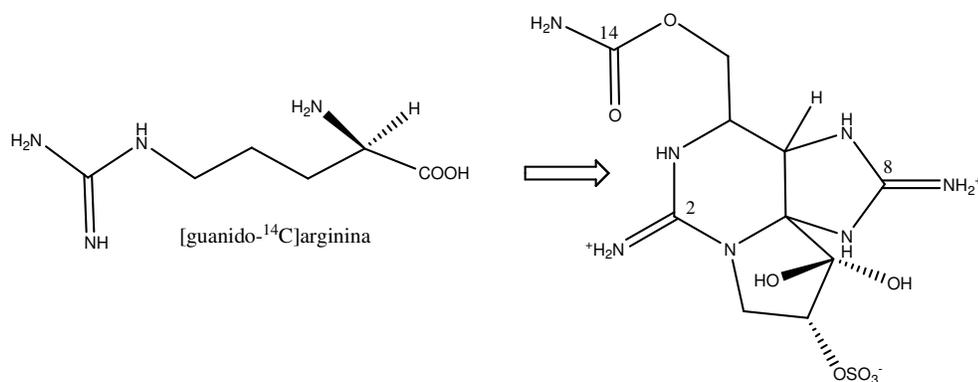
R ₁	R ₂	R ₃	R ₄ :	Carbamate toxins 	N-Sulfocarbamoyl toxins 	Decarbamoyl toxins -OH
H	H	H	—	1 STX	11 GTX5, B1	17 dcSTX
OH	H	H	—	2 NEO	12 GTX6, B2	18 dcNEO
H	H	OSO ₃ ⁻	—	3 GTX2	13 C1	19 dcGTX2
H	OSO ₃ ⁻	H	—	4 GTX3	14 C2	20 dcGTX3
OH	H	OSO ₃ ⁻	—	5 GTX1	15 C3	21 dcGTX1
OH	OSO ₃ ⁻	H	—	6 GTX4	16 C4	22 dcGTX4
H	H	OH	—	7 11αOH-STX		23 11αOH-dcSTX
H	OH	H	—	8 11β OH-STX		24 11β OH-dcSTX
OH	H	OH	—	9 11αOH-NEO		25 11αOH-dcNEO
OH	OH	H	—	10 11βOH NEO		26 11βOH dcNEO

Figura 1. La Saxitossina e i suoi derivati.

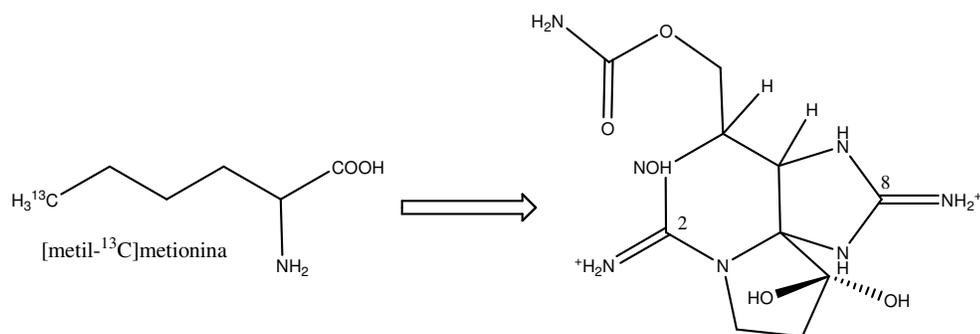
La biosintesi di questi composti è stata profusamente studiata utilizzando precursori marcati somministrati a colture di *Alexandrium tamarense* e l'*Aphanizomenon flos-aquae*.

In primo luogo, è stato dimostrato che nella gonyautossina II il gruppo carbamoilico e i due gruppi guanidinici derivano dall'arginina¹²; lo scheletro peridropurinico non è un prodotto del classico metabolismo delle purine, come potrebbe sembrare a prima vista, ma il sistema tricyclico deriva da una condensazione di Claisen di un acetato sul carbonio α dell'arginina con la perdita

del gruppo carbossilico dell'arginina e la susseguente amidazione e ciclizzazione¹³.

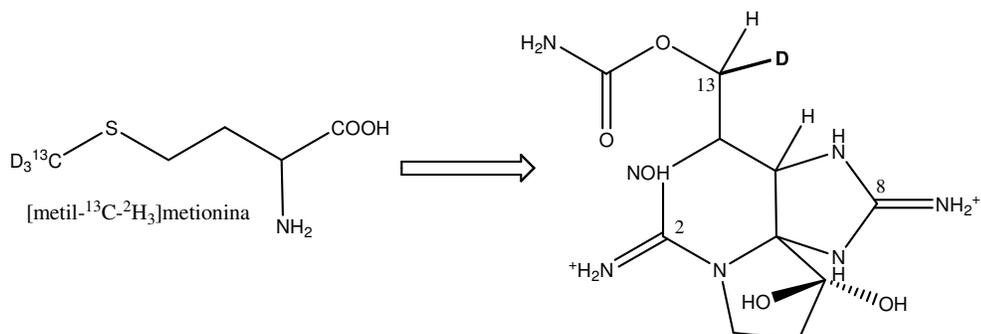


La catena laterale deriva dalla metionina attraverso la via della S-adenosilmetionina (SAM).

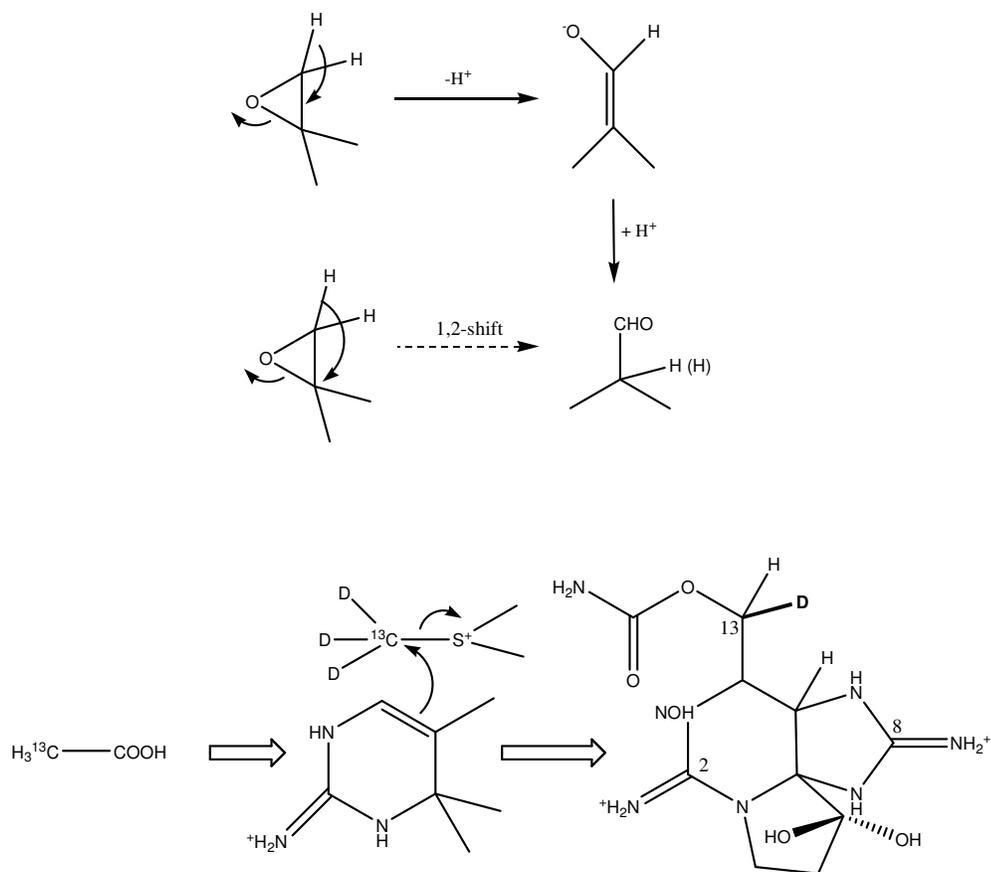


Quindi, l'aggiunta di [2-¹³C]acetato e [1,2-¹³C₂]acetato ha mostrato che il C-5 e il C-6 derivano da un'unità di acetato, e che il resto del sistema ciclico proviene dall'arginina.

E' stato inoltre dimostrato, attraverso l'utilizzo di [metil- ^{13}C , $^2\text{H}_3$]metionina, che soltanto uno degli idrogeni dei metili della metionina rimane nel metilene della catena laterale.

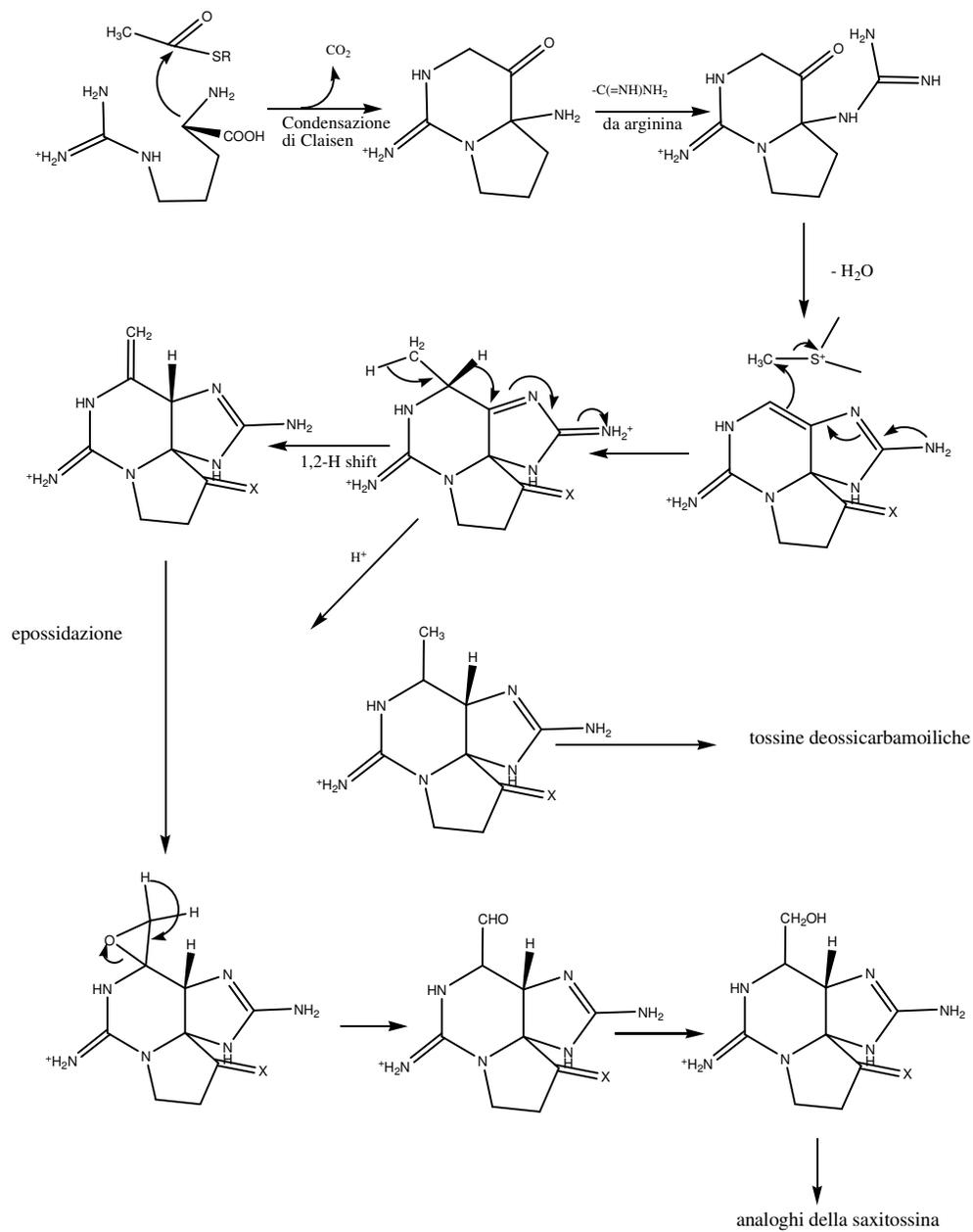


Sulla scorta di questi risultati è stato proposto che il carbonio della catena laterale fosse introdotto mediante attacco elettrofilo sul doppio legame, seguito dalla migrazione di un idruo e dalla eliminazione di un protone. La conversione, poi, del gruppo metilenico terminale a carbinolo potrebbe procedere attraverso la formazione di un epossido, seguito da apertura del ciclo ad aldeide e sua riduzione¹⁴. Questo processo spiega la ritenzione di uno solo degli atomi di deuterio nel prodotto (Schema II).



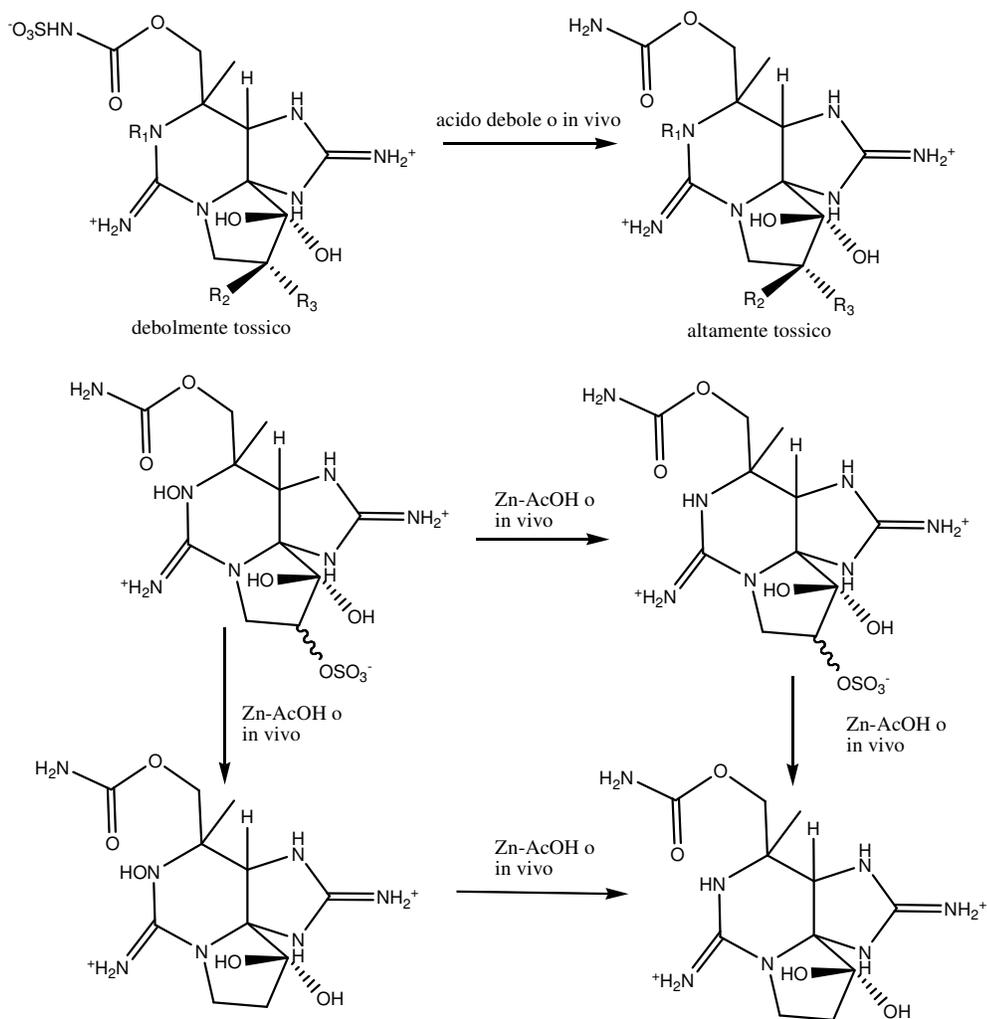
Schema II. Origine di H-6 nella biosintesi della saxitossina.

Il gruppo delle deossidecarbamoil tossine¹⁵ potrebbe formarsi, invece, mediante l'attacco di un idruo sul C-6, invece che per eliminazione di un protone dal gruppo metilico in posizione 13. Ciò viene confermato dal fatto che l'aggiunta graduale di $[2-^{13}C]$ acetato e $[metil-^{13}C, ^2H_3]$ -metionina, non risulta in alcun riarrangiamento di un idrogeno del gruppo metilico alla posizione C-6. Questi risultati sono spiegati attraverso uno schema sintetico piuttosto insolito (Schema III)¹⁶.



Schema III. Biosintesi della saxitossina.

Un'altra caratteristica di queste tossine è la presenza di un solfato. Infatti, la maggior parte delle tossine nei dinoflagellati è presente come 11-O-solfato e/o N-solfocarbamoil derivati. Va osservato che la presenza di un gruppo N-solfato è alquanto rara tra i prodotti naturali; in effetti, dei gruppi simili si ritrovano soltanto nei β -lattami e negli aminopolisaccaridi. I gruppi N-solfato sono facilmente idrolizzati da acidi deboli¹⁷ e da N-solfatasi nei sistemi biologici¹⁸. Non è chiaro se la formazione di una tossina solfatata preceda o meno un composto non solfatato nei dinoflagellati; comunque, è stato provato che il taglio riduttivo di un O-solfato potrebbe aver luogo nei bivalvi, per dare una tossina non solfatata come la saxitossina¹⁹⁻²⁰. Analogamente, il gruppo N-idrossi della serie delle neosaxitossine potrebbe essere rimosso attraverso un processo riduttivo. Anche in questo caso non si sa se gli N-idrossi derivati siano i precursori dei composti correlati alla saxitossina, o se esista un'altra via biogenetica nei dinoflagellati stessi (Schema IV).



Schema IV. Conversione chimica e in vivo dei derivati della saxitossina.

Si dovrebbe, infine, notare che sono necessarie tre molecole di arginina per costruire una tossina PSP (figura 4).

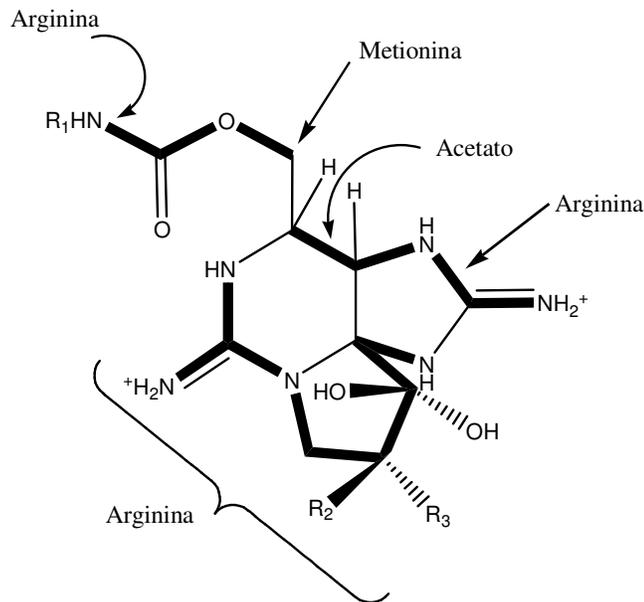


Figura 4. Unità costitutive della saxitossina

Ciò ha un rilevante significato in termini di metabolismo dell'azoto dell'organismo produttore. In alcune specie, infatti, i livelli di tossine PSP raggiungono valori di 60 pg/cellula, rappresentando così un'enorme parte del contenuto organico totale di una cellula il cui diametro è dell'ordine di 20 μm .

La presenza, quindi, di un'alta concentrazione di metaboliti degli aminoacidi potrebbe essere interpretata come un meccanismo per smaltire l'eccesso di aminoacidi nella cellula stessa.

Il significato biologico di questi composti è stato spesso descritto in termini di auto-difesa, anche se la tossicità degli organismi produttori varia da ordine a ordine e a volte anche all'interno della stessa specie, senza nessun apparente effetto sulla loro possibilità di sopravvivenza.

I sintomi dell'intossicazione alimentare umana chiamata avvelenamento paralitico da molluschi compaiono nell'uomo molto rapidamente, circa 30 minuti

dopo l'ingestione del materiale contaminato, e includono: parestesia dapprima ristretta al volto e che poi si estende rapidamente alle dita; si sviluppa in seguito un torpore generale accompagnato da capogiro, atassia e intorpidimento muscolare. Forti dosi inibiscono la respirazione e la morte interviene per asfissia tra le 2 e le 24 ore dall'ingestione del materiale contaminato a seconda dell'entità della dose ²¹. Non esiste alcun antidoto noto, e la sola cura consiste nel tenere il paziente in respirazione artificiale finché le tossine non vengono metabolizzate ed escrete. Il massimo livello tollerabile di saxitossina corrisponde a circa 80 µg per 100 g di molluschi.

La tossicità delle PSP si realizza attraverso un blocco reversibile dei canali voltaggio-dipendenti del sodio di tutte le cellule eccitabili. Conseguentemente al legame di tali tossine con un recettore localizzato sulla superficie esterna di tali canali, il flusso passivo di ioni Na⁺ verso l'interno della cellula è impedito e la formazione del potenziale d'azione prevenuta.

La differenza nello stato di carica e nella natura dei sostituenti determina differente affinità di legame per il recettore e differente tossicità tra le varie PSP: in particolare, i derivati carbamoilici sono i più tossici e quelli sulfo-carbamoilici i meno tossici.

Tetrodotossina

Tra le tossine a struttura guanidinica, figura senz'altro la tetrodotossina (TTX), benché non sia prodotta da dinoflagellati,. La TTX è una delle tossine marine meglio conosciute a causa dei continui avvelenamenti di cui è

responsabile. Il nome deriva dai pesci della famiglia dei *Tetraodontidae*, largamente diffusa nel regno animale sia marino che terrestre²²⁻²⁴.

L'avvelenamento da TTX è noto da oltre 2000 anni; infatti, in Giappone da tempi remoti si ricordano casi dovuti ad ingestione di pesce palla (*Tetraodon*), in cui la tossina viene accumulata principalmente nel fegato, nelle ovaie e nelle viscere, fino a provocare paralisi²⁴. Si ritiene anche che lo stato “zombie” descritto nei riti *Voodoo* sia da attribuirsi alla tetrodotossina presente in certe pozioni, preparate utilizzando estratti di pesce palla²⁵.

Ancora oggi, in varie nazioni asiatiche, dove il pesce palla è considerato un cibo prelibato, esiste ed è relativamente frequente questo tipo di intossicazione, che si manifesta con intontimento, bradicardia, convulsioni, paralisi e in alcuni casi morte per arresto cardiaco. La DL₅₀ sul topo per iniezione i.p. è di 10 µg/kg.

Numerose misure preventive vengono adottate per evitare le intossicazioni; ad esempio, solo personale esperto e munito di licenza può maneggiare il pesce palla nei mercati e rimuoverne le viscere.

Oltre che nel pesce palla, la tetrodotossina è stata ritrovata anche in un pesce molto differente dal punto di vista tassonomico, il *Gobrius criniger*²⁶, nella salamandra californiana *Taricha torosa*²⁷ e nel polipo *Hapalochlaena maculosa*²⁸.

E' stato suggerito che la TTX giochi un ruolo anti-predatorio negli animali che la accumulano; infatti, il pesce palla emette piccolissime quantità di tetrodotossina attraverso la pelle nel momento in cui avviene il contatto, allo scopo evidente di scoraggiare la predazione²⁹.

Le variazioni di concentrazione della tetrodotossina a seconda delle specie animali, delle stagioni e delle zone geografiche suggeriscono chiaramente la sua

origine esogena rispetto agli animali contaminati. La principale fonte di TTX è un batterio³⁰, che dapprima veniva identificato nello *Pseudomonas* sp., poi nell'*Alteromonas* sp. e infine in una nuova specie, la *Shewanella alga*³¹.

La sua struttura molecolare, caratterizzata da un gruppo guanidinico e da una singolare funzione emilattonica, è stata chiarita nel 1964 quasi simultaneamente in due laboratori giapponesi diretti dai professori Tsuda e Hirata, e due statunitensi diretti dai professori Woodward e Mosher (figura 5).

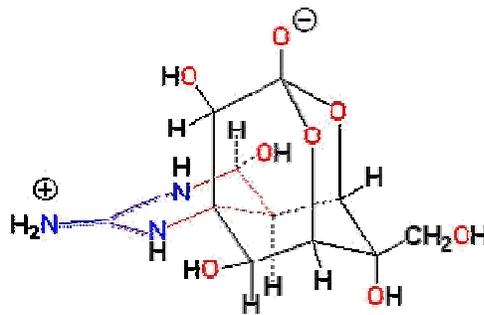


Figura 5. Tetrodotossina

La tossina è stata isolata in forma pura e identificata in modo inequivocabile attraverso tecniche di massa, come il FAB, attraverso l'HPLC fluorimetrico, i saggi biologici su topi, e la sua degradazione a 2-amino-6-(idrossimetil)-8-idrossichinazolina. Successivamente una vasta gamma di batteri è stata individuata come potenziali produttori di TTX³²⁻³⁴, benché le quantità di tossina fossero talmente basse, che la sua identificazione è stata condotta sulla scorta di evidenze piuttosto modeste. Inoltre la scarsa abbondanza di TTX nei batteri ha reso difficoltosi gli studi biosintetici.

Eteri policiclici

Una delle classi di composti più caratteristica prodotta dai dinoflagellati è rappresentata dalla classe dei composti polieterei.

Numerosi composti a struttura polieterea sono responsabili di avvelenamenti da alimenti marini. Essi sono suddivisi in tossine che generano ciguatera, in DSP-tossine, in pectenotossine, in yessotossine e in NSP-tossine. A questo tipo di tossine appartiene anche la palitossina, responsabile di avvelenamenti mortali causati da ingestione di granchi e pesce balestra.

Biosintesi

La brevitossina B è stato il primo composto tossico a struttura polieterea ad essere stato studiato, dopo essere stato isolato dal dinoflagellato *Gymnodinium breve*; la sua struttura è stata definita in maniera inequivocabile nel 1980³⁵, attraverso tecniche di cristallografia a raggi-X. Successivamente, mediante le stesse tecniche, è stata delucidata anche la struttura della brevitossina A³⁶. Oltre alla brevitossina A e alla brevitossina B (fig. 9), è stato isolato nello stesso organismo un nuovo tipo di tossina, l'emibrevitossina³⁷, che possiede all'incirca la metà dello scheletro della brevitossina.

La biosintesi delle brevitossine è stata oggetto di speculazione dal momento in cui è stata determinata la struttura della brevitossina B. E' stato suggerito che la struttura ciclica completamente *trans* potrebbe derivare da un'apertura a cascata di epossidi tutti *trans*, che potrebbero a loro volta formarsi dall'eossidazione di doppi legami di tipo *trans*³⁸⁻³⁹ (figura 7).

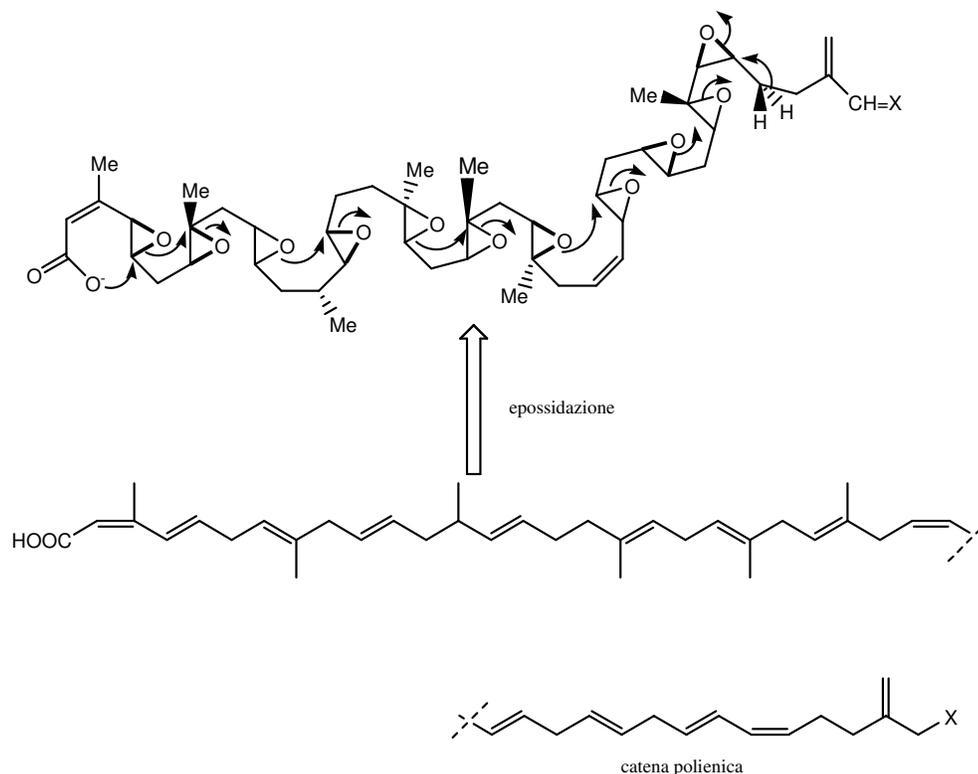


Figura 7. Formazione di eteri policiclici nella biosintesi delle brevityssine.

La consecutiva apertura degli epossidi potrebbe partire da entrambi i lati della molecola, ma la struttura della emibrevityssina B, che rappresenta la metà destra della struttura della brevityssina, dimostra chiaramente che la ciclizzazione inizia dalla parte destra, forse attraverso l'apertura di un *cis*-eossido e lo spostamento di uno ione idruro. La sequenza ricorda molto il meccanismo proposto per la biosintesi degli antibiotici polieterei. Pertanto, si potrebbe semplicemente assumere che, come nel caso degli antibiotici, la catena carboniosa polienica di base della brevityssina sia sempre un'acetogenina, biosintetizzata a partire da unità di acetato, e che i metili siano introdotti mediante sostituzione

dell'acetato con il propionato oppure mediante l'intervento di una metionina attraverso una metilazione con l'*S*-adenosilmetionina (figura 8).

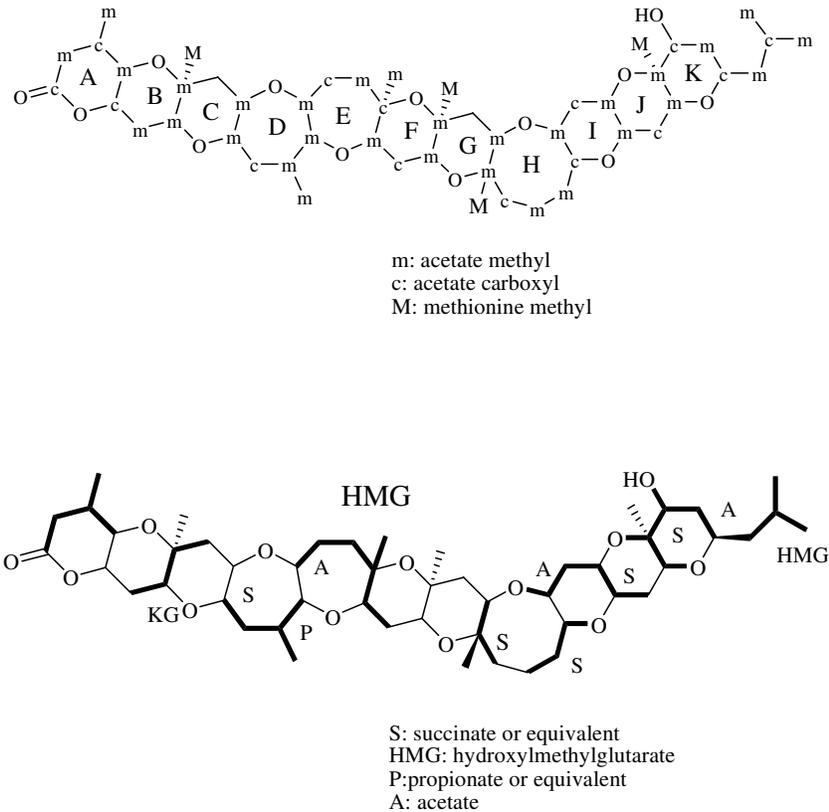
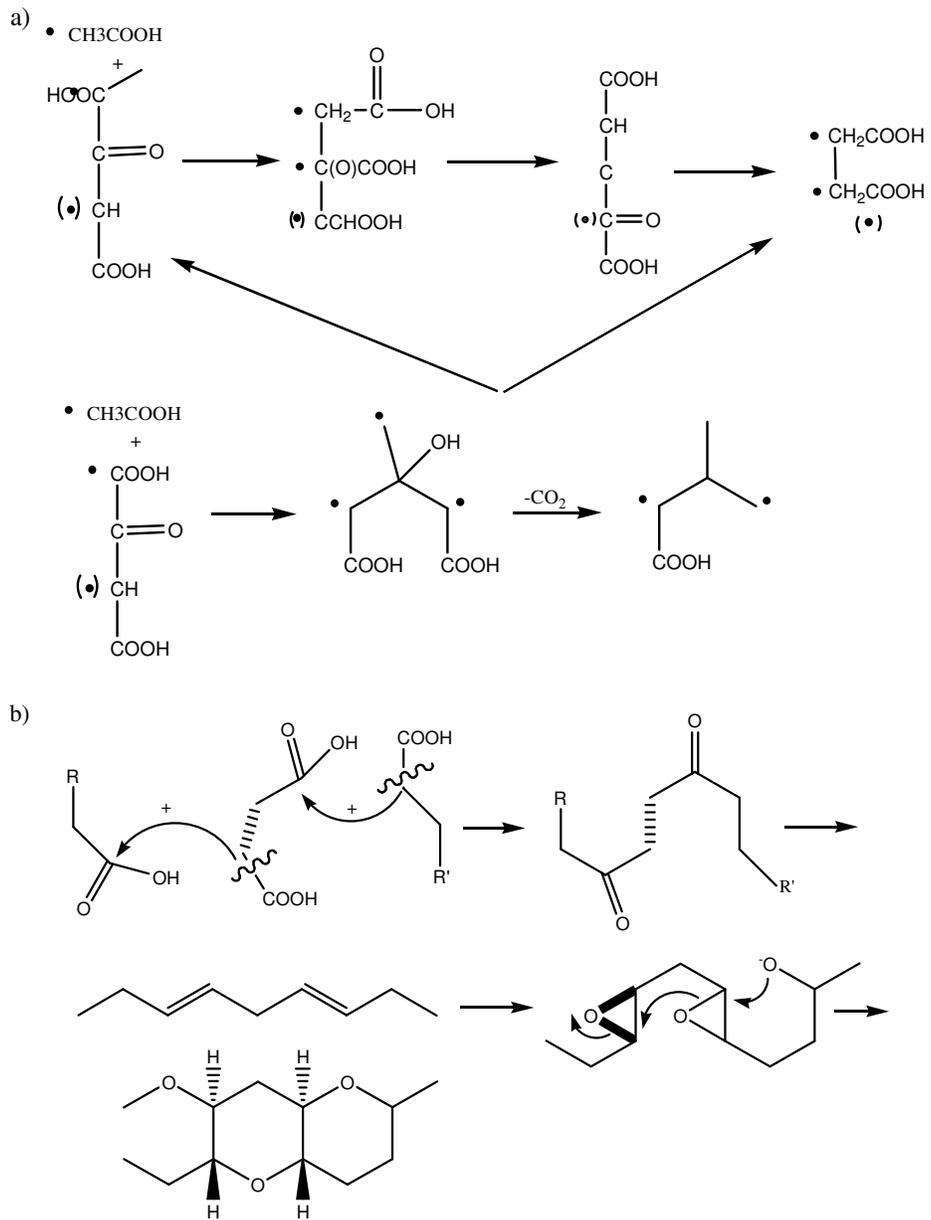


Figura 8. Incorporazione di molecole marcate di acetato nella brevittossina e ipotetiche unità costitutive della molecola.

Tuttavia, gli esperimenti condotti con acetato marcato hanno fornito dei prodotti, che non possono essere spiegati soltanto attraverso la via dell'acetogenina⁴⁰⁻⁴¹; si è pertanto concluso che l'acetato marcato viene metabolizzato nel ciclo del TCA e incorporato negli acidi bicarbossilici, prima di essere utilizzato per la biosintesi delle tossine (Schema V)⁴¹.

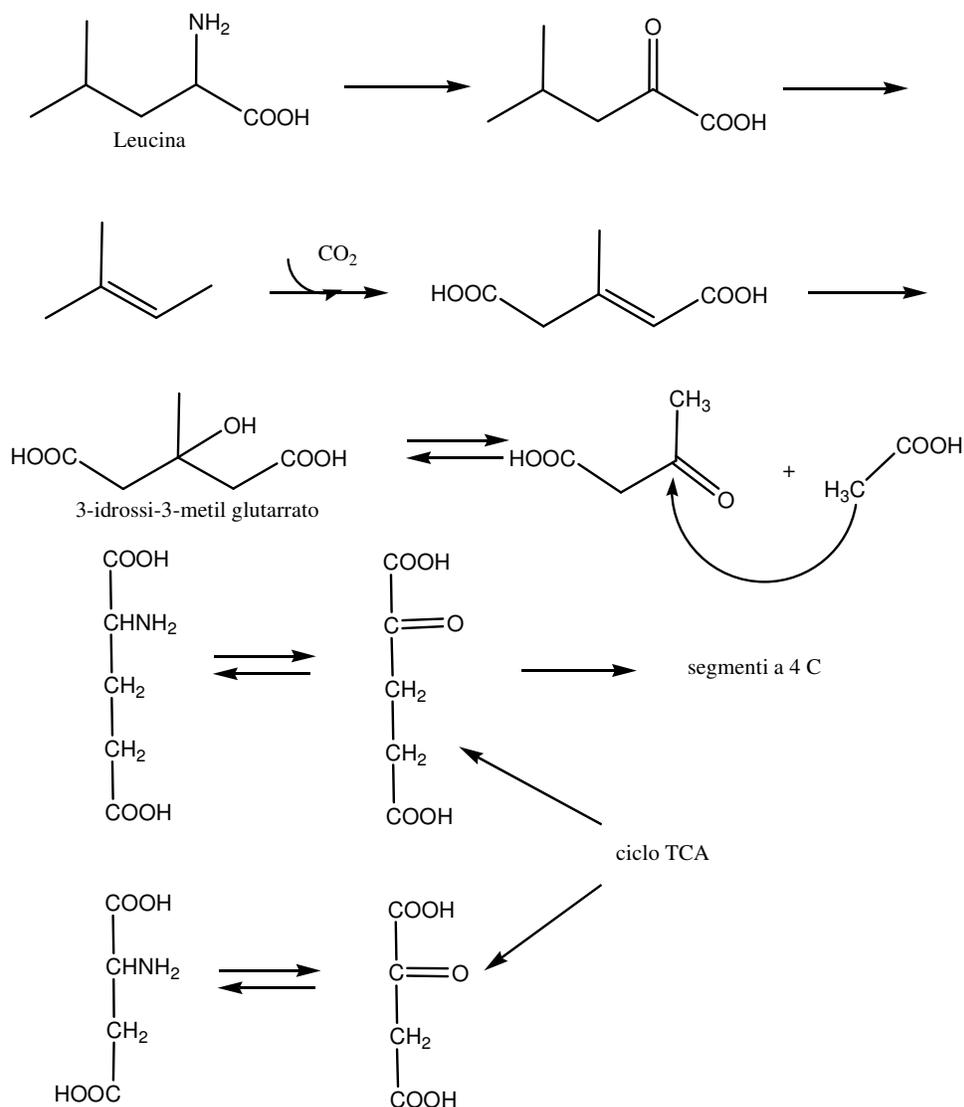


Schema V. acetato marcato negli ipotetici blocchi costitutivi della molecola (a) e il possibile meccanismo della formazione della catena carboniosa nella biosintesi della brevittossina nei dinoflagellati (b).

Va immaginata, quindi, una nuova strada biosintetica, in cui una catena carboniosa simile a quella dell'acetogenina si forma da acidi bicarbossilici C₄ e C₅ attraverso una condensazione di Claisen ad entrambe le estremità delle molecole seguita dalla decarbossilazione. Questa è una via biosintetica molto diversa dalla ben nota biosintesi dei polichetidi, che prevede la formazione della catena carboniosa attraverso la condensazione di un acetato (o malonato) o di un propionato (o metilmalonato) alla loro posizione α .

Recentemente, sulla scorta di taluni prodotti ottenuti nell'ambito di esperimenti con composti marcati, sono state sviluppate nuove teorie, secondo cui i blocchi costitutivi potrebbero derivare da aminoacidi, quali l'aspartato, il glutammato e la leucina⁴². Ad esempio, il 3-idrossi-3-metilglutarato potrebbe essere spiegato attraverso la degradazione della leucina, in aggiunta alla normale strada, che coinvolge la condensazione di tre unità di acetato (Schema VI)⁴³.

Nel caso di esperimenti condotti con [3-¹³C] e [3, 4-¹³C] leucina, la leucina veniva degradata ad acetato prima di essere utilizzata nella biosintesi delle tossine. Tale biodegradazione probabilmente avviene al di fuori della cellula e per opera di enzimi della membrana cellulare e di batteri ad essi associati. Questo riciclo dei composti organici sembra essere comune nel fitoplancton marino e potrebbe avere un ruolo determinante per spiegare la biosintesi dei metaboliti delle microalghe.



Schema VI. Plausibile strada alternativa all'HMGA, α -chetoglutarato e succinato nei dinoflagellati.

Dopo la scoperta delle brevitossine, sono stati isolati molti altri composti dallo scheletro carbonioso simile. Il più importante di questi composti è senz'altro la ciguatossina, che è stata isolata per la prima volta come principale agente tossico delle anguille ciguatossiche⁴⁴⁻⁴⁵. Si pensa che il dinoflagellato produttore sia il *Gambierdiscus toxicus* e che essa si accumuli nelle anguille attraverso la

catena alimentare. Infatti, Yasumoto et al. hanno dimostrato come le cellule del *G. toxicus* contengano composti strettamente correlati, quali il GT4b, che potrebbe essere il precursore della ciguatossina. Molti altri composti polieterei come l'acido gambierico A e C sono stati isolati in varie razze di *G. toxicus*. Sembra plausibile che tali composti siano biosintetizzati attraverso una strada simile a quella delle brevitossine.

Un'altra tossina prodotta sempre dallo stesso dinoflagellato è la maitotossina, un potente attivatore dei canali del calcio. La sua struttura è costituita da una lunga catena alchilica legata ad una metà eterea, policiclica e polidrossilata. Ciò indica che la catena carboniosa degli eteri policiclici e dei composti a lunga catena alchilica, ritrovati nei dinoflagellati, inclusi i macrolidi, abbiano la stessa via biogenetica. Le differenze strutturali sembrano derivare dai differenti modi in cui si apre la struttura epossidica.

NSP-tossine

La sindrome di avvelenamento neurotossico da molluschi indicato con la sigla NSP (*neurotoxic shellfish poisoning*) si manifesta nell'uomo con disturbi gastrointestinali e neurologici, quali gastroenteriti, prurito cutaneo, neuropatia periferica e disfunzione del sistema nervoso centrale.

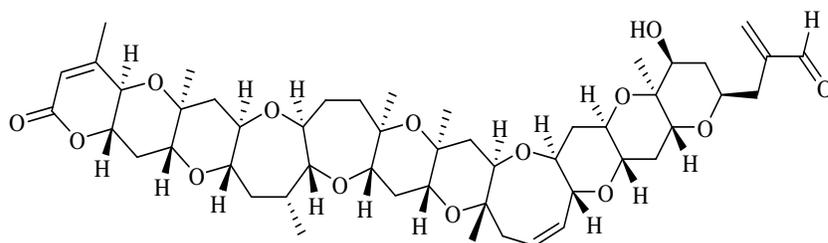
Lungo le coste della Florida e nel golfo del Messico, il dinoflagellato *Gymnodinium breve* (*Ptychodiscus brevis*) fiorisce periodicamente, causando gravi morie di pesci. Estese fioriture di questo organismo originano, infatti, le cosiddette "maree rosse" che possono uccidere fino a diverse centinaia di tonni al giorno⁴⁶. In concomitanza delle fioriture algali si possono produrre anche

irritazioni agli occhi e alla gola degli uomini, che vivono nelle zone costiere, dovute alla formazione di aerosol irritanti costituiti da cellule di *G. breve* intrappolate negli spruzzi di mare; così come occasionalmente possono manifestarsi intossicazioni alimentari nei consumatori di molluschi contaminati.

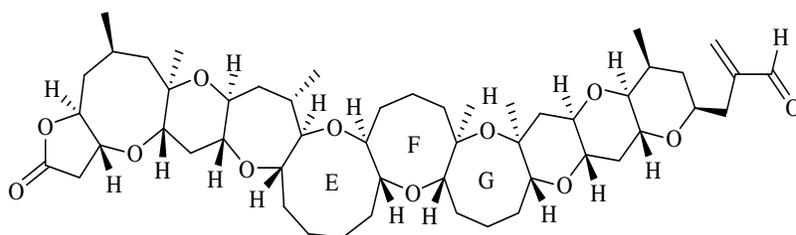
Il principio tossico, come già accennato in precedenza, è un metabolita poliossigenato scoperto nel 1981, cui si è dato il nome di brevitossina B.

La brevitossina B⁴⁷ è il primo membro di questa classe piuttosto unica di prodotti naturali, la cui caratteristica strutturale è uno scheletro di anelli polieterei *trans*-fusi.

Alla stessa classe appartiene anche la brevitossina A, che rappresenta la più potente ittiotossina prodotta dal *G. breve*⁴⁸; infatti, la sua dose letale sui pesci zebra si aggira intorno alle 3 ppb⁴⁹. La struttura della brevitossina A, come nel caso della B, è stata delucidata attraverso indagini ai raggi X³⁶; la sua peculiarità è rappresentata dall'anello presente nella porzione centrale della molecola, dove i segnali ¹H-NMR dovuti ai nuclei degli anelli E, F e G sono estremamente slargati⁵⁰. Ciò indica che nella parte centrale della molecola si verificano dei cambiamenti conformazionali a velocità comprese nella scala del tempo NMR (1-100 ms). I dati raccolti dall'indagine ai raggi X indicano che i due conformeri a carico dell'anello E sono presenti anche nello stato cristallino.



Brevitossina B



Brevitossina A

Figura 9. Struttura della Brevitossina B e della Brevitossina A.

Ad oggi sono state isolate sei brevitossine, tutte chiaramente a struttura polieterea.

Il meccanismo d'azione delle brevitossine si esplica per legame ai canali del sodio voltaggio-dipendenti (VSSC) ⁵¹⁻⁵². Inizialmente, si è osservato che la brevitossina B attivava un VSSC in cellule di un neuroblastoma in presenza di veratridina; e che tale azione era bloccata dalla tetrodotossina. Saggi di binding che prevedevano l'uso di un radioligando della brevitossina (il PbTx-3, un derivato triziato della brevitossina con una funzione aldeidica in posizione 42), hanno poi dimostrato che la brevitossina B e la tetrodotossina condividevano lo stesso sito di legame a livello del VSSC⁵³.

Ciguatera-tossine

La ciguatera è una intossicazione tipica delle regioni costiere tropicali e subtropicali, particolarmente dei Caraibi e delle isole del Pacifico. E' provocata dall'ingestione di una grande varietà di pesci che vivono in prossimità delle barriere coralline, e che occasionalmente diventano tossici. Il termine "ciguatera" deriva dal nome usato nel 18° secolo nelle Antille spagnole per una intossicazione alimentare causata dalla "cigua", un mollusco del genere *Cittarium*.

L'avvelenamento alimentare da ciguatera-tossine, come quello da brevittossine, si manifesta con sintomi neurologici, quali neuropatie periferiche e disfunzioni a livello del SNC, e gastrointestinali, come diarrea, nausea e vomito; a volte subentra anche bradicardia, ipotensione, miosi, cianosi, prostrazione, eritemi e prurito cutaneo. Un sintomo assolutamente caratteristico della ciguatera è la "sensazione da ghiaccio secco", che si manifesta con senso di calore e bruciore quando la vittima dell'intossicazione immerge le mani in acqua fredda. I sintomi dell'avvelenamento compaiono generalmente entro 12 ore dall'ingestione del pesce contaminato e scompaiono entro qualche settimana, benché talvolta qualche disturbo neurologico può persistere anche per mesi. L'intossicazione è generalmente non letale (la mortalità è inferiore allo 0.5% dei casi) e in alcune zone del Pacifico viene contratta da circa l'1% della popolazione. Attualmente non sono ancora noti antidoti.

Due gruppi distinti di tossine sono implicati nella ciguatera: la ciguatossina e i suoi congeneri, da una parte, e la maitotossina, dall'altra. Entrambi i gruppi sono prodotti dal dinoflagellato *Gambierdiscus toxicus*, trasferiti a pesci erbivori e successivamente a pesci carnivori attraverso la catena alimentare.

In questo modo i pesci più grandi e più vecchi accumulano una grande quantità di tossina, che si concentra in tutto l'organismo e soprattutto nelle interiora.

Ciguatossina.

La ciguatossina è stata per la prima volta isolata nel 1980 da Scheuer presso l'Università delle Hawaii⁵⁴ e caratterizzata come composto polietereo; tuttavia, le scarse quantità di sostanza disponibili hanno impedito la delucidazione strutturale.

Nel 1989, Yasumoto⁵⁵ ha estratto da pesci tossici (*Gymnothorax javanicus*), raccolti nelle acque della Polinesia francese, 0.36 mg di ciguatossina e 0.75 mg di un congenere (CTX 4B, precedentemente definita gambierotossina 4b) e ne ha elucidato la struttura sulla base di esperimenti di risonanza magnetica nucleare⁵⁶.

Dal 1989, gli studi sui congeneri della ciguatossina hanno avuto dei rapidi sviluppi e congeneri della ciguatossina sono stati isolati sia da pesci tossici, come la 54-deossi-ciguatossina, che da coltivazioni di *G. toxicus* come la CTX 3C⁵⁷.

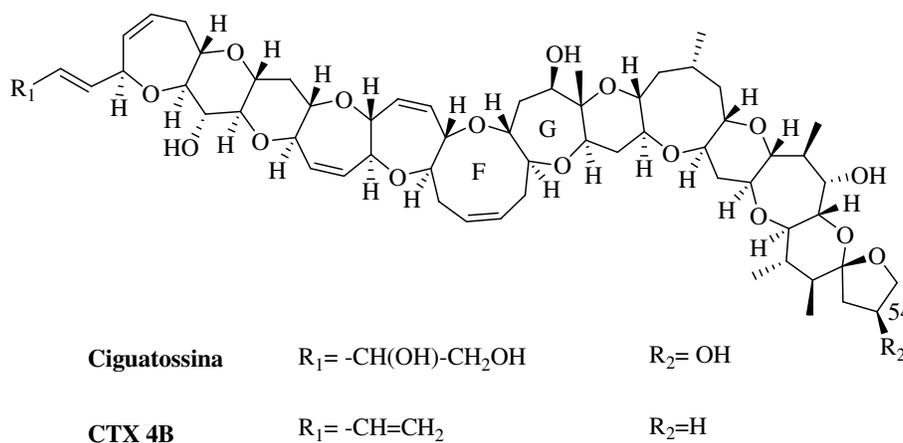


Figura 10. Struttura della Ciguatossina

Dozzine di analoghi della ciguatossina sono stati isolati da pesci e da dinoflagellati⁵⁸, ma soltanto per alcuni di essi è stata definita la struttura chimica in maniera conclusiva. In linea generale i composti più polari, e quindi più ossigenati, sono contenuti in quei pesci, quali le anguille, che vivono nelle parti alte dell'ecosistema corallino, mentre nei dinoflagellati sono presenti per lo più i composti meno polari. Infatti, la ciguatossina stessa, che è il composto più ossigenato di questa classe di tossine, è assente nei dinoflagellati.

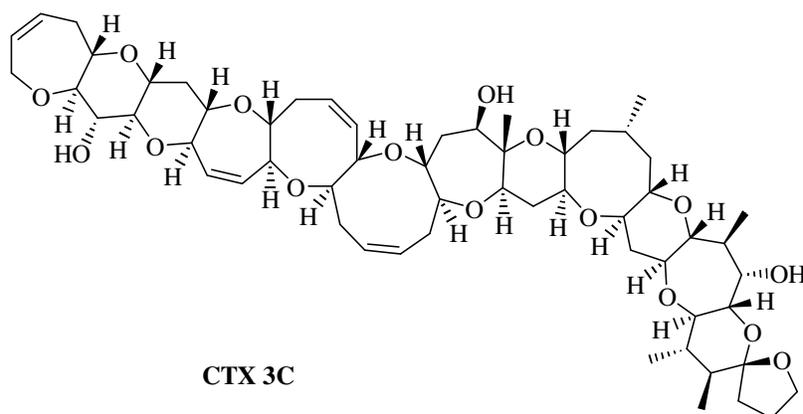


Figura 11. Struttura della CTX 3C.

Queste considerazioni suggeriscono che i congeneri meno polari prodotti dal *G. toxicus* sono i precursori delle tossine più polari ritrovate nei pesci, dove hanno luogo trasformazioni di tipo ossidativo. E' interessante notare come la tossicità dei composti ossigenati sia il più delle volte maggiore di quella dei prodotti più apolari, come accade per la ciguatossina, che presenta, per iniezione i.p. nel topo una DL₅₀ di 0,45 µg/kg, 11 volte più tossica del suo plausibile precursore, CTX 4B.

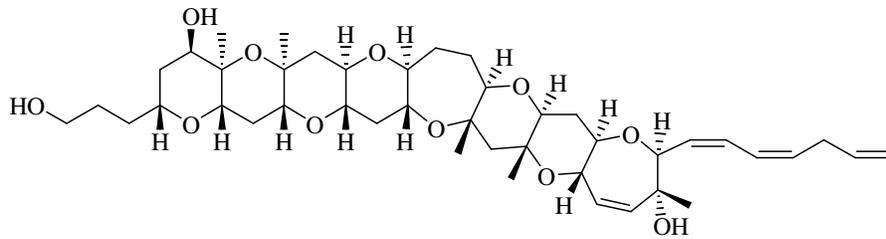
Per quanto attiene le azioni farmacologiche e tossicologiche della ciguatossina, sono stati condotti un gran numero di studi in proposito, a causa della centralità della tossina nell'ambito delle malattie umane. Inizialmente, si riteneva che la ciguatossina fosse fondamentalmente un inibitore della colina-esterasi⁵⁸; in seguito Rayner ha dimostrato che in realtà la tossina favorisce l'ingresso del sodio all'interno della cellula⁵⁹, per azione a livello dei canali del sodio voltaggio dipendenti (VSSC), così come precedentemente mostrato per le brevitossine.

Si deve notare che esistono sei gruppi di composti polieterei classificati come correlati alla brevitossina: la ciguatossina, la brevitossina-A, la brevitossina-B, l'acido gambierico-A, il gambierolo e la yessotossina. Questi composti, isolati da dinoflagellati o da molluschi che si cibano di dinoflagellati, presentano un'interessante caratteristica comune: tutti possiedono nella porzione centrale della molecola un anello a sette, otto o nove membri, che sembra subire lenti cambi conformazionali. La ciguatossina e gli acidi gambierici sono dotati di un sistema biciclico a sette e a nove termini (anelli F e G della ciguatossina)⁶⁰; mentre la brevitossina B ha un sistema biciclico costituito da due anelli a sette termini. Durante le variazioni conformazionali la molecola può ruotare intorno a una parte della sua stessa struttura, che fungerebbe da perno.

Si ritiene che questi lenti cambi conformazionali possano influenzare in qualche modo il legame al VSSC, inducendo così un'alterazione della funzionalità del canale, o eventualmente disattivandolo del tutto⁶⁰.

Composti correlati alla ciguatera.

Il gambierolo è un altro esempio di metabolita del tipo delle brevitossine prodotto dai dinoflagellati⁶¹. E' stato isolato come costituente tossico dal *G.toxicus* e mostra un'elevata tossicità su topi, in cui si manifestano i medesimi sintomi descritti per la ciguatossina



Gambierolo

Figura 12. Struttura del gambierolo

Dal mezzo di cultura del *G. toxicus* sono stati isolati anche altri potenti agenti antifungini, come gli acidi gambierici A-D⁶²⁻⁶³.

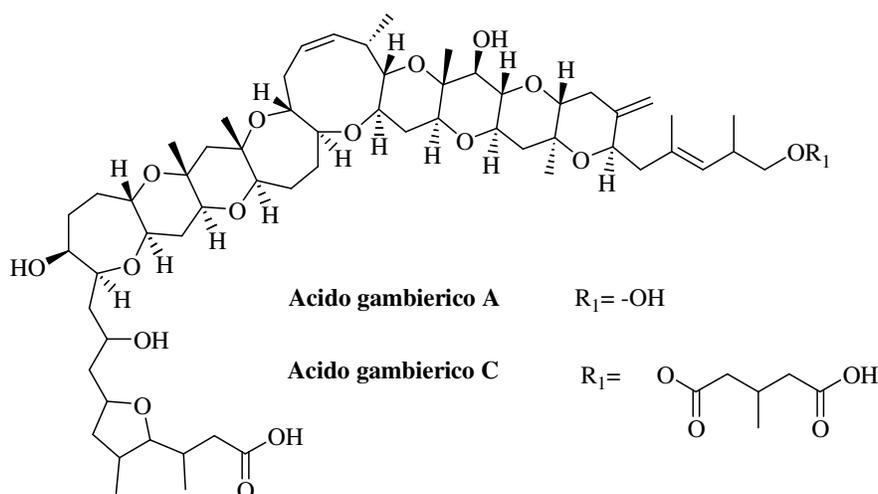


Figura 13. Struttura dell'Acido gambierico A e C

La potenza antifungina dell'acido gambierico-A eccede quella della amfotericina B di un fattore di circa 2000, rendendolo il più potente fungicida conosciuto.

Maitotossina

La maitotossina ha attratto l'attenzione dei ricercatori, in quanto presenta delle caratteristiche piuttosto insolite. In primo luogo, ha un peso molecolare, come sale disodico, di 3422 Da, che supera di gran lunga qualsiasi altro peso di prodotti naturali⁶⁴, eccezion fatta per i biopolimeri. In secondo luogo, gioca un ruolo importante nel diversificare i sintomi della ciguatera, soprattutto nell'avvelenamento causato da pesci erbivori. Infine, è dotata di una bioattività estremamente elevata. La letalità sui topi (LD_{50} è circa 50 ng/kg, ip), per esempio, suggerisce che essa potrebbe essere la più potente tossina a struttura non proteica.

Molto di recente, sulla base di estese analisi all’NMR è stata proposta la struttura totale della maitotossina⁶⁵.

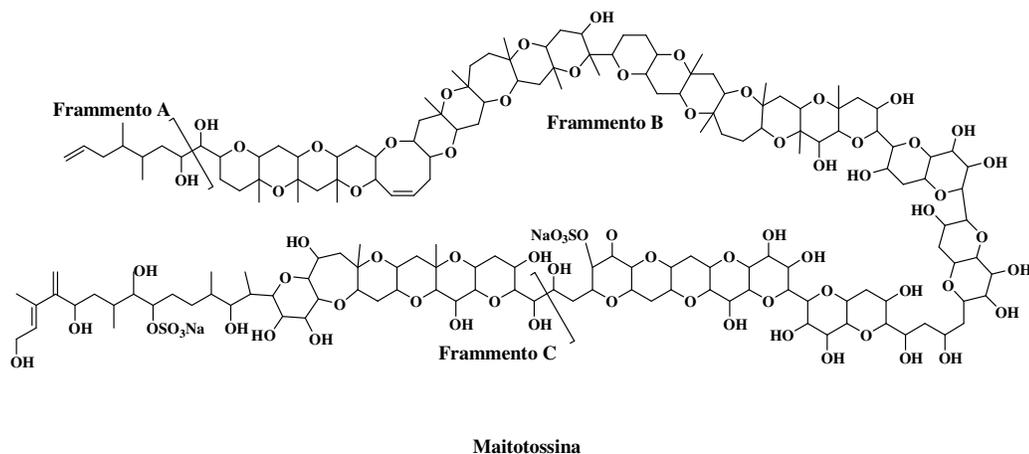


Figura 14. Struttura della Maitotossina.

La reazione della maitotossina con il periodato ha portato alla formazione di tre prodotti di degradazione (frammento A, B e C); pertanto le analisi NMR sono state eseguite sia sull’intera molecola che sui rispettivi frammenti. Tra questi ultimi, il più grande è il frammento B con un peso molecolare di 2382 Da (come sale disodico); di conseguenza la sua analisi spettroscopica era notevolmente complicata dalla presenza di ben 160 protoni, e una parte della molecola rimaneva comunque oscura, dal punto di vista strutturale.

Ulteriori informazioni sono state ottenute con esperimenti di massa/massa FAB a ioni negativi⁶⁵, che hanno rivelato in maniera inequivocabile le dimensioni di ciascun anello etero e la sequenza intorno agli eteri aciclici, formati in seguito alla degradazione con il periodato.

L'insieme delle informazioni ottenute dall'analisi dei tre frammenti ha permesso la delucidazione dell'intera struttura della maitotossina, che pertanto risulta essere un polietere dalla formula molecolare $C_{164}H_{256}O_{68}S_2Na_2$, contenente 32 anelli eterici, 28 gruppi ossidrilici e due esteri solfato.

Sono stati pubblicati più di cinquanta lavori circa la farmacologia e la biochimica della maitotossina.

Inizialmente, si riteneva che la sua principale funzione fosse quella di aumentare l'afflusso di ioni calcio. Tale azione era bloccata dall'uso del verapamil, per cui si ipotizzava un intervento al livello dei canali del calcio voltaggio-dipendenti ⁶⁶.

In seguito, sono state descritte anche altre azioni a carico della maitotossina, come la capacità di indurre contrazioni muscolari, di stimolare il rilascio di ormoni/neurotrasmettitori, di attivare la fosfolipasi C, la fosfolipasi A2 e di proteine chinasi, alcune delle quali non sembrano essere collegate semplicemente ad un aumento della concentrazione di ioni calcio ⁶⁷.

La scarsa specificità della maitotossina per i tessuti e per le linee cellulari lascia pensare che la maitotossina abbia come sito bersaglio non un recettore fisiologico, ma un componente ubiquitario della membrana cellulare.

Recenti studi elettrofisiologici hanno dimostrato che i canali attivati dalla maitotossina presentano una certa selettività ionica, viene permesso il passaggio più per il calcio che per il sodio, nel rapporto addirittura di circa 50:1⁶⁸ a favore del Ca^{2+} . E' stato anche individuato un inibitore della maitotossina, l'SK&F 96365, che agisce a livello di canali del calcio regolati da recettori; ciò lascerebbe pensare che la tossina agisca appunto su canali mediati dall'azione di recettori ⁶⁹.

Macrolidi e composti ossigenati non ciclici

I dinoflagellati producono composti polieterei e macrolidi, che sono molto simili agli antibiotici macrolidici prodotti dagli streptomiceti. Il primo gruppo è rappresentato dall'acido okadaico, un potente inibitore della fosfatasi⁷⁰⁻⁷¹; il secondo include una serie di composti citotossici, come gli anfidinolidi, che sono prodotti dal *Amphidinium* spp.⁷², il prorocentrolide riscontrato nel *Prorocentrum lima*⁷³, e la goniodomina A, un potente antifungino biosintetizzato dal *Goniiodoma* spp⁷⁴ (figura 15).

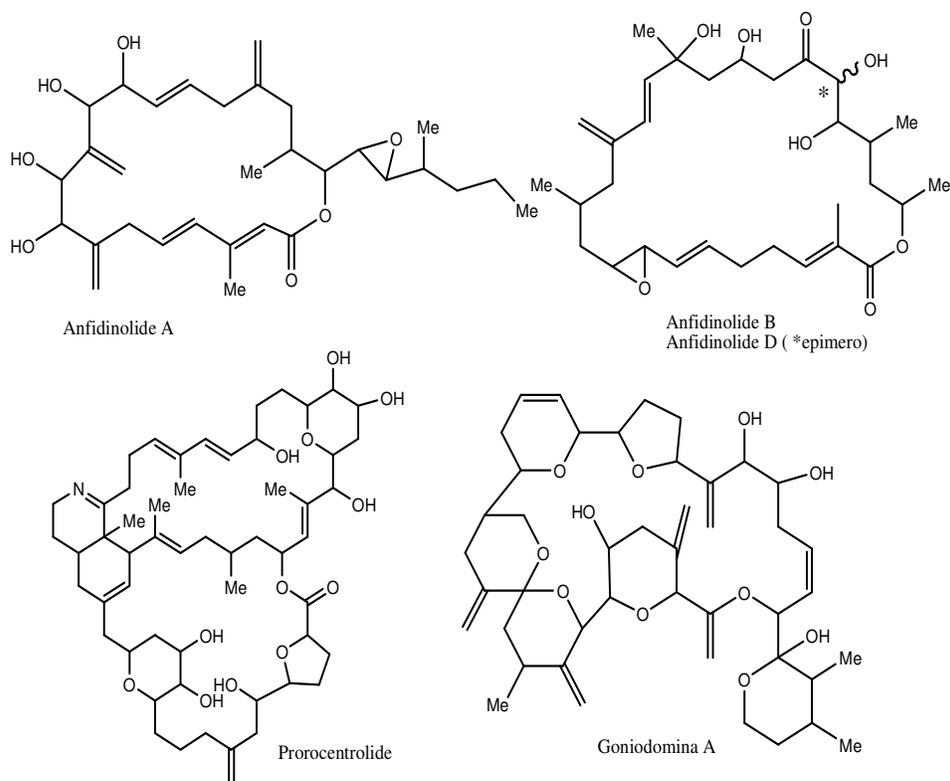


Figura 15. Composti macrolidici dei dinoflagellati

L'acido okadaico è stato isolato per la prima volta dalla spugna marina *Halichondria okadaei*⁷⁵, in seguito dalle colture di dinoflagellati *P. lima*⁷⁶ e *P.*

*concovum*⁷⁷, e successivamente dalle cellule di *Dinophysis spp*⁷⁸. A questo gruppo appartengono anche la acantiofolicina, ritrovata nella spugna *Pandoras acanthifolium*⁷⁹, e le dinofisistossine, isolate dai molluschi.

Non si sa bene se alcuni di questi composti siano i prodotti diretti dei dinoflagellati o se subiscano delle modificazioni strutturali all'interno degli invertebrati. Comunque, la dinofisistossina 1, che è un omologo dell'acido okadaico, è stata identificata all'interno delle colture di *Dinophysis spp.* e di *Prorocentrum lima*⁸⁰.

In ogni caso, sebbene la struttura di questi composti ricordi molto quella dei macrolidi prodotti dagli streptomiceti e dai funghi, la loro origine biosintetica sembra essere molto diversa, così come accade per i metaboliti del tipo della brevitossina.

Infatti, Yasumoto et a., fornendo acetato marcato con ¹³C a colture di *P. lima*, hanno isolato l'acido okadaico e il proocentrolide, con atomi marcati in posizioni non spiegabili in base al semplice processo di condensazione di unità di acetato. Il prodotto osservato è molto simile a quello osservato nello studio della biosintesi della brevitossina; il che suggerisce che la formazione della catena carboniosa includa delle unità dicarbossiliche.

E' di estremo interesse che i dinoflagellati sintetizzino polichetidi in modi differenti, quasi derivassero da differenti pianeti. La loro biochimica è probabilmente dovuta all'unicità del loro ambiente di vita, che li ha costretti ad adottare vie biosintetiche diverse, al fine di sfruttare i composti maggiormente disponibili.

L'acido okadaico è il capostipite di una classe di tossine, che va sotto il nome di DSP (*diarrhetic shellfish poisoning*)⁸¹.

DSP-tossine

L'avvelenamento diarroico da molluschi indicato con la sigla DSP è una malattia causata, come già accennato, da tossine polieteree prodotte da dinoflagellati e accumulate in molluschi, quali mitili, pettini, ostriche e bivalvi in genere.

L'intossicazione, in genere, si manifesta con diarrea, nausea e mal di stomaco; il recupero avviene in genere entro tre giorni senza seri effetti prolungati. Nonostante i sintomi relativamente deboli, è necessario prestare notevole attenzione a queste tossine, in quanto alcune di esse sono dotate di una potente attività *tumor promoting*⁸².

Avvelenamenti DSP sono segnalati praticamente in tutto il mondo, ma sono più frequenti in Giappone e in Europa, dove le coltivazioni di molluschi sono molto diffuse.

In ogni modo, raccogliendo tutti i dati relativi alla distribuzione delle DSP-tossine nel mondo, si è riusciti ad avere un quadro piuttosto completo della loro diffusione, secondo quanto riportato nella seguente tabella:

Tabella 2: Distribuzione geografica delle tossine DSP.

TOSSINA	MOLLUSCHI	AREA
Acido Okadaico	mitili	Olanda
	mitili	Francia
	mitili	Svezia
	mitili	Spagna
	mitili	Norvegia
	mitili	Italia (Adriatico)
Dinofisistossina 1	mitili	Giappone
	mitili	Norvegia
	pettini	Giappone
Dinofisistossina 2	mitili	Irlanda
Dinofisistossina 3	pettini	Giappone

L'indagine scientifica su questo tipo di avvelenamento è iniziata nel 1978, quando Yasumoto et al. capirono che le frequenti gastroenteriti, che si avevano nelle regioni nord-orientali del Giappone dopo ingestione di molluschi in primavera inoltrata e in estate, non erano dovute ai ben noti batteri patogeni, ma a tossine solubili in acetone e presenti nelle ghiandole digestive dei molluschi stessi.

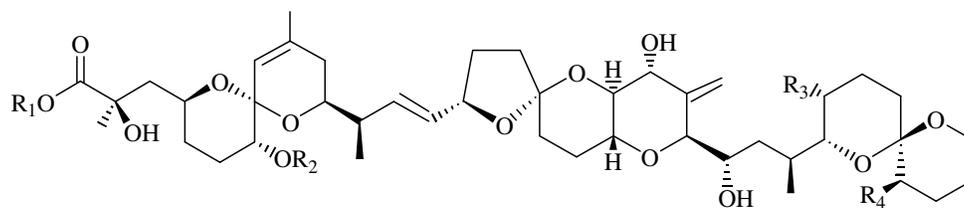
Benché durante il periodo di infestazione non si registrassero maree rosse, la variazione regionale e stagionale di tale tossicità ne suggerì l'origine planctonica. Questa ipotesi fu successivamente confermata da analisi delle popolazioni planctoniche in relazione alla tossicità dei molluschi e da analisi chimiche molto sofisticate condotte sui dinoflagellati raccolti. Si stabilì pertanto che il dinoflagellato *Dinophysis fortii*⁸³ fosse responsabile delle tossine trasmesse ai molluschi, che divenivano tossici anche in presenza di una densità cellulare bassissima di dinoflagellato (200 cellule per litro).

A differenza della PSP, la DSP non appare essere letale, ma la sua ampia distribuzione e l'azione di *tumor promoter* ritrovata in alcune tossine rende questo tipo di avvelenamento di eccezionale rilievo sanitario.

Acido okadaico e suoi derivati

Il primo composto tossico isolato da alcuni mitili avvelenati è stato la DTX 1 (acido 35-(R)-metilokadaico)⁸⁴, che è strutturalmente molto simile all'acido okadaico, un derivato polietereo di un acido grasso a 38 atomi di carbonio, isolato per la prima volta da una spugna da Tachibana⁸⁵. Successivamente sono stati isolati altri composti ad attività DSP, tra cui anche l'acido okadaico stesso, che è risultato essere una delle tossine più diffuse.

Oltre alla DTX 1 e all'acido okadaico sono state isolate anche la DTX 2 (acido 31-demetil-35-metilokadaico) e la DTX 3 (acido 7-O-acil-35-(R)-metilokadaico)⁸⁶. Mentre, l'acido okadaico, la DTX 1 e la DTX 2 inibiscono la fosfatasi proteinica 2A (PP2A), la DTX 3 non la inibisce, ma viene facilmente idrolizzata in DTX 1 da un enzima digestivo, quale la lipasi. Inoltre, l'acido okadaico e la DTX 1 sono stati confermati nel *Dinophysis fortii* e nel *D. acuminata*, la DTX 2 nel *D. acuta*, e la DTX 3 sembra essere invece un prodotto del metabolismo dei molluschi. Lo studio dell'origine di queste tossine non è comunque agevole, in quanto i *Dinophysis* non sono coltivabili in laboratorio e pertanto la loro tossigenicità è stata dimostrata, individuando le tossine in campioni di cellule prelevate in mare aperto. Tale sistema di prelievo, però, consente l'isolamento di quantità minime di tossine, che possono essere evidenziate soltanto mediante sistemi di analisi chimica molto sofisticati.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Acido okadaico (OA)	H	H	CH ₃	H
DTX 1	H	H	CH ₃	CH ₃
DTX 2	H	H	H	CH ₃
DTX 3	H	COCH ₃	H	CH ₃

Figura 15. Struttura dell'acido okadaico e delle DTX.

In materiali biologici diversi dai molluschi sono stati ritrovati anche il 2-deossi acido okadaico, il 7-deossi acido okadaico, il 14-15 deidro acido okadaico, il 9-10 episolfuro acido okadaico, gli esteri dell'acido okadaico e la DTX 4, ma la loro inclusione nella classe delle DSP è ancora da confermare.

Bisogna, infine, osservare che questi composti polieterei non si ritrovano tutti insieme negli stessi molluschi, ad esempio se l'acido okadaico è la DSP-tossina più diffusa lungo le coste europee, la DTX 1 è la principale tossina dei

mitili giapponesi. Del resto va sottolineato anche che le quantità relative delle tossine variano da regione a regione e da annata ad annata.

La diarrogenicità dell'acido okadaico e dei suoi derivati è stata dimostrata per la prima volta da Harnano nel 1986; successivamente Terao ha provato che la DTX 1 causa notevoli danni alla mucosa intestinale.

In ogni modo, per quanto riguarda il meccanismo d'azione dell'acido okadaico, si è evidenziato che esso provoca contrazioni di lunga durata nella muscolatura liscia vascolare; ciò accade senza l'intervento di neurotrasmettitori, infatti l'adrenalina e l'acetilcolina non influenzano l'azione dell'acido okadaico⁸⁷.

Molto recentemente è stato anche accertato che queste tossine siano dei potenti *tumor-promoters*⁸⁸. *Tumor promotion* e *tumor promoter* sono espressioni usate nella carcinogenesi chimica, che si articola in due fasi: uno stadio di inizio e uno di sviluppo e promozione del tumore⁸⁹. Normalmente l'inizio è causato dall'applicazione di un carcinogeno, che induce un danno irreversibile al DNA.

Tutti gli agenti che sviluppano la carcinogenesi in una cellula già attaccata dal carcinogeno sono definiti *tumor promoters*⁹⁰. Il trattamento di tessuti con un iniziatore, seguito da ripetute applicazioni di un *tumor promoter* genera tumori con altissima probabilità; un *tumor promoter*, invece, o un iniziatore da soli non danno vita ad alcun carcinoma.

Il concetto di carcinogenesi a due stadi viene ora accettato come operante nella formazione di tumori in vari organi dell'uomo. Il primo *tumor promoter* ben studiato è stato il TPA (20-tetradecanoilforbol-3-acetato), un terpenoide isolato da *Euforbiaceae*⁹¹. Successivamente diversi altri *tumor promoters* sono stati individuati e studiati.

Nel 1988 l'acido okadaico e la DTX 1 sono stati ritenuti per la prima volta responsabili della promozione del tumore sulla pelle di ratto⁹². In seguito è stato ritrovato anche che l'acido okadaico nell'acqua potabile induce la formazione di tumori nello stomaco di ratti⁹³.

Ultimamente studi farmacologici accurati hanno persino proposto un meccanismo d'azione per l'acido okadaico e per i suoi derivati. Si tratta di una inattivazione della funzione del gene soppressore del tumore, non come generalmente avviene attraverso una cancellazione o una mutazione, ma attraverso una iperfosforilazione, soprattutto a livello di residui di serina e di treonina, del *tumor suppressor gene product*, dovuta all'inibizione di alcune fosfatasi. Probabilmente ciò determina un accumulo di proteine fosforilate, che sono poi coinvolte nella promozione del tumore.

Sueoka e Fujiki hanno studiato a lungo il meccanismo d'azione dell'acido okadaico, e sono giunti alla conclusione che il TNF-a, una citochina infiammatoria, si comporta nell'organismo umano anche da *tumor promoter*. Inoltre, sia il TPA che l'acido okadaico sembrano favorire l'espressione dell'mRNA del TNF-a nella pelle di topi, in seguito ad applicazioni locali; inoltre, l'acido okadaico ne favorisce l'espressione anche nelle ghiandole gastriche dopo l'assunzione per via orale. Quindi, si potrebbe essere di fronte ad una nuova via di promozione di tumori, mediata dal TNF-a.

Dal momento in cui è stato scoperto che l'acido okadaico è un inibitore delle fosfatasi, sono stati condotti numerosi studi biochimici e farmacologici, che attualmente sembrano provare che tutte le attività biologiche di questa tossina siano collegate all'inibizione delle fosfatasi. Secondo la classificazione di Cohen

esistono diversi gruppi di fosfatasi; l'acido okadaico inibisce la PP2A a concentrazioni molto basse (K_i di 30 pM), la PP1 a concentrazioni leggermente più alte, la PP2B a concentrazioni piuttosto elevate, mentre non produce nessun effetto sulla PP2C.

Diversi gruppi di ricerca hanno anche compiuto degli studi sulla relazione struttura-attività dell'acido okadaico⁹⁴. I dati raccolti mostrano come un'alterazione del C-1 carbossilico o del gruppo OH in 24 determini una forte riduzione dell'attività. Altri cambi strutturali, come l'idrogenazione del doppio legame in posizione 14 o la riduzione del C-2, producono comunque una riduzione dell'attività, probabilmente a causa di un'alterazione a carico della conformazione pseudociclica della molecola stessa. Infatti, tale conformazione è dovuta essenzialmente all'interazione tra il C-1 carbossilico e l'ossidrile in 24.

Pectenotossine (PTXs).

La pectenotossina 1 è stata isolata per la prima volta dai pettini *Patinopecten yessoensis*, raccolti nelle regioni nord-orientali del Giappone⁹⁵. La struttura polieterea caratterizzata dalla presenza di una funzione lattonica è stata delucidata attraverso estese analisi di cristallografia ai raggi X⁹⁶. Esistono diversi omologhi della PTX 1, che presentano tutti i diversi stadi di ossidazione del sostituente in posizione 18 da metile ad acido carbossilico: la PTX 2 presenta un metile; la PTX 1, la PTX 4 e la PTX5 un idrossimetile; la PTX 3 un formile, la PTX 6 e la PTX 7 una funzione carbossilica.

Sono stati identificati numerosi analoghi delle pectenotossine, ma bisogna tener presente che riarrangiamenti degli spirocomposti avvengono con relativa

facilità in condizioni acide, per cui l'elevato numero di analoghi delle PTXs potrebbe essere dovuto ad artefatti di laboratorio.

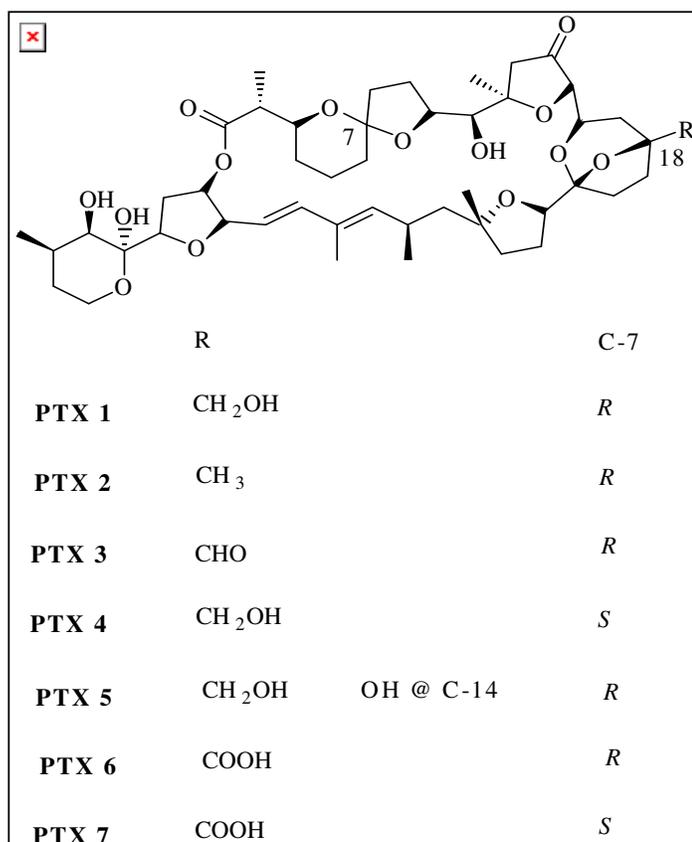


Figura 16. Struttura delle Pectenotossine.

L'origine delle pectenotossine, è attribuita al *Dinophysis fortii*, che produce la PTX 2 e al *Dinophysis acuta* che sintetizza l'acido secoico, un lattone idrolizzato della PTX 2. La PTX2 è ritenuta il precursore delle altre pectenotossine attraverso processi di botrasformazione ad opera dei bivalvi.

Tabella 3. Tossicità delle PTXs espresse come mortalità del topo per i.p. in mg/kg⁹⁷:

LD₅₀	mg/Kg
PTX1	0,25
PTX2	0,33
PTX3	0,35
PTX4	0,77
PTX6	0,50
PTX7	>5,0
PTX8	>5,0
PTX9	>5,0

Le pectenotossine, insieme alle YTX, sono state a lungo incluse nella classe delle DSP-tossine, in quanto venivano coestratte dalle digestive dei molluschi insieme all'acido okadaico, sebbene non presentassero né disturbi gastro-intestinali, né evidenze di attività *tumor promoter*. Studi compiuti su molecole purificate hanno messo in evidenza una forte epatotossicità, dovuta a una rapida necrosi degli epatociti. Inoltre, l'azione patologica delle pectenotossine è stata correlata a quella della falloidina⁹⁸, che causa anche seri danni alle cellule dello stomaco mediante rilascio di ioni potassio e enzimi litici..

Yessotossine (YTXs).

La yessotossina⁹⁹⁻¹⁰⁰ è un polietere costituito da 11 anelli eteri *trans*-fusi, una catena terminale a 9 atomi di carbonio e due gruppi alcolici solfatati. E' stata isolata per la prima volta dai pettini, e la sua origine è rimasta per lungo tempo piuttosto oscura. Solo recentemente sono stati individuati gli organismi produttori della YTX nei dinoflagellati *Protoceratium reticulatum*¹⁰¹ e *Lingulodinium polyedrum*¹⁰²⁻¹⁰³.

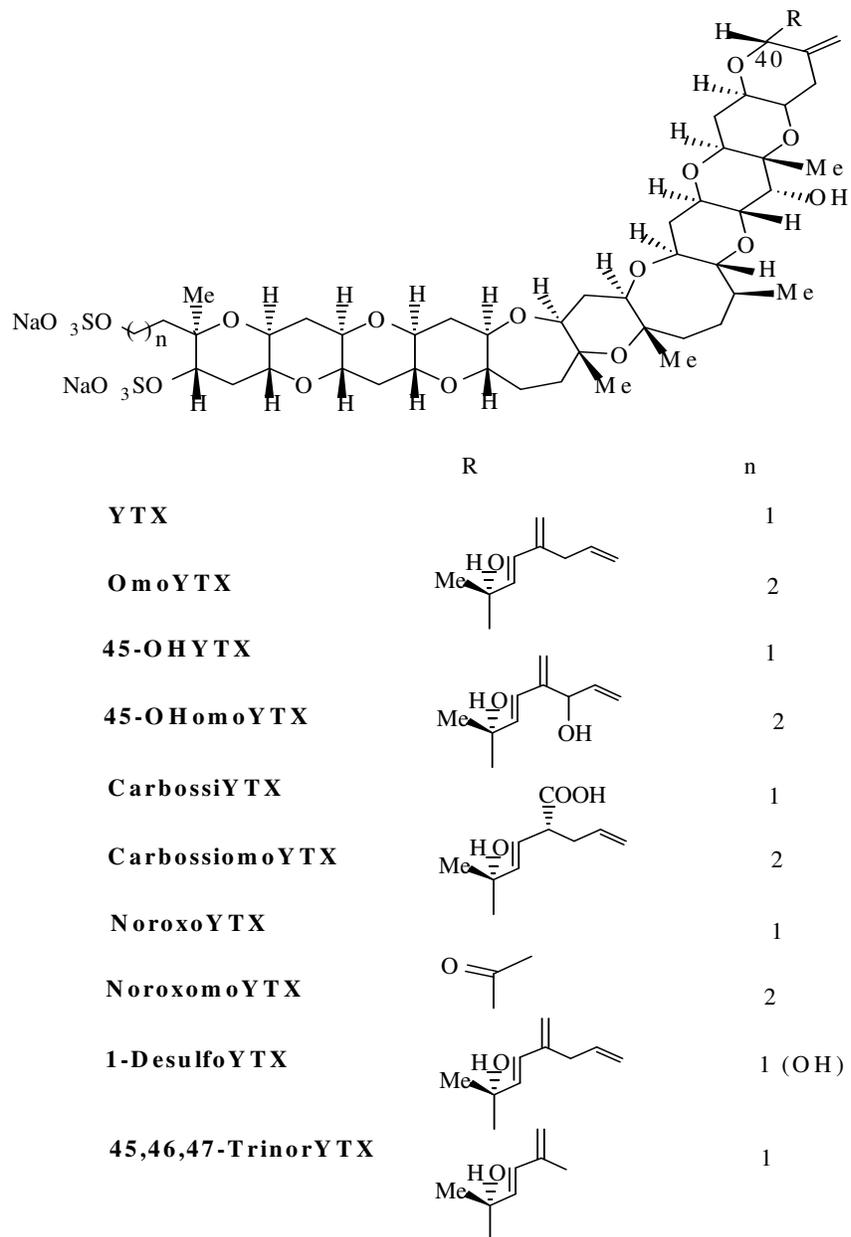


Figura 17. Struttura delle Yessotossine e analoghi.

Esistono analoghi della yessotossina che presentano modifiche nella catena laterale della porzione orientale della molecola.

Altri derivati, invece, presentano un metilene in più nella catena laterale della porzione occidentale della molecola e sono definiti omoyessotossine. Mentre la 45-OHYTX, la 45-OHomoYTX, la 45,46,47-trinorYTX, la 1-desulfoYTX sono stati isolati in tutto il mondo¹⁰⁴, la noroxomoYTX, l'adriatossina, la carbossiYTX ed il suo omoderivato sono stati isolati da *Mytilus galloprovincialis*¹⁰⁵ e caratterizzati dal gruppo di ricerca del prof Fattorusso, presso cui ho svolto il corso di dottorato, e per ora sembrano essere tipici dei mitili del Mar Adriatico.

Recentemente alla famiglia delle YTXs si sono aggiunti numerosi analoghi isolati e caratterizzati da colture cellulari di *Protoceratium reticulatum* e da *Mytilus galloprovincialis*.

L'inclusione delle YTXs nella classe delle DSP è stata a lungo una questione controversa, poiché queste tossine non provocano disturbi gastrointestinali e diarrea e sono molto meno tossiche rispetto all'acido okadaico e alla DTX 1, se somministrate per via orale, in quantità di 1 mg/Kg. Tuttavia iniettate per via intraperitoneale su topi maschi del peso di circa 20 g presentano una tossicità ben più elevata delle altre tossine DSP. Infatti, la dose letale 50 (DL₅₀) della YTX si aggira intorno ai 100 µg/Kg, laddove quella dell'acido okadaico è circa 192 µg/Kg e quella della PTX 2 260 µg/Kg. Prima, però, di poter concludere che la yessotossina non fosse coinvolta in avvelenamenti di tipo alimentare, per la trascurabile tossicità per via orale, sono stati necessari approfonditi studi istopatologici¹⁰⁶. Analisi istologiche hanno dimostrato che uno

degli organi bersaglio della YTX è senz'altro il cuore, dove sono stati evidenziati edemi e numerosi punti necrotici.

Le yessotossine sono letali per il topo per iniezione intraperitoneale ma in maniera differente in relazione alla struttura molecolare come mostrato dai valori delle DL₅₀ espresse in mg/kg di seguito riportate⁹⁷:

Tabella 4: Tossicità delle YTXs espresse come mortalità del topo per i.p. in mg/kg⁹⁷:

LD₅₀	mg/Kg
YTX	0,10
45-OHYTX	0,50
1-desulfoYTX	0,50
omoYTX	0,10
45-OHomoYTX	0,50
norYTX	0,22
ATX	>0,10
carbossiYTX	0,50

Le discrepanze tossicologiche che mostrano le yessotossine somministrate al topo per via intraperitoneale e per via orale potrebbero essere dovute al fatto che i gruppi solfati ne riducono l'assorbimento nel tratto digestivo. Il *Not Observed Adverse Effect Level (NOAEL)* ricavato dal topo per somministrazione orale di YTX è stimato in 1000 mg/Kg su parte edibile. Applicando a questo un fattore di 100, per estrapolare dati ottenuti dalla sperimentazione animale e riportarli all'uomo, si ottiene un valore di tossicità acuta di 10 mg/Kg su parte edule. Per verificare se le yessotossine potevano avere effetti citotossici, in seguito a somministrazione intraperitoneale di yessotossina sul topo sono stati osservati i possibili effetti su cellule di tessuti di diversi organi tra cui intestino, stomaco, fegato e cuore. All'osservazione con microscopia ottica ed elettronica si

è visto che, nè la yessotossina, nè i suoi derivati provocano evidenti danni permanenti all'epitelio gastrointestinale o lesioni epatiche. Invece, si sono riscontrate lievi alterazioni morfologiche al livello delle cellule del miocardio riscontrabili solo al microscopio elettronico. Inoltre, studi recenti¹⁰⁷ hanno dimostrato che la yessotossina e l'acido okadaico possono intervenire nel ciclo cellulare di cellule di mammifero promovendo dei processi apoptotici. L'apoptosi, o morte cellulare programmata, è un complesso processo che permette, a una cellula e, in seguito, a un gruppo di cellule, di autodistruggersi bloccando i meccanismi di replicazione cellulare. L'apoptosi è la manifestazione fenotipica di un'informazione genetica che viene espressa solo in certe situazioni come l'esposizione della cellula a elementi nocivi oppure durante la trasformazione o il differenziamento di un tessuto. La cellula in fase apoptotica manifesta dei cambiamenti morfologici e molecolari, e proprio analizzando tali cambiamenti manifestati da cellule di mammifero in coltura esposte a YTX (potenziale della membrana mitocondriale e la concentrazione totale di acido nucleico che presentano valori diversi in cellule normali e in cellule apoptotiche) è stato possibile dimostrare l'induzione di apoptosi.

La yessotossina contribuisce a scatenare la morte cellulare perché sembra poter attivare delle proteasi della famiglia delle caspasi in particolare la caspasi 2.

Si ottiene lo stesso risultato somministrando acido okadaico, ma l'effetto citotossico indotto da yessotossina è provocato da dosi più basse, e avviene in tempi più brevi che con l'acido okadaico. Comunque il meccanismo attraverso il quale yessotossina e acido okadaico attivano la caspasi non è ancora stato dimostrato¹⁰⁸.

Considerando poi la forte somiglianza strutturale con le brevetossine, si ipotizza che la yessotossina agisca a livello del sistema nervoso, comportandosi da agente depolarizzante, favorendo, quindi, un forte afflusso di ioni sodio all'interno della cellula. Tale somiglianza con le brevetossine fa pensare anche ad una possibile attività ittiotossica; tuttavia, dopo aver esposto dei pesci a una soluzione di 1 ppm e di 0.5 ppm di yessotossina, nessuno di essi è morto nell'arco delle 24 ore⁹⁴.

La presenza di due gruppi solfato nella molecola suggerisce una possibile attività emolitica, come nel caso dell'anfidinolide e della maitotossina; ma alla concentrazione di 50 ppm non è stata registrata alcun processo emolitico¹⁰⁶.

Studi antimicrobici hanno evidenziato una forte inibizione della crescita di funghi e di lieviti, ma non di batteri; la potenza della yessotossina (10-50 µg/disco) è comparabile a quella della anfotericina B¹⁰⁶.

Sulla YTX, sono stati anche eseguiti esami tesi a valutare la sua capacità di inibire la fosfatasi PP2A e le proprietà citotossiche: i risultati di tali ricerche mostrano che rispetto all'acido okadaico la IC₅₀ relativa alla PP2A della YTX è di 0.36 mg/ml; la potenza inibente della yessotossina è, dunque, inferiore di circa quattro ordini di grandezza rispetto a quella dell'acido okadaico. Per quanto riguarda poi l'attività citotossica su epatociti, questa è risultata tre volte inferiore rispetto a quella dell'acido okadaico¹⁰⁶.

Analizzando, dunque, le proprietà farmacologiche della yessotossina, e confrontandole con quelle dell'acido okadaico e delle DTX, risulta evidente l'impossibilità del suo inserimento nella classe delle DSP-tossine, come avveniva in passato. Studi tossicologici tesi a chiarire la sua attività all'interno

dell'organismo umano sono assolutamente necessari, ma fortemente condizionati dalla scarsa disponibilità di campioni purificati.

Palitossina

La palitossina, isolata da alcuni celenterati appartenenti al genere *Palythoa* (Zoantidi) è un potentissimo veleno (la dose letale per i topi è 0.5 µg/Kg), ed è il prodotto naturale strutturalmente più complesso finora ritrovato. La determinazione della struttura della palitossina, isolata per la prima volta dal gruppo Scheuer ad Honolulu nel 1971¹⁰⁹, è stata un problema che ha richiesto il lavoro di circa un ventennio di validissimi gruppi di ricerca dell'Università di Honolulu e Harvard in USA e di Shizuoka e Nagoya in Giappone¹¹⁰. Anche tutta la sua stereochimica è stata rigorosamente determinata, mediante comparazione di frammenti sintetici con il prodotto naturale. La palitossina è stato anche il più grande prodotto naturale con il suo peso molecolare di 2677 Da (C₁₂₉H₂₂₃O₅₄N₃), prima che venisse scoperta la maitotossina.

La palitossina e i suoi analoghi non sono stati ritrovati solo nei coralli *Palythoa*, ma anche in una grande varietà di altri organismi come nell'alga *Chondria armata*¹¹¹, nei granchi appartenenti al genere *Demania* e *Lophozozymus*¹¹² e nel pesce grilletto *Melichtys vidua*¹¹³.

Il rischio che tale tossina possa trasferirsi dagli zoantidi a pesci comunemente usati nell'alimentazione umana è comunque molto basso; soltanto occasionalmente, infatti, è stata segnalata la sua presenza in pesci e molluschi eduli raccolti nel Pacifico, lungo la costa del Giappone, delle Filippine e di Singapore.

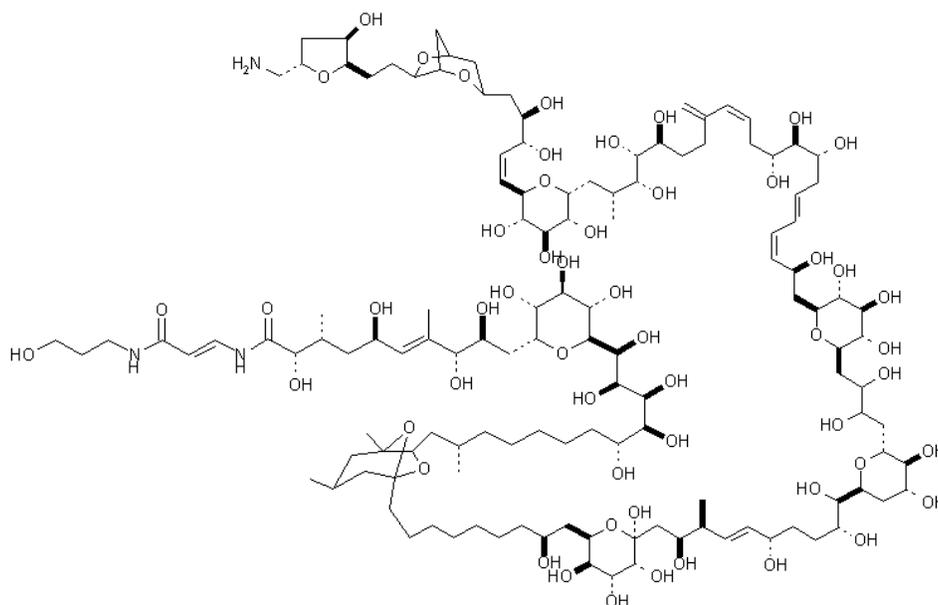


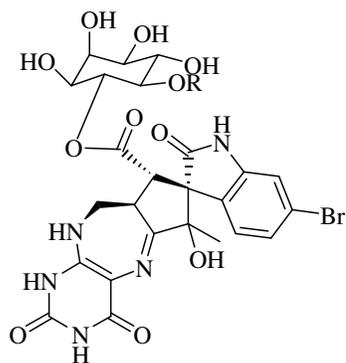
Figura 18. Struttura della Palitossina.

Sono state effettuate numerose ricerche farmacologiche e biochimiche sulla palitossina¹¹⁴, come quelle relative alla depolarizzazione della membrana cellulare, all'afflusso di ioni sodio e calcio, alla stimolazione del rilascio dell'acido arachidonico e di neurotrasmettitori, all'inibizione dell'enzima Na^+/K^+ -ATPasi, all'induzione della contrazione della muscolatura liscia, all'attività *tumor-promoting*, etc.

Se da un lato è stato proposto che la palitossina agisca attraverso l'enzima Na^+/K^+ -ATPasi¹¹⁴, il meccanismo dettagliato di come ciò avvenga è ancora poco chiaro, così come non è ancora del tutto noto il suo principale meccanismo d'azione, che genera vari effetti biologici sull'organismo.

Neosurugatossina e Prosurugatossina

La conchiglia d'avorio *Babylonia japonica*, largamente usata in Giappone, ha causato numerose intossicazioni, i cui sintomi sono disfunzioni della vista, come la perdita della visione, enormi dilatazioni della pupilla, sete, intorpidimento delle labbra, difficoltà nella pronuncia, costipazione e disuria. Le tossine responsabili, denominate neosurugatossina e prosurugatossina, sono state isolate dalle ghiandole digestive della conchiglia e la loro struttura è stata definita anche attraverso studi sintetici



Neosurugatossina R= β -xilosio

Prosurugatossina R= H

Figura 19. Struttura della Neosurugatossina e della Prosurugatossina.

La surugatossina, che si credeva fosse un'ulteriore tossina appartenente a questa classe di composti, è in realtà un artefatto prodotto durante i processi di purificazione¹¹⁵.

In ogni caso, anche per quanto attiene queste due tossine, si è suggerita un'origine esogena, dal momento che gli organismi produttori potrebbero essere dei batteri appartenenti al gruppo dei *Coryneformi*¹¹⁶.

Entrambe le tossine sono circa 5000 volte più attive come bloccanti gangliari di qualsiasi altro farmaco attualmente conosciuto, come la mecamilamina o l'esametonio. Il loro meccanismo d'azione prevede un blocco specifico dei recettori nicotinici gangliari; e pertanto la neosurugatosina e la prosurugatosina rappresentano degli ottimi strumenti da utilizzare negli studi sulla neurotrasmissione e sul cervello in genere.

Metaboliti delle diatomee

Per quanto le diatomee rappresentino la più vasta popolazione di microalghe dell'oceano, ben pochi sono i loro metaboliti secondari riportati in letteratura. I principali componenti organici di questi microrganismi sono prodotti piuttosto comuni, come i pigmenti, lipidi e carboidrati.

Inizialmente, gli studiosi, dopo aver studiato la composizione chimica di alcune diatomee, hanno abbandonato questa linea di ricerca, reputandola banale e poco interessante. Tuttavia, alcune recenti scoperte potrebbero modificare queste posizioni.

ASP-tossine

L'acido domoico è il principale responsabile dell'avvelenamento dei molluschi, definito ASP dall'inglese "*amnesic shellfish poisoning*". Si ritiene che il principale produttore di questa tossina sia la diatomea *Nitzschia pungens*¹¹⁷⁻¹¹⁹,

ma è stata ritrovata anche in altre specie, quali la *Amphora coffeiformis*¹²⁰ e la *Pseudonitzschia australis*¹²¹.

La produzione di acido domoico dalle diatomee è estremamente interessante, dal momento che il composto è stato scoperto per la prima volta come principio antielmintico nella macroalga *Chondria armata*¹²². Inoltre, un composto strettamente correlato all'acido domoico è l'acido kainico, ritrovato nell'alga rossa *Digenea simplex*¹²³. In ogni caso il contributo di certe diatomee al metabolismo secondario nelle macroalghe è soltanto speculativo, sebbene sia ben noto che la superficie di molte macroalghe sia ricoperta proprio di diatomee.

D'altro canto, è stato dimostrato che una particolare specie d'alga rossa, la *Palmaria palmata*¹²⁴, produca acido kainico in una cultura monoalgale; il che potrebbe suggerire che la produzione di questi composti sia indipendente dalle macroalghe (figura 20).

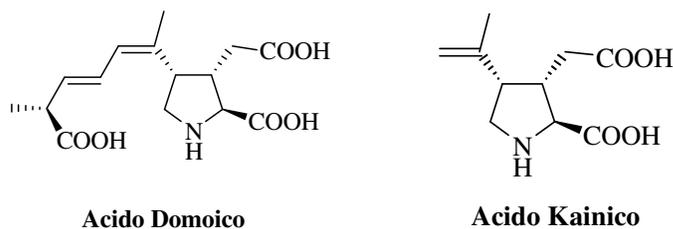


Figura 20. Struttura dell'acido domoico e dell'acido kainico.

La biosintesi degli acidi domoico e kainico può facilmente essere spiegata tramite la condensazione di un glutammato e di due gruppi prenilici. Infatti la stereochimica del C-2 nell'acido domoico è identica a quella dell'L-glutammato (figura 21).

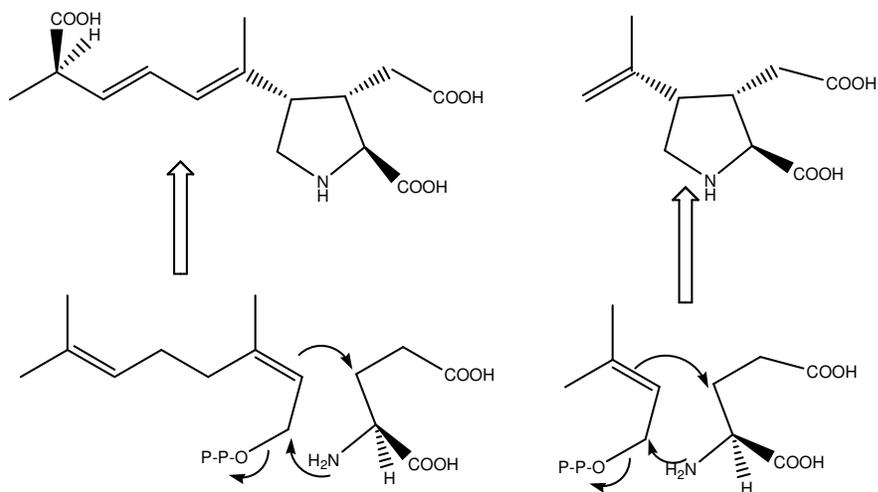


Figura 21. Biosintesi dell'acido domoico.

Gli studi di Wright e dei suoi collaboratori, con acetato marcato sul carbonio, hanno messo in evidenza che la biosintesi dell'acido domoico segue quella del glutammato a partire dall'acetato attraverso il ciclo dei TCA¹²⁵.

L'azione farmacologica dell'acido domoico viene esercitata a livello centrale dove questa tossina si comporta da potente agonista dei recettori del glutammato, che sono in relazione con i canali del Na^+ della membrana postsinaptica. La parte carbossimetilprolinica dell'acido domoico mima l'acido glutammico e si lega al recettore, mentre la natura della catena laterale inficia l'affinità della molecola per il suo recettore¹²⁶ (fig. 22); la conseguenza di queste azioni a livello centrale è rappresentata da ingenti danni neuronali.

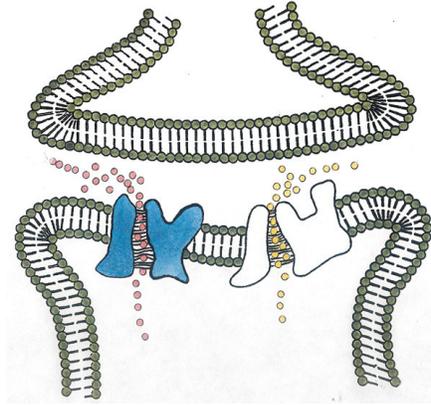


Figura 22. Recettori postsinaptici degli aminoacidi neurotrasmettitori

Attualmente sono in corso studi sull'attività biologica degli isomeri dell'acido domoico isolati inizialmente dalla *Chondria armata*.

Gli acidi isodomoici A-C non sono mai stati riportati da estratti di plankton o di mitili contaminati, mentre gli isomeri geometrici D, E, F sono stati isolati in quantità molto piccole sia da cellule planktoniche sia da molluschi. Tutti gli isomeri, in ogni caso, sembrano avere una minore affinità per i recettori del glutammato suggerendo una tossicità minore rispetto all'acido domoico. E' stato proposto un livello tollerabile di acido domoico di 20 $\mu\text{g/g}$ di parte edibile di mollusco.

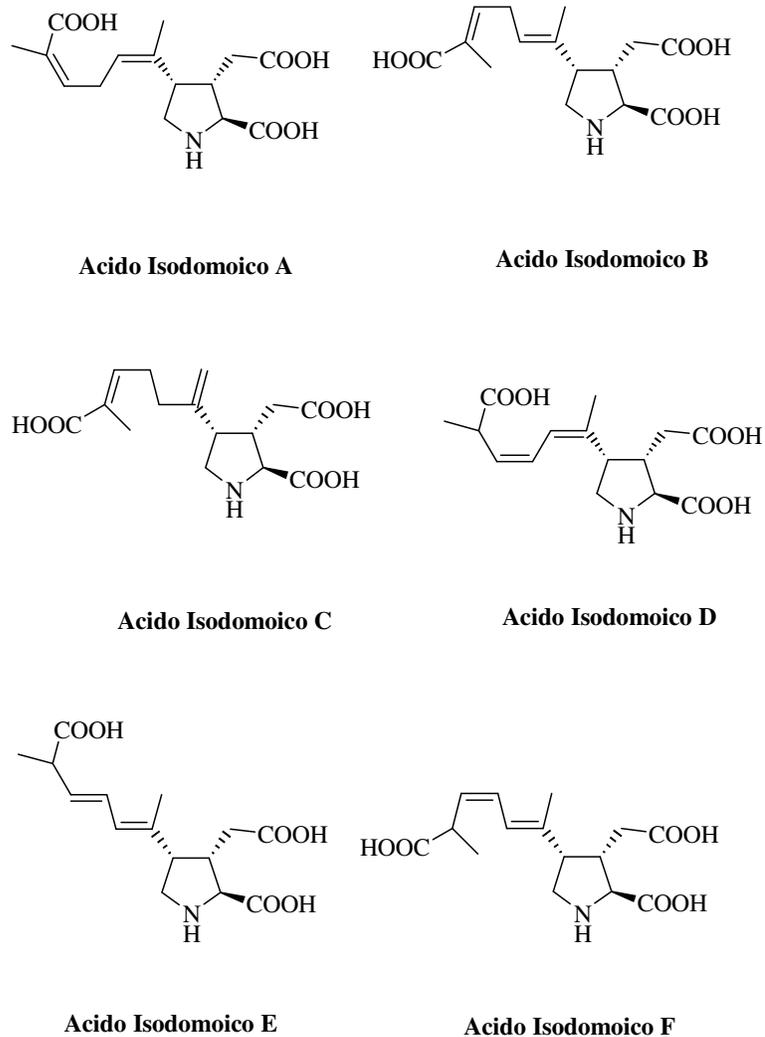


Figura 23. Struttura degli isomeri dell'acido domoico.

Bacillariolidi

I bacillariolidi I e II sono degli interessanti lattoni isolati dalla *N. pungens*¹²⁷. Si tratta di un nuovo tipo di eicosanoidi ciclopentanici, che si producono in seguito alla chiusura ad anello sul C-2 e C-6 dell'acido eicosapentaenoico (EPA) (figura 24).

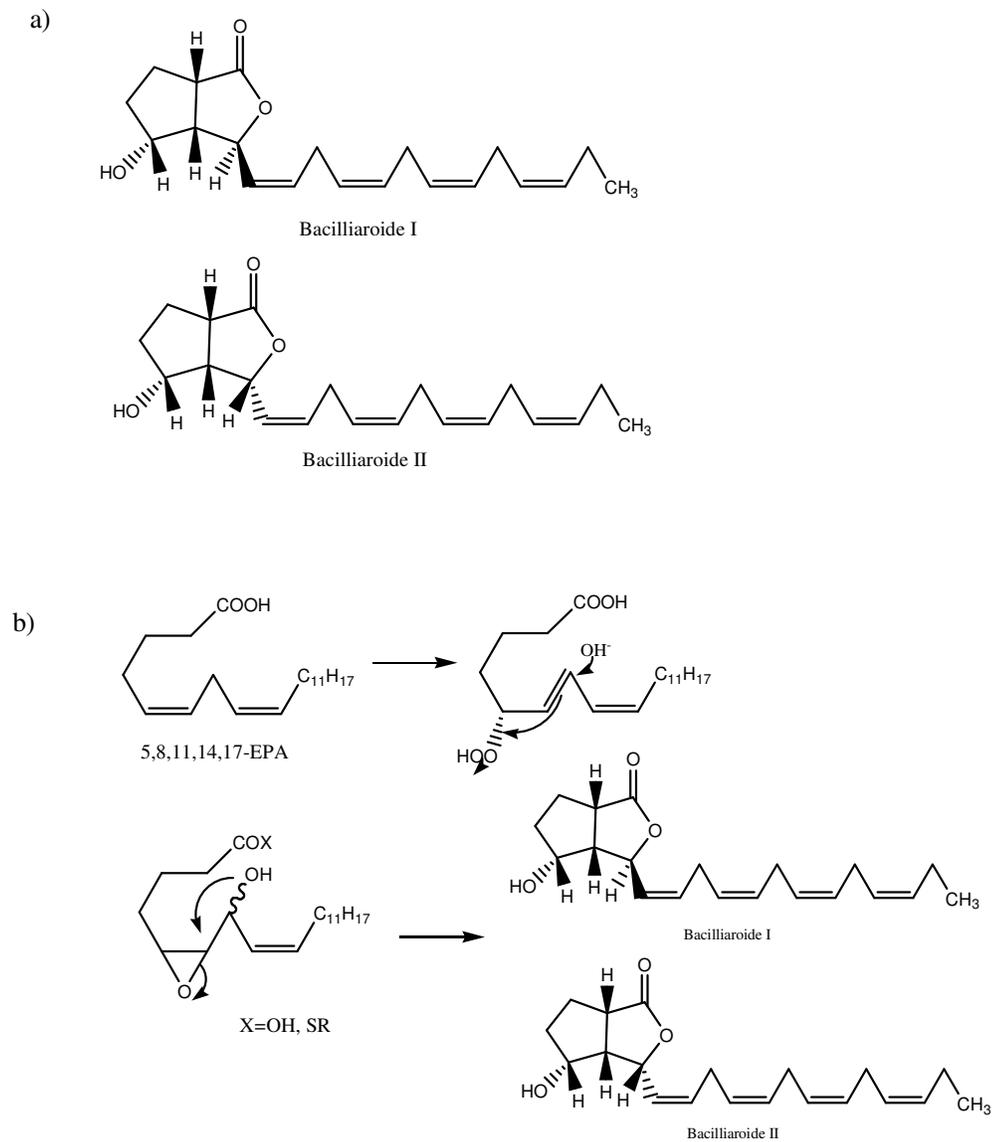


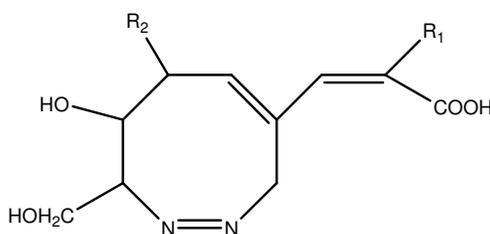
Figura 24. Struttura dei Bacilliaroidi I e II (a), e loro via biosintetica.

E' stato suggerito che il sistema dell'anello si formi attraverso una peridrossilazione dovuta alla lipossigenasi-5, un riarrangiamento ad epossido e, infine, un'apertura dell'eossido con un attacco anionico. Si è cercato, poi, di assegnare la configurazione assoluta del composto rifacendosi a quella della lipossigenasi-5; tuttavia, recentemente attraverso indagini ai raggi X di derivati

con centri chirali interni si è visto che la stereochimica del composto è in realtà opposta a quella, che si era pensato sulla base di speculazioni intorno alla via biosintetica¹²⁸. Ora resta un interessante dubbio circa la stereospecificità della lipossigenasi-5 nelle diatomee.

Asterionelline

L'attività antibiotica tipica di alcune diatomee è stata spesso attribuita ai derivati piuttosto comuni di acidi grassi liberi. Tuttavia, negli ultimi tempi nella diatomea *Asterionella* spp.¹²⁹ sono stati ritrovati degli interessanti composti, quali le asterionelline A, B e C, caratterizzate da una funzione diazonica. La struttura piuttosto insolita di un gruppo diazonico vinilico ciclico potrebbe richiedere ulteriori studi, al fine di essere confermata in modo inequivocabile. Il gruppo diazonico è un isomero di quello azossi ritrovato in numerosi antibiotici come la elaiomicina, e probabilmente ha un'origine biosintetica simile.



Asterionellina A $R_1=CH_3$, $R_2=H$
Asterionellina B $R_1=R_2=H$
Asterionellina C $R_1=H$, $R_2=OH$

Figura 25. Struttura dell'Asterionellina A, B, e C.

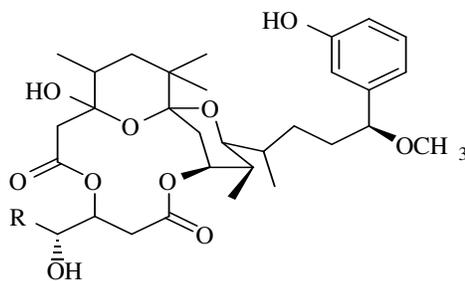
Metaboliti delle alghe blu-verdi

Una vasta gamma di interessanti metaboliti è stata isolata dalle alghe blu-verdi o cianobatteri, la cui diversità chimica è comparabile soltanto a quella degli *Actinomiceti*. Comunque, la maggior parte delle alghe studiate ha un'origine terrestre o d'acqua dolce, e soltanto un numero limitato di alghe marine blu-verdi viene investigata per i loro metaboliti secondari.

Nonostante ciò, esistono numerosi indizi, secondo i quali i cianobatteri giocano un ruolo determinante nella produzione di interessanti composti, ritrovati frequentemente nell'ambiente marino.

Lyngbya-tossine

Moore e i suoi collaboratori hanno dimostrato che l'aplysiatossina ritrovata nella lumaca di mare *Aplysia* nelle acque delle Hawaii sia in realtà un derivato metabolico dell'alga blu-verde *Lyngbya majuscula*¹³⁰; e hanno anche isolato dalla popolazione che vive nelle acque del mare della stessa alga la debromoaplysiatossina (figura 26).



R = CH₃ **Aplysiatossina**

R = **Debromoaplysiatossina**

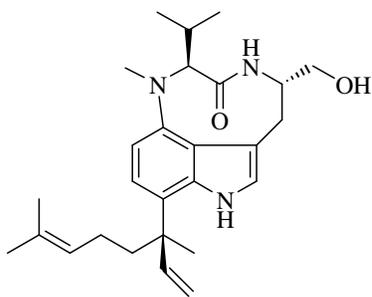
R = **Oscillatossina**

Figura 26. Struttura dell'aplysiatossina e dei suoi analoghi.

Lo scheletro carbonioso dell'aplysiatossina ricorda quello degli antibiotici macrolidici, ma non è conforme alla tipica costruzione per blocchi unitari dei polichetidi. Per esempio, l'anello aromatico dell'm-cresolo non prevede la classica idrossilazione degli anelli aromatici dei derivati fenilpropanoidi o acetogeninici.

L'oscillatossina, composto strettamente correlato ai precedenti e ritrovato nella specie marina *Oscillatoria* spp., è fornita del medesimo scheletro carbonioso¹³¹.

La *Lyngbya* produce inoltre anche altri tipi di composti; ad esempio, le lyngbyatossine, che sono state isolate dalla *L. majuscola* alla Hawaii¹³² e sono simili alle teleocidine, alcaloidi antibiotici prodotti dagli *Streptomiceti*. Questi composti sono chiaramente biosintetizzati a partire da triptofano, valina e gruppi prenilici.

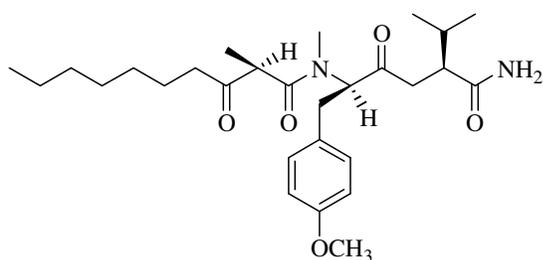


Lyngbyatossina A

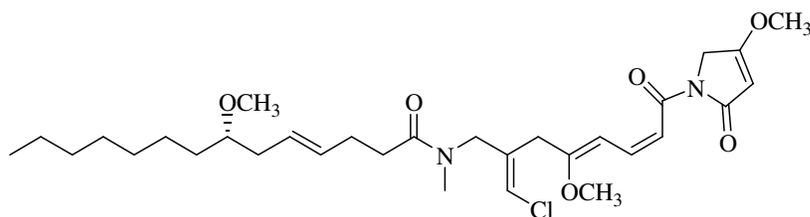
Figura 27. Struttura della Lyngbyatossina A.

Prove che suggeriscono l'intervento delle alghe blu-verdi nella formazione di vari metaboliti sono ben evidenti nelle strutture di molti composti marini.

Infatti, Moore ha individuato dei derivati amidici degli acidi grassi piuttosto insoliti dalla *L. majuscola* delle acque profonde. Questi composti, rappresentati dalla majusculamide A¹³³, sono caratterizzati da una porzione peptidica costituita da valina e tirosina, mentre le malyngamidi, rappresentate dalla malyngamide A¹³⁴, hanno una catena simile a quella dei polichetidi e un 4-metossi- Δ^3 -pirrolin-2-one; una struttura, quest'ultima, che potrebbe derivare da una condensazione di Claisen tra un acetato e una glicina.



Majusculamide A



Malyngamide A

Figura 28. Struttura della Majusculamide A e della Malyngamide A.

Simili sistemi ciclici di tipo pirrolidionico derivati dalla condensazione di aminoacidi e acetati sono presenti in molti altri metaboliti marini. Ad esempio, la

disidina, isolata dalla spugna *Dysidia herbacea*, è caratterizzata da un anello probabilmente derivante da una valina e un acetato¹³⁵.

E' anche verosimile che tale metabolita derivi da un'alga blu-verde, dal momento che la spugna *Dysidia* è associata effettivamente ad alghe di quel genere. Anche la dolastatina 15, un peptide antitumorale, ritrovato nella lepre di mare, *Dolabella auricularia*, contiene una struttura pirrolidonica costituita da una fenilalanina e un acetato.

Il coinvolgimento degli aminoacidi nella biosintesi dei composti del tipo dei polichetidi non è comune negli organismi terrestri, accrescendo ancor più l'unicità del metabolismo delle alghe. E' possibile che alcuni dei polichetidi delle alghe blu-verdi siano sintetizzati in maniera molto differente rispetto agli organismi produttori terrestri, come nel caso dei composti polieterei per i dinoflagellati. La variazione geografica dei componenti chimici all'interno della stessa specie, come si verifica per la *Lyngbya*, e la presenza di diversi generi di chimica sono caratteristiche analoghe a quelle degli *Actinomiceti*. Inoltre, la presenza di metaboliti comuni come le lyngbyatossine pone un'interessante domanda riguardante la possibilità di una relazione tra le alghe blu-verdi e gli *Actinomiceti*.

Tolitossina

Le caratteristiche strutturali di alcuni macrolidi ritrovati negli invertebrati marini suggeriscono una loro possibile derivazione dalle alghe blu-verdi. Per esempio, il bislattone, swiholide A¹³⁶⁻¹³⁷, e i suoi composti correlati isolati dalla spugna *Theonella* hanno lo stesso scheletro carbonioso della tolitossina, o scytoficina, rinvenuta nelle alghe blu-verdi terrestri e litorali (figura 28).

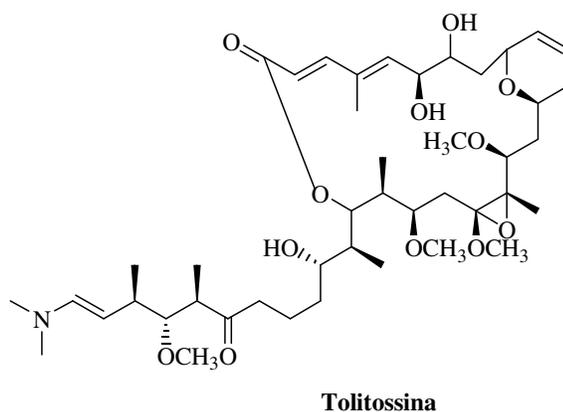


Figura 28. Struttura della Tolitossina.

Peptidi ciclici

Un gran numero di peptidi ciclici sono stati ritrovati nelle alghe blu-verdi d'acqua dolce, ma sono state investigate soltanto poche specie marine. Dalla specie d'acqua salata *Nodularia spumigena*, che ha causato gravi problemi nel mar Baltico e in Nuova Zelanda, è stato isolato il pentapeptide ciclico nodularina¹³⁸. Il composto è strettamente correlato alla microcistina, che è una potente epatotossina e un inibitore delle fosfatasi 2 e 2A, ritrovata nell'alga blu-verde *Microcystis aeruginosa*¹³⁹. La struttura sia della microcistina che della nodularina è caratterizzata dalla presenza di due aminoacidi non comuni come l'acido 3-amino-9-metossi-2,6,8-trimetil-10-fenil-4,6-decadienoico e l'acido 3-metilaspartico (fig. 29).

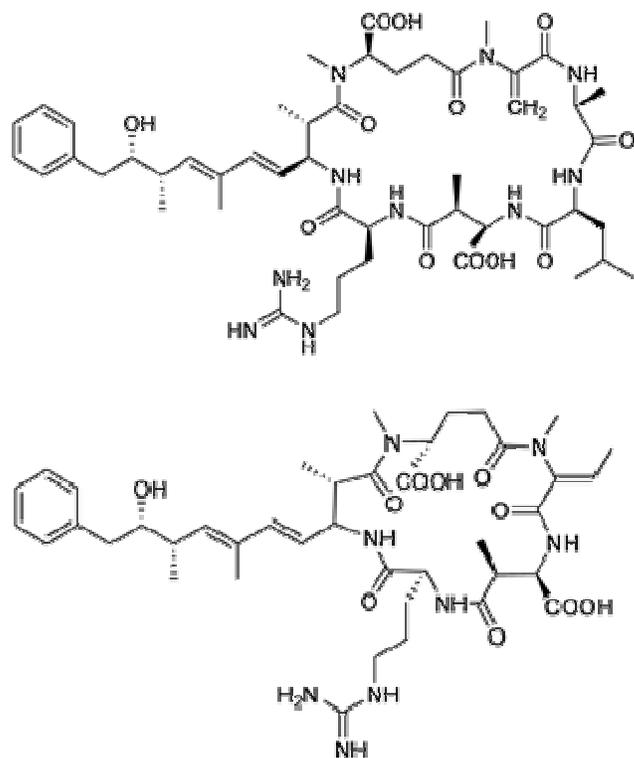


Figura 29. Struttura della Microcistina-LR e della Nodularina.

La biosintesi di questi composti sembra aver origine da un precursore polichetidico, costituito da fenilalanina, acetato e gruppi metilici provenienti dalla metionina. Una sorprendente scoperta è che il (2*R*, 3*S*)-3-metilaspato si forma nelle alghe dalla condensazione di un piruvato e di un acetato, seguito da un riarrangiamento e da una aminazione (figura 30). Questo è un processo drasticamente differente da quello ben noto, che è il riarrangiamento del glutammato ad opera della metilaspato-mutasi. Questa è un'altra dimostrazione che le microalghe talvolta adottino strade del tutto differenti e inattese per sintetizzare le medesime strutture.

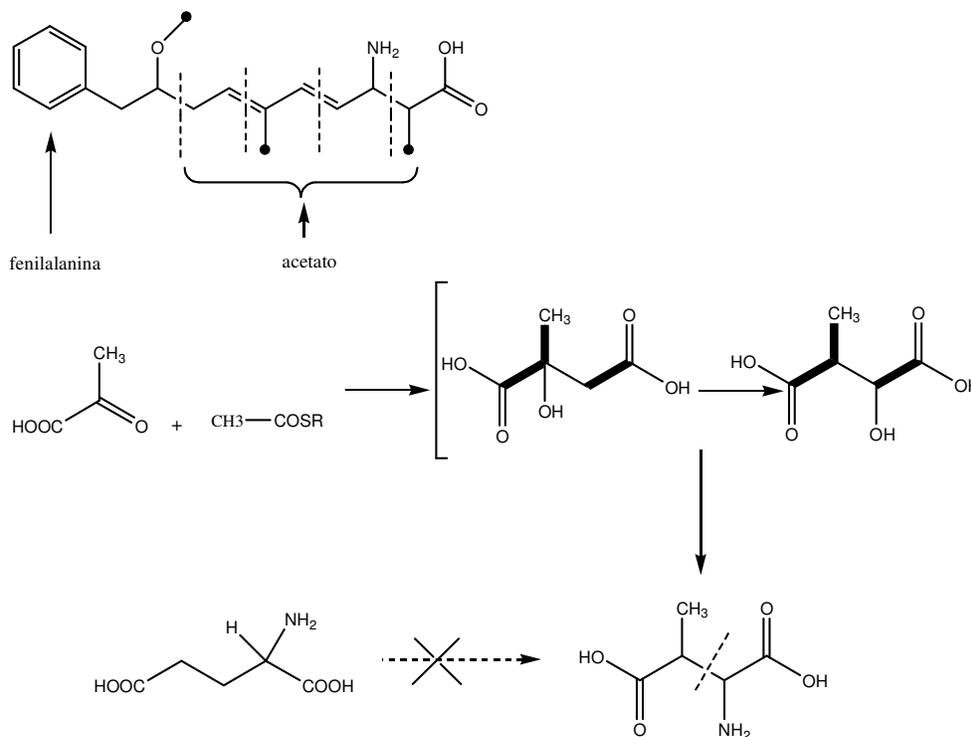


Figura 30. Schema biosintetico della nodularina e della microcistina.

E' opinione alquanto diffusa che molti dei peptidi ciclici ritrovati in tunicati e in altri organismi marini invertebrati abbiano la loro origine in alghe blu-verdi simbiotiche o in organismi ad esse strettamente correlati, come i procloroni¹⁴⁰. Per esempio, si suppone che il proclorone simbiotico nel tunicato, *Didemnum* spp., sia totalmente o in buona parte responsabile della produzione di didemnine¹⁴¹, rappresentate dalla didemmina A, che è un forte agente antivirale e antitumorale. Inoltre, molte *Didemnum* spp., che sono simbiotiche con altri procloroni, producono diversi peptidi ciclici. Comunque, finora tutti i tentativi fatti per coltivare i procloroni, al fine di confermare tali ipotesi, si sono rivelati vani.

Altri metaboliti delle microalghe

Ben pochi lavori sono stati eseguiti riguardo alle alghe marine come le *Cryptophyceae*. In ogni caso la portoricana *Chrysophaeum taylori* produce degli interessanti derivati del styrylcromone, l'ormotamnione e il suo desmetossi derivato. Questi composti, fortemente citotossici, hanno un tipico gruppo stirilico derivato dalle acetogenine, ma il tipo di ossigenazione della porzione cromonica non sempre è conforme a quello delle acetogenine. Fino ad oggi nessun altro composto analogo a quelli descritti è stato mai isolato da altre fonti.

Tossine prodotte dalle macroalghe

Policavernoside A

A differenza dei frequenti coinvolgimenti delle microalghe nelle varie forme di avvelenamenti alimentari, i casi dovuti a ingestioni di macroalghe sono piuttosto rari.

Si ha notizia di un'intossicazione umana avvenuta nel 1991 in seguito all'ingestione di un'alga rossa *Polycavernosa tsudai* (comunemente definita *Gracilaria edulis*); in quell'occasione tredici persone si ammalarono e tre di esse morirono.

La sostanza responsabile dell'avvelenamento era un macrolide glicosidico, definito policavernoside A¹⁴². Il contenuto di questa sostanza nell'alga era piuttosto basso, ma essa causava nei topi sintomi comparabili a quelli verificatisi negli uomini.

Il macrociclo, triossantridecano, nell'aglicone è una reminiscenza del triossandodecano della aplysiatossina. Il fucosio metilato del policavernoside A

suggerisce la sua origine algale, ma l'improvvisa e temporanea comparsa della tossina rimane senza spiegazione.

Precedentemente, episodi di avvelenamenti fatali causati da altre *Gracilaria*, come la *G. chorda* e la *G. verrucosa*, sono anch'essi senza spiegazione, così come la natura della tossina o delle tossine responsabili.

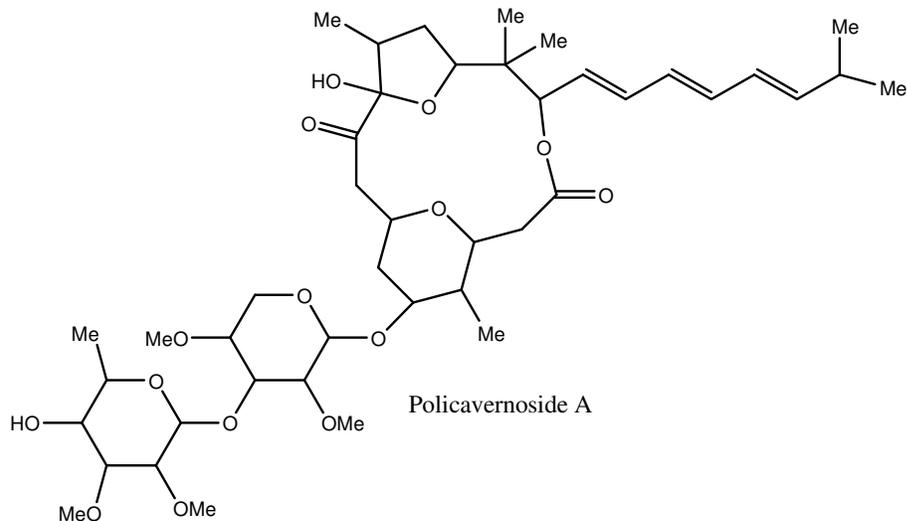


Figura 31. Struttura del Policavernoside A.

Sostanze tossiche della *Chondria armata*

L'alga rossa *C. armata* è una medicina popolare usata come antielmintico. In aggiunta a due analoghi della palitossina, anche l'acido domoico e i suoi sette derivati sono stati ritrovati in quest'alga; tuttavia, nessun caso di avvelenamento umano dovuto alla *C. armata*¹⁴³ è stato mai riportato.

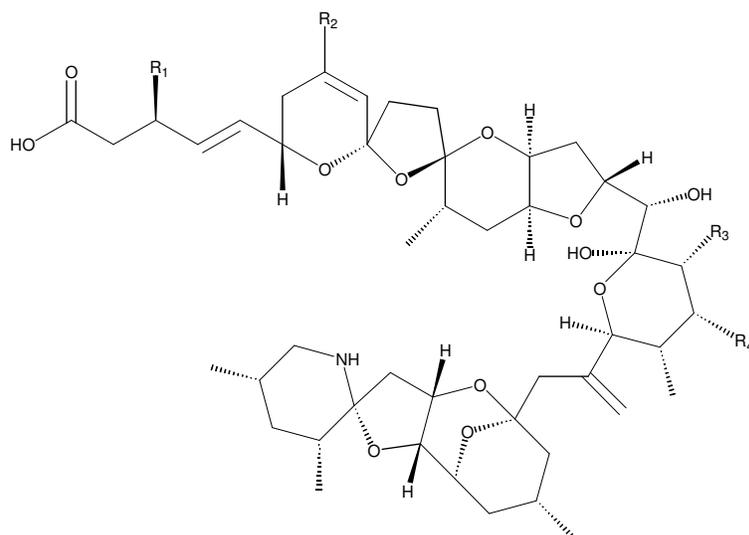
Altre tossine

Azaspiracidi.

Gli azaspiracidi sono biotossine di recente scoperta riportate da McMahon e Silke come le responsabili dell'avvelenamento diarroico verificatosi in Olanda nel 1995¹⁴⁴.

La struttura del capostipite di questa classe di tossine è stata determinata in Giappone, e la tossina fu chiamata azaspiracido con riferimento alla presenza di un anello azaspiro e di una funzione acida nella molecola¹⁴⁵. Da quel momento l'intossicazione da azaspiracidi è stata denominata AZP¹⁴⁶. Dal 1996, parecchi incidenti da AZP si sono verificati in Irlanda ed in altri paesi europei, prevalentemente dovuti all'ingestione di mitili prodotti in Irlanda. Oltre all'AZA sono stati isolati ed identificati altri quattro analoghi (AZA 2-5).

Sebbene la comprensione delle trasformazioni metaboliche di queste tossine nei mitili sia di primaria importanza nell'ambito di studi di depurazione, non esistono a tutt'oggi dati sperimentali su se e come gli azaspiracidi vengano modificati nei molluschi. Per analogia con le pectenotossine e le yessotossine, che subiscono reazioni di idrossilazione nei mitili, si può presumere che gli AZA 4 e 5 siano prodotti di ossidazione dell'AZA 3. Dal momento che, poi, non sono note modifiche biochimiche delle tossine per metilazione o demetilazione, è verosimile che gli AZA, AZA 2 e AZA 3 siano prodotti originali dei dinoflagellati.



Tossina	R1	R2	R3	R4
AZA	H	H	Me	H
AZA2	H	Me	Me	H
AZA3	H	H	H	H
AZA4	OH	H	H	H
AZA5	H	H	H	OH

Figura 32. Struttura degli Azaspiracidi.

Tabella 5: Dose letale 50 degli azaspiracidi sul topo per i.p., espressa in mg/kg¹⁴⁷

DL ₅₀	mg/kg
AZA	0,20
AZA2	0,11
AZA3	0,14
AZA4	0,47
AZA5	1,00

Studi istopatologici hanno dimostrato che tali tossine provocano danni al fegato, al pancreas, al timo e a tutto l'apparato digerente¹⁴⁸. E' stato inoltre notato, che tali tossine sono citotossiche su cellule P388 ma non su cellule KB, e che non inibiscono la protein fosfatasi 2A.

Spirolidi.

Gli spiroolidi sono immine macrocicliche isolate e caratterizzate, molto recentemente, dagli estratti lipofili di mitili raccolti in Nova Scotia, Canada¹⁴⁹.

Sono tossine a rapida azione che causano nel topo, dopo iniezione intra-peritoneale sintomi che includono spasmi addominali, piloerezione, iperestensione della schiena, inarcamento della coda, convulsioni e morte entro 3-20 minuti dall'iniezione. Sintomi neurologici compaiono nel topo anche dopo somministrazione orale, ma il meccanismo d'azione rimane ancora sconosciuto.

L'origine planctonica di tali tossine, suggerita dalle analogie strutturali con altri macrolidi prodotti da dinoflagellati quali la gimnodimina (*Gymnodinium mikimotoi*) e i prorocentroidi (*Prorocentrum lima*), è stata confermata quando spiroolidi sono stati isolati da una coltura monoalgale del dinoflagellato marino *Alexandrium ostenfeldii*¹⁵⁰.

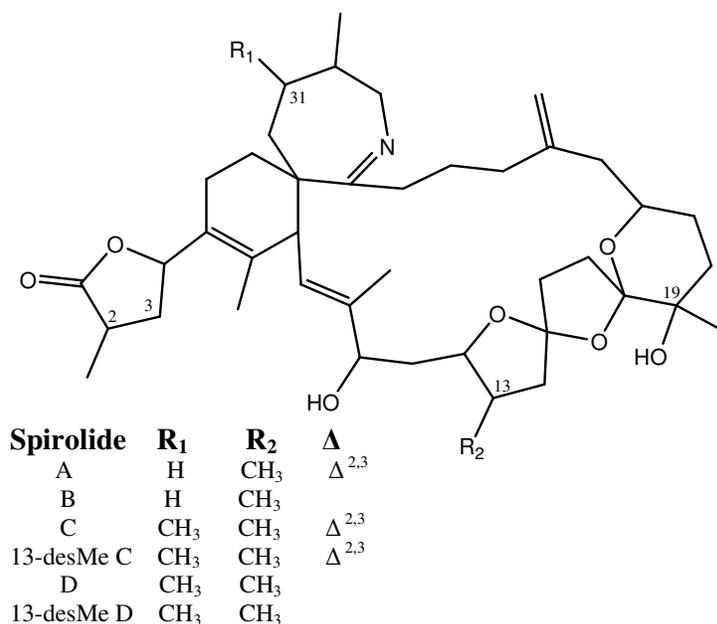


Figura 33. Struttura degli Spirolidi.

Venerupina (VSP)

L'intossicazione da venerupina è una sindrome non paralitica causata dall'ingestione di vongole (*Venerupis semidecussate*) e ostriche (*Crasso-strea gigas*) che hanno accumulato dinoflagellati tossici. La specie che si ritiene responsabile di questa intossicazione è il *Prorocentrum minimum*¹⁵¹, il quale produce "acque colorate" soprattutto in Giappone, nel Mar Baltico e in Portogallo.

La natura della tossina responsabile dell'intossicazione da venerupina non è stata ancora definita. L'avvelenamento è caratterizzato da una lunga incubazione di 24-48 ore a cui fa seguito un inizio repentino dei sintomi che sono nausea, vomito, diarrea, cefalea e agitazione. Nei casi più gravi possono manifestarsi delirio, disfunzione epatica fino a coma epatico e la morte sopraggiunge in circa il 33% dei pazienti.

Cooliatossina.

La cooliatossina è stata isolata nel 1995 dal dinoflagellato *Coolia monotis* presente in Australia. Seppure *C. monotis* è stata ritrovata nelle zone colpite da ciguatera (Besada et al. 1982), la cooliatossina tende a non bioaccumularsi nei pesci, e se iniettata al topo per via intraperitoneale non produce la sintomatologia caratteristica dell'avvelenamento da ciguatera pur presentando una DL_{50} di 1 mg/Kg¹⁵³.

Il peso molecolare della cooliatossina corrisponde a 1062 da in analogia alla forma monosolfatata della yessotossina. Inoltre, i sintomi clinici che questa tossina induce nel topo risultano analoghi a quelli prodotti dalla yessotossina, ovvero dopo un primo periodo in cui non vi sono sintomi evidenti di intossicazione insorgono ipotermia e difficoltà respiratorie.

L'attività della cooliatossina in vitro mostra un'iniziale stimolazione e successivo blocco dei nervi non mielinizzati. La funzione solfato sembra essere fondamentale all'attività tossica infatti una desolfatazione riduce l'azione tossica di tutte le tossine polieteree solfatate, quali yessotossina e maitotossina.

Gimnodimina.

La gimnodimina è una neurotossina isolata per la prima volta dalle ostriche, in concomitanza alla proliferazione del dinoflagellato *Gymnodinium cf. mikimotoi*.

Le caratteristiche chimico-strutturali della (-)-gimnodimina includono un anello tetraidrofuranico trisostituito incorporato in un anello carbociclico a 16

termini, un butenolide chirale ed una funzione amminica spirociclica. La funzione amminica risulta implicata nell'attività biologica.

4.4 Conclusioni

Le microalghe marine sembrano essere una fonte davvero promettente di composti utili, considerando che alcune decine di migliaia di specie non sono state ancora investigate. Senza contare che il metabolismo delle microalghe, come visto in precedenza, è piuttosto unico da un punto di vista chimico e strutturale, e senza contare che moltissimi composti presenti nell'ambiente marino hanno la propria origine direttamente nelle microalghe stesse.

Purtroppo, la chimica delle microalghe marine è ancora agli albori, a causa delle gravi difficoltà che insorgono nella coltivazione delle diverse specie nei laboratori biologici; e, tranne poche eccezioni, non è possibile effettuare lavori di natura chimica da campioni di popolazioni naturali di microalghe marine.

Attualmente, molti organismi come i dinoflagellati stessi e i procloroni delle ascidie restano per molti versi oscuri, a dispetto dei continui studi che si effettuano su di essi.

A rendere le cose ancora più complesse, c'è il problema che, una volta ottenuta la coltivazione dei microrganismi, non sempre essi producono le sostanze desiderate. Pertanto, il progresso della chimica delle microalghe è strettamente connesso a quello delle tecniche di coltivazione, e quindi a quello della comprensione del loro metabolismo.

Un altro grave problema in quest'ambito di ricerca è la sempre maggiore incidenza di episodi di avvelenamento dovuti a ingestione di metaboliti delle

microalghe e di morie di pesci, con preoccupanti conseguenze sulla salute pubblica e sull'industria del pesce e dei molluschi. Una maggiore consapevolezza pubblica e i migliorati sistemi di indagine potrebbero spiegare l'aumento degli incidenti legati alla tossicità delle microalghe, riportati con allarmante frequenza in tutto il mondo. Comunque, bisognerebbe porre maggiore attenzione al deterioramento dell'ambiente marino e alla diffusione di cisti resistenti di specie nocive, legate alle chiglie delle navi. Di conseguenza, in futuro ci saranno ulteriori problemi da risolvere attraverso procedimenti e interventi di natura chimica.

Come accennato in precedenza, a dispetto di tutti gli ostacoli presenti in questo ambito di ricerca, notevoli progressi sono stati effettuati nella delucidazione strutturale delle tossine, specialmente di tipo polietereo; e così pure nell'identificazione delle fonti di sostanze tossiche, come si è visto nel caso della tetrodotossina e della ciguatossina.

Non bisogna poi trascurare il contributo che le tossine hanno fornito alle scienze della vita, come la biologia o la farmacologia.

Pertanto, gli sforzi concertati di chimici, biochimici, farmacologi e biologi potrebbero aprire una nuova era nello studio delle tossine marine.

4.5 Riferimenti bibliografici

1. Shimizu, Y.; *Chem. Rev.*, **1993**, 93, p. 1685.
2. Yasumoto, T.; Oshima, Y.; Sugawara, W.; Fukuyo, Y.; Oguri, H.; Igarashi, N.; Fujita; *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **1980**, 46, p. 1405.
3. Sieburth, J. McN.; *Sea Microbes*, 1979.
4. Corliss, J. O.; *Handbook of Protoctista*, **1989**.

5. Taylor, F. J. R.; *The biology of dinoflagellates*, **1987**.
6. Dodge, J. D.; *Prog. Protozool.*, **1965**, 2, p. 264.
7. Meyer, K. F.; Sommer, H.; Schoenholz, P. J.; *Prevent. Med.*, **1928**, 2, p. 365.
8. Alam, M.; Shimizu, Y.; Ikawa, M.; Sasner, J. J.; *J. Environ. Sci. Health*, **1978**, A13, p. 493.
9. Shantz, E. J.; Ghazarossian, V. E.; Schonoes, H. K.; Strong, F. M.; Springer J. P.; Pezzante, J. O.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, 97, p.1238.
10. Shimizu, Y.; Fallon, W. E.; Oshima, Y.; Miura, I.; Nakanishi, K.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, 100, p. 6791.
11. Shimizu, Y.; Fallon, W. E.; Wekell, J. C.; Gerber, D. G.; Gauglitz, E. J.; *J. Agric. Food. Chem.*, **1978**, 26, p. 878.
12. Shimizu, Y.; Kobayashi, M.; Genenah, A.; Ichihara, N.; *Seafood toxins*, **1984**, p. 151.
13. Shimizu, Y.; Norte, M.; Hori, A.; Genenah, A.; Kobayashi, M. *J. Am. Chem.Soc.*, **1984**, 106, p. 6433.
14. Gupta, S.; Norte, M.; Shimizu, Y.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1989**, p. 1421.
15. Oshima, Y.; Sugino, K.; Itakura, H.; Hirota, M.; Yasumoto, T.; *Toxic marine phytoplankton*, **1989**, p. 391.
16. Shimizu, Y.; Gupta, S.; Prasad, A. V. K.; *Toxic marine phytoplankton*, **1989**, p. 62.
17. Kobayashi, M.; Shimizu, Y.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1981**, p. 827.

18. Sullivan, J. J.; Iwaoka, W. T.; Liston, J.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1983**, *114*, p. 465.
19. Shimizu, Y.; Yoshioka, M.; *Science*, **1980**, *212*, p. 547.
20. Kotaki, Y.; Oshima, Y.; Yasumoto, T.; *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **1985**, *51*, p. 1009.
21. Gemmill, J. S.; Manderson, W. G.; *Lancet*, **1960**, *2*, p. 307.
22. Kao, C. Y.; Levinson, S. R.; *Tetrodotoxin, saxitoxin and the molecular biology of the sodium channel*, **1986**.
23. Bialojan, C.; Takai, A.; *Biochem. J.*, **1988**, *256*, p. 283.
24. Hashimoto, K.; *Marine toxins and other bioactive marine metabolites*, **1979**.
25. Kaemper, E.; *The history of Japan, together with a description of the kingdom of Siam*.
26. Davis, W.; *Science*, **1988**, *240*, p. 1715.
27. Noguchi, T.; Hashimoto; *Toxicon*, **1973**, *11*, p. 305.
28. Mosher, H. S.; Fuhrman, F. A.; Buchwald, H. D.; Fischer, H. G.; *Science*, **1964**, *144*, p. 1100
29. Scheumack, D.; Howden, M. E. H.; Spence, I.; Quinn, R. J.; *Science*, **1978**, *199*, p. 188.
30. Tsuda, K.; *Naturwissenschaften*, **1966**, *53*, p. 171.
31. Yasumoto, T.; Yasumura, D.; Totsu, M.; Michishita, T.; Endo, A.; Kotaki, J.; *Agric. Biol. Chem.*, **1986**, *50*, p. 793.
32. Noguchi, T.; Jeon, J. K.; Arakawa, O.; Sugita, H.; Deguchi, Y.; Shida, Y.; Hashimoto, K.; *J. Biochem.*, **1986**, *99*, p. 311.

33. Simidu, U.; Noguchi, T.; Hwang, D. F.; Shida, Y.; Hashimoto, K.; *Appl. Env. Microbiol.*, **1987**, *53*, p. 714.
34. Matsui, T.; Taketsugu, S.; Kodama, K.; Ishii, A.; Yamamori, K.; Shimizu, C.; *Nippon, Suisan Gakkaishi*, **1989**, *55*, p. 2199.
35. Lin, Y. Y.; Risk, M.; Ray, S. M.; Van Engen, E.; Clardy, J.; Golik, J.; James, J. C.; Nakanishi, K.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, p. 6773.
36. Shimizu, Y.; Chou, H. N.; Bando, J.; Van Duyne, T.; Clardy, J.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, p. 514.
37. Prasad, A. V. K.; Shimizu, Y.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, p. 6476.
38. Shimizu, Y.; *Natural toxins*, **1986**, p.115.
39. Nakanishi, K.; *Toxicon*, **1985**, *23*, p.473.
40. Lee, M. S.; Repeta, D. S.; Nakanishi, K.; Zagorski, M. G.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, p. 7855.
41. Chou, H. N.; Shimizu, Y.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, *109*, p. 2184.
42. Shimizu, Y.; Wrensford, G.; *Toxic phytoplankton blooms in the sea*, **1993**, p. 907.
43. Lee, M. S.; Quin, G-W.; Nakanishi, K.; Zagorski, M. G.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, p. 6234.
44. Tachibana, K.; *Ph.D. Thesis*, University of Hawaii, **1980**.
45. Murata, M.; Legrand, A. M.; Ishibashi, Y.; Fukui, M.; Yasumoto, T.; *J. Am. Chem. Soc.*, *1989*, *111*, p. 8929.
46. Steidinger, K. A.; Baden, D. G.; *Dinoflagellates*, **1984**, p. 201.
47. Lin, Y. Y.; Risk, M.; Ray, S. M.; Van Engen, D.; Clardy, J.; Golik, J.; James, G. C.; Nakanishi, K.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, p. 6773.

48. Shimizu, Y.; Gupta, S.; Norte, A.; Hori, A.; Genenah, A.; Kobayashi, M.; *Proc. Int. Conf. On Toxic Dinoflagellates*, **1985**, 3, p. 271.
49. Nakanishi, K.; *Toxicon*, **1985**, 23, p. 473.
50. Pawlak, J.; Tempesta, M. S.; Golik, J.; Zagorski, M. G.; Lee, M. S.; Nakanishi, K.; Iwashita, T.; Gross, M. L.; Tomer, K. B.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, 109, p.1144.
51. Catterall, W. A.; Risk, M.; *Mol. Pharmacol.*, **1981**, 19, p. 345.
52. Bidard, J. N.; Vijverberg, H. P. M.; Frelin, C.; Chunge, E.; Legrand, A. M.; Bagnis, R.; Lazdunski, M.; *J. Biol. Chem.*, **1986**, 479, p. 204.
53. Lombet, A.; Bidard, J. N.; Lazdunski, M.; *FEBS Lett.*, **1987**, 219, p. 355.
54. Nukina, M.; Tachibana, K.; Scheuer, P. J.; *Natural toxins*, **1986**, p. 46.
55. Murata, M.; Legrand, A.-M.; Ishibashi, Y.; Yasumoto, T.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, p. 8927.
56. Murata, M.; Legrand, A.-M.; Ishibashi, Y.; Fukui, M.; Yasumoto, T.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, p. 4380.
57. Satake, M.; Murata, M.; Yasumoto, Y.; *Tetrahedron Lett.*, **1993**, 34, p. 1975.
58. Li, K. M.; *Science*, **1965**, 147, p. 1580.
59. Rayner, M. D.; Kosaki, T. I.; Fellmeth, E. L.; *Science*, **1968**, 160, p. 70.
60. Murata, M.; Legrand, A. M.; Scheuer, P. J.; Yasumoto, T.; *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33, p. 525.
61. Satake, M.; Murata, M.; Yasumoto, T.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, p. 361.

62. Nagai, H.; Torigoe, K.; Satake, M.; Murata, M.; Yasumoto, T.; Hirota, H.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, p. 1102.
63. Nagai, H.; Murata, M.; Torigoe, K.; Satake, M.; Yasumoto, T.; *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, p. 5448.
64. Yokoyama, A.; Murata, A.; Oshima, Y.; Iwashita, T.; Yasumoto, T.; *J. Biochem.*, **1988**, *104*, p. 184.
65. Murata, M.; Naoki, H.; Iwashita, T.; Matsunaga, S.; Sasaki, M.; Yokoyama, A.; Yasumoto, T.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, p. 6594.
66. Takahashi, M.; Ohizumi, Y.; Yasumoto, T.; *J. Biol. Chem.*, **1982**, *257*, p. 7287.
67. Gusovsky, F.; Daly, J. W.; *Biochem. Pharmacol.*, *1990*, *39*, p. 1633.
68. Kobayashi, M.; Ochi, R.; Ohizumi, Y.; *Br. J. Pharmacol.*, **1987**, *92*, p. 665.
69. Soergel, D. G.; Yasumoto, T.; Daly, J. W.; Gusovsky, F.; *Mol. Pharmacol.*, **1992**, *41*, p. 487.
70. Bialojan, C.; Takai, A.; *Biochem. J.*, **1988**, *256*, p. 283.
71. Haystead, T. A. J.; Sim, A. T. R.; Carling, D.; Honnor, R. C.; Tsukitani, Y.; Cohen, P.; Hardie, D. G.; *Nature*, *1989*, *337*, 78.
72. Kobayashi, J.; Ishibashi, M.; Nakamura, H.; Ohizumi, Y.; Yamasu, T.; Sasaki, T.; Hirata, Y.; *Tetrahedron Lett.*, **1986**, *27*, p. 5755.
73. Torigoe, K.; Murata, M.; Yasumoto, T.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, p. 7876.
74. Murakami, M.; Makabe, K.; Yamaguchi, K.; Konosu, S.; Walchli, M. R.; *Tetrahedron Lett.*, **1988**, *29*, p. 1149.

75. Tachibana, K.; Scheuer, P.; Tsukitani, Y.; Kikuchi, H.; Van Engen, D.; Clardy, J.; Gopichand, Y.; Schmitz, F. J.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, p. 2469.
76. Murakami, Y.; Oshima, Y.; Yasumoto, T.; *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **1982**, *48*, p. 69.
77. Dickey, R. W.; Borzin, S. C.; Faulkner, D. J.; Bencsath; F. A.; Andrzejewski, D.; *Toxicon*, **1990**, *28*, p. 371.
78. Yasumoto, T.; Oshima, Y.; Sugawara, W.; Fukuyo, Y.; Oguri, H.; Igarashi, T.; Fujita, N.; *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **1980**, *46*, p. 1405.
79. Schmitz, F. J.; Prasad, R. S.; Gopichand, Y.; Jossain, M. B.; van der Helm, D.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, p. 2467.
80. Yasumoto, T.; Torigoe, K.; *J. Nat. Prod.*, **1991**, *54*, p. 1487.
81. Yasumoto, Y.; Murata, M.; Oshima, Y.; Matsumoto, G. K.; Clardy, J.; *Seafood Poisoning*, **1984**, p. 208.
82. Sukanuma, M.; Fujiki, H.; Yoshizawa, S.; Hirota, M.; Nakayatsu, M.; Ojika, M.; Waknamatsu, K.; Yamada, K.; Sugimura, T.; *Pr. Natl. Acad. Sci.*, **1988**, *85*, p. 1768.
83. Yasumoto, T.; Oshima, Y.; Sugawara, W.; Fukuyo, Y.; Oguri, H.; Igarashi, N.; Fujita; *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **1980**, *46*, p. 1405.
84. Murata, M.; Shimatani, M.; Sugitani, H.; Oshima, Y.; Yasumoto, T.; *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **1982**, *48*, p. 549.
85. Tachibana, K.; Scheuer, P. J.; Tsukitani, Y.; Kikuchi, H.; Engen, D. V.; Clardy, J.; Gopichand, Y.; Schimtz, J. J.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, p. 2496.

86. Murata, M.; Shimatani, M.; Sugitani, H.; Oshima, Y.; Yasumoto, T.; *Nippon Suisan Gakkaishi*, **1982**, *48*, p. 549.
87. Shibata, S.; Ishidaq, Y.; Kitano, H.; Ohizumi, Y.; Habon, J.; Tsukitani, Y.; Kikuchi, H.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1982**, *223*, p. 135.
88. Sukanuma, M.; Fujiki, H.; Suguri, H.; Yoshizawa, S.; Hirota, M.; Nakayatsu, M.; Ojikaq, M.; Wakamatsu, K.; Yamada, K.; Sugimura, T.; *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1988**, *85*, p. 1768.
89. Berenblum, I.; *Cancer Res.*, **1941**, *1*, p. 44.
90. Boutwell, R. K.; *Carcinogenesis: Mechanisms of Tumor Promotion and Carcinogenesis*, **1978**, *2*, p. 49.
91. Hecker, E.; *Methods Res.*, **1971**, *6*, p. 439.
92. Sukanuma, M.; Fujiki H.; Suguri, H.; Yoshizawa, S.; Hirota, M.; Nakayasu, M.; Ojika, M.; Wakamatsu, K.; Yamada, M.; Murata, M.; Yasumoto, T.; Sugimura, T.; *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **1988**, *79*, p. 1089.
93. Sukanuma, M.; Tatematsu, M.; Yatsunami, J.; Yoshizawa, S.; Okabe, S.; Uemura, D.; Fujiki, H.; *Carcinogenesis*, **1992**.
94. Nishiwaki, S.; Fujiki, H.; Sukanuma, M.; Furuya-Suguri, J.; Matsushima, R.; Iida, Y.; Ojika, M.; Yamada, K.; Uemura, D.; Yasumoto, T.; Schmitz, F. J.; Sugimura, T.; *Carcinogenesis*, **1990**, *11*, p. 1837.
95. Yasumoto, T.; Murata, M.; Oshima, Y.; Matsumoto, G. K.; Clardy, J.; *Tetrahedron*, **1985**, *41*, p. 1019.
96. Murata, M.; Sano, M.; Iwashita, T.; Naoki, H.; Yasumoto, T.; *Agric. Biol. Chem.*, **1986**, *50*, p. 2693.

97. Working Group on Toxicology of DSP and AZP. *Report of the meeting of the Working Group on Toxicology of DSP and AZP*, Brussels, **21-23rd May 2001**, p.21
98. Terao, K.; Ito, E.; Oarada, M.; Murata, M.; Yasumoto, T.; *Toxicon*, **1990**, 28, p. 1095.
99. Murata, M.; Kumagai, M.; Lee, J. S.; Yasumoto, T.; *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, p. 5869.
100. Naoki, H.; Murata, M.; Yasumoto, T.; *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, **1993**, 7, p. 179.
101. Satake, M.; MacKenzie, L. Yasumoto, T. *Natural Toxins*, **1997**, 5, p. 164.
102. Satake, M; Terasawa, K; Kadowaki, Y; *Tetrahedron lett.*, **1996**, 37, p. 5955.
103. Tubaro, A; Della loggia, R; Yasumoto, T; in Reguera, B; Blanco, J; Fernandez, M.L.; yatt, T; (ed.) *Proceedings of the VIII WInternational Conference on Harmful algae*. Vigo, Spain 25-29 June 1997. Paris: Xunta de Galicia and IOC of UNESCO; **1998**. p.470.
104. Satake, M.; Terasawa, Y.; Kadowaki, Y.; Yasumoto, T. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, p. 5955.
105. (a) Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Magno, S.; Poletti, R.; Satake, M.; Viviani, R.; Yasumoto, T.; *Toxicon* **1997**, 35, p. 177. (b) Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Magno, S.; Poletti, R.; Viviani, R.; *Toxicon* **1999**, 37, p. 689. (c) Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Magno, S.; Poletti, R.; Viviani, R.; *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, p. 8897. (d)

- Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Poletti, R.; Viviani, R.; *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 2, p. 291. (e) Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Poletti, R.; Viviani, R.; *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, 13, p. 770.
106. Ogino, H.; Kumagai, M.; Yasumoto, T.; *Natural Toxins*, **1998**, 1, p. 20.
107. Leira, F.; Alvarez, C.; Vieites, J.M.; Vieites, M.R.; Botana, L.M.; *Toxicology in Vitro* **2002**, 16, p.23.
108. Malaguti, C.; Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Rossini, G.P.; *Toxicology in Vitro*, **2002**, 16, p. 357.
109. Moore, R. E.; Scheuer, P. J.; *Science*, **1971**, 172, p. 495.
110. Klein, L. L.; McWhorter, Jr. W. W.; Koss; Pfaff, K. P.; Kishi, Y.; Uemura, D.; Hirata, Y.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, 104, p. 7392.
111. Maeda, M.; Kodama, R.; Tanaka, T.; Yoshizumi, H.; Nomoto, K.; Takemoto, T.; Fujita, M.; *Symposium papers*, Hiroshima, **1985**, p. 616.
112. Yasumoto, T.; Yasumura, D.; Ohizumi, Y.; Takahashi, M.; Alcalá, A. C.; Alcalá, L. C.; *Agric. Biol. Chem.*, **1986**, 50, p. 163.
113. Fukui, M.; Murata, M.; Inoue, A.; Gawel, M.; Yasumoto, T.; *Toxicon*, **1987**, 25, p. 1121.
114. Haberman, E.; *Toxicon*, **1989**, 27, p. 1171.
115. Kosuge, T.; Tsuji, K.; Hirai, K.; *Chem. Pharm. Bull.*, **1982**, 30, p. 3255.
116. Kosuge, T.; Tsuji, K.; Hirai, K.; Fukuyama, T.; *Chem. Pharm. Bull.*, **1985**, 33, p. 3059.
117. *Atlantic Research Laboratory Technical Report* 56, NRCC 29083; 57, NRCC 29086.

118. Subba Rao, D. V.; Quilliam, M. A.; Pocklington, R.; *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **1988**, *45*, p. 2076.
119. Maranda, L.; Wang, R.; Masuda, K.; Shimizu, Y.; *Toxic marine phytoplankton*, 1989, p. 300.
120. Shimizu, Y.; Gupta, S.; Masuda, K.; Maranda, L.; Walker, C. R.; Wang, R.; *Pure Appl. Chem.*, **1989**, *61*, p. 513.
121. Fritz, L.; Quilliam, M. A.; Wright, J. L. C.; Beale, A. M.; Work, T. M.; *J. Phycol.*, **1992**, *28*, p. 439.
122. Daigo, K.; *Yakugaku Zasshi*, **1959**, *79*, p. 353.
123. Murakami, S.; Takemoto, T.; Shimizu, S.; *Yakugaku Zasshi*, **1953**, *73*, p. 1026.
124. Laycock, M. V.; Bird, C. J.; *Abstract of papers*, Vancouver, Canada, **1989**, A-87.
125. Ramsey, U.; Douglas, D.; Douglas, S.; Walter, J. A.; Wright, J. L. C.; *Abstract of papers*, Baltimore, **1991**, p. 70.
126. Zaman, L.; Arakawa, O.; Shimosu, A.; Onoue, Y.; Nishio, S.; Shida, Y.; Noguchi, T.; *Toxicon*, **1997**, *35*, p. 205.
127. Wang, R.; Shimizu, Y.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1990**, p. 413.
128. Wang, R.; Shimizu, Y.; Rios Steiner, J. R.; Clardy, J.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1993**, p. 379
129. Wang, R.; *Ph. D. thesis*, University of Rhode Island, **1992**.
130. Mynderse, J. S.; Moore, R. E.; Kashiwagi, M.; Norton, T. R.; *Science*, **1977**, *196*, p. 538.
131. Mynderse, J. S.; Moore, R. E.; *J. Org. Chem.*, **1978**, *43*, p. 2301.

132. Cardellina, J. H.; Marner, F. J.; Moore, R. E.; *Science*, **1979**, *204*, p. 193.
133. Marner, F. J.; Moore, R. E.; Hirotsu, K.; Clardy, J.; *J. Org. Chem.*, **1977**, *42*, p. 2815.
134. Cardellina, J. H.; Marner, F. J.; Moore, R. E.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, *101*, p. 240.
135. Pettit, G. R.; Kamano, Y.; Dufresne, C.; Cerny, R. L.; Herad, C. L.; Schmidt, J. M.; *J. Org. Chem.*, **1989**, *54*, p. 6005.
136. Carmely, S.; Kashman, Y.; *Tetrahedron Lett.*, **1985**, *26*, p. 511.
137. Kobayashi, M.; Tanaka, J.; Katori, T.; Matsuura, M.; Kitagawa, I.; *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, p. 2963.
138. Rinehart, K. L.; Harada, K.; Namikoshi, M.; Chen, C.; Harvis, C. A.; Munro, M. H. G.; Blunt, J. W.; Mulligan, P. E.; Beasley, V. R.; Dahlem, A. M.; Carmichael, W. W.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, p. 8557.
139. Carmichael, W. W.; *Handbook of natural toxins*, **1988**, *3*, p. 121.
140. Lewin, R. A.; Cheng, L.; *Prochloron*, **1989**.
141. Rinehart, K. L.; Kishore, V.; Bible, K. C.; Sakai, R.; Sullins, D. W.; Li, K. M.; *J. Nat. Prod.*, **1988**, *51*, p. 1.
142. Yotsu-Yamashita, M.; Haddock, R. L.; Yasumoto, T.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, p. 1147.
143. Maeda, M.; Kodama, T.; Tanaka, T.; Yoshizumi, H.; Takemoto, T.; Nomoto, K.; Fujita, T.; *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28*, p. 633.
144. Kosuge, T.; Tsuji, K.; Hirai, K.; Fukuyama, T.; *Chem. Pharm. Bull.*, **1985**, *33*, p. 3059.

145. McMahon, T.; Silke, J.; *Harmful Algae News*, **1996**, *14*, p. 2.
146. Satake, M.; Ofuji, K.; Naoki, H.; James, K. J.; Furey, A.; McMahon, T.; Silke, J.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, p. 9967.
147. Ito, E.; Satake, Ofuji, K.; Kurita, N.; McMahon, T.; James, K.J.; *Toxicon*, **2000**, *38*, p.917.
148. Ito, E.; Terao, K.; McMahon, T.; Silke, J.; Yasumoto, T. *Harmful Algae. IOC of UNESCO*, **1988**, p. 588.
149. a) Hu, T.; Curtis, J. M.; Oshima, Y.; Quilliam, M. A.; Walter, J. A.; Watson-Wright, W. M.; Wright, J. L. C. *J. Chem. Soc. Commun.* **1995**, p. 2159. (b) Hu, T.; Curtis, J. M.; Walter, J. A.; Wright, J. L. C. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, p. 7671.
150. Cembella, A. D.; Lewis, N. I.; Quilliam, M. A.; *Phycologia.* **2000**, *39*, p. 67.
151. Marasovic, I.; Pucher-Petkovic, T.; *Rapp Comm Int Mer Médit* **1985**, *29*, p.137.
152. Gawley, R. E., Rein, K. S., Kinoshita, M., Baden,D. G.; *Toxicon*, **1992**, *30 (7)*, p.780.
153. Holmes, M. J.; Lewis, R. J.; Jones, A.; Hoy, A. W., *Natural toxins*, **1995**, *3(5)*, p. 355

Capitolo 5

5.1 Contaminazione di invertebrati marini

I molluschi bivalvi, i gastropodi, i granchi, le aragoste e altri invertebrati marini accumulano le biotossine sia per filtrazione diretta delle acque del mare e del plancton ivi disperso, come nel caso dei molluschi filtranti, sia per ingestione di organismi contaminati, come nel caso degli invertebrati carnivori e di quelli spazzini.

Il grado di contaminazione degli invertebrati è specifico per ogni specie, e in genere, è direttamente correlato alla concentrazione di cellule microalgali tossiche nel plancton¹.

Il grado di decontaminazione dipende, in primo luogo, dalla stagione e dalla temperatura delle acque²: basse temperature, infatti, ritardano l'eliminazione delle tossine, benché non sia del tutto noto il meccanismo con cui la temperatura influenzi l'accumulo e l'eliminazione delle tossine³. In secondo luogo, esso dipende dalla parte dell'organismo in cui le tossine vengono accumulate: quelle presenti nel tratto gastrointestinale sono eliminate più velocemente di quelle che invece si legano ad altri tessuti.

Ben pochi dati si hanno sul meccanismo di ritenzione delle tossine da parte di organismi carnivori gastropodi e da parte dei granchi. Le principali informazioni riguardano i molluschi bivalvi, anche grazie alle loro diffuse acquicoltura.

E' noto, per esempio, che i mitili accumulano tossine PSP più velocemente di qualsiasi altra specie, ma al tempo stesso sono anche in grado di eliminarle molto rapidamente; le ostriche, invece, sono più lente ad accumulare sostanze tossiche, ma restano contaminate per un tempo più lungo⁴⁻⁵. Vi sono poi delle specie che riescono a conservare le tossine anche per anni, come accade ad esempio per i pettini, che le rilasciano addirittura in un periodo di tempo che mediamente supera i due anni.

Talune specie di bivalvi, come la *Mercenaria mercenaria*, hanno la capacità di evitare la contaminazione da dinoflagellati tossici⁶. Infatti, nel 1972 durante una fioritura di *Alexandrium tamarense* lungo le coste del Massachusetts, la pesca fu interdetta a causa della forte contaminazione da PSP tossine. Addirittura, in quell'occasione, saggi su campioni di molluschi rivelarono un contenuto di circa 3000-5000µg di tossine per 100 g di molluschi, con dei picchi di tossicità soprattutto nei mitili. Nessun campione di *Mercenaria mercenaria* o di ostriche, invece, risultò tossico. Studi successivi hanno dimostrato che la *Mercenaria mercenaria*, in presenza di *A. tamarense*, dapprima ritira il proprio sifone e poi si isola totalmente dall'ambiente circostante, chiudendo la valvola della conchiglia, fino a quando le acque non tornano pure. Non è escluso, che quest'organismo adotti lo stesso comportamento anche in presenza di altri dinoflagellati.

Oltre alle PSP-tossine, anche altre sostanze tossiche vengono accumulate dai molluschi filtranti, rappresentando un forte rischio per la salute pubblica.

Le DSP-tossine, come l'acido okadaico e le DTX, le pectenotossine e la yessotossina, associate alla presenza di *Dinophysis* spp. e di *Prorocentrum* spp., sono facilmente accumulate dai molluschi ma ben poco è noto sulla durata della

contaminazione. Marcaillou-Le Baut et al. nel 1993 hanno confrontato le velocità di decontaminazione da DSP tossine di campioni di mitili presenti in acquicoltura e in laboratorio, dimostrando che la decontaminazione avviene più velocemente nell'ambiente naturale che in laboratorio. Ciò suggerisce che la qualità del cibo disponibile per i mitili durante la detossificazione è un fattore determinante per la velocità con cui le tossine vengono eliminate.

Più recentemente, è stato dimostrato che anche l'acido domoico e i suoi analoghi sono facilmente accumulati da organismi filtranti. Nel 1987, infatti, si è verificato in Canada una misteriosa e grave intossicazione, conseguente all'ingestione di *Mytilus edulis* coltivati. I sintomi dell'avvelenamento includevano vomito, diarrea, confusione mentale, perdita della memoria, disorientamento e coma. Tre pazienti anziani sono morti, e altre vittime hanno riportato danni neurologici permanenti. L'acido domoico è stato individuato come la sostanza responsabile dell'intossicazione, e il termine *amnesic shellfish poisoning* (ASP) è stato coniato per indicare l'insieme dei sintomi clinici.

. In conclusione, si può affermare che le differenze nell'accumulo e nella ritenzione di tossine dipendano dal tipo di invertebrato, dalla specie di alga presa in esame e da altri fattori non ancora ben razionalizzati. In ogni modo, bisognerebbe tener conto di queste considerazioni nel momento in cui si va a scegliere una specie da coltivare in acquicoltura, in un luogo dove si potrebbero registrare fioriture di alghe tossiche.

5.2 Procedure di detossificazione degli invertebrati

L'incremento degli *algal blooms* verificatosi negli ultimi decenni, richiede una maggiore sorveglianza delle acque marine e la messa a punto di programmi internazionali, che si propongano di studiare e di gestire in modo adeguato le fioriture di alghe nocive e le loro gravi ripercussioni sull'ambiente, sull'economia e soprattutto, sulla salute degli uomini. Il rischio delle intossicazioni si riduce, infatti, solo se si attuano controlli con le risposte più rapide possibili e se il numero dei campioni controllati è il più alto possibile.

Non esistono terapie specifiche contro le biotossine algali. Esse, infatti, essendo ionofore, colpiscono a livello cellulare il trasporto di ioni (pompa del sodio e del potassio). Nella maggior parte dei casi quello che si può fare è eliminare i residui tossici dall'apparato digerente, qualora l'intossicazione sia colta nella fase iniziale, attraverso lavanda gastrica o con polveri di carbone attivo. Nei casi di paralisi respiratoria si può ricorrere anche alla respirazione artificiale.

Per questo motivo, in Italia, il settore della produzione e immissione sul mercato dei molluschi bivalvi vivi (mitili o cozze, vongole, ostriche), destinati al consumo umano diretto o alla loro trasformazione prima del consumo, è disciplinato, per quanto riguarda gli aspetti sanitari, dal Decreto Legislativo 30 dicembre 1992 n°530 recante attuazione della direttiva 91\492\CEE.

Il controllo sanitario del settore dei molluschi bivalvi si basa sul controllo delle acque di mare o di laguna dove questi animali sono allevati. In pratica, in ragione delle caratteristiche microbiologiche, chimiche, biotossicologiche dei molluschi pescati in una determinata zona, si procede alla classificazione della

stessa zona di mare. Tale classificazione determinerà il destino produttivo e commerciale di questo prodotto.

Attualmente sono previste 3 diverse tipologie di zone di allevamento e pesca dei molluschi:

ZONA A: prodotto destinato al consumo umano diretto (i molluschi devono possedere gli specifici requisiti sanitari previsti al Cap. V dell'allegato al già citato decreto legislativo n. 530\92).

ZONA B: prodotto destinato alla depurazione o alla stabulazione prima dell'immissione in commercio ai fini del consumo umano.

ZONA C: prodotto destinato ad una stabulazione di lunga durata ed a processi depurativi intensi o all'industria di trasformazione.

Il metodo di detossificazione più usato prevede il trasferimento dei molluschi tossici in acque prive di plancton tossico, per permettere l'autodepurazione. Tale metodo, tuttavia, non è applicabile a quegli invertebrati (ostriche, pettini) che hanno meccanismi di decontaminazione molto lenti.

Senza contare che il trasferimento di grosse quantità di molluschi da un'area contaminata ad un'altra non contaminata è al tempo stesso faticoso e molto dispendioso.

Per ridurre la contaminazione da PSP tossine, sono stati fatti tentativi di stratificazione dei mitili in una colonna d'acqua, ma l'esperimento ha avuto successo soltanto in presenza di alti livelli di tossicità.

Shock elettrici o l'impiego di cloro riducono la durata di contaminazione dei pettini⁷; ma, al tempo stesso, alterano le proprietà organolettiche del prodotto, diminuendone l'appetibilità.

Recentemente è stato proposto l'impiego dell'ozono, ma al riguardo persistono ancora diversi dubbi. Infatti, se da un lato è stata effettivamente registrata una diminuzione del grado di contaminazione da PSP tossine, ad esempio nei molluschi esposti a fioriture di *A. tamarense*, *A. catenella* e *Gymnodinium breve*⁸⁻¹¹, dall'altro non si è avuto nessun risultato utile nel caso in cui la contaminazione era dovuta alla presenza di *Pyrodinium bahamense*. Inoltre, esperimenti condotti sui mitili hanno evidenziato come il trattamento con ozono effettivamente prevenga l'accumulo di tossine da parte di tali molluschi, senza che vi sia alcuna alterazione dei mitili stessi. L'uso dell'ozono non ha, però, sicuramente successo in quelle specie di invertebrati che accumulano cisti di microrganismi, o che legano le tossine ai propri tessuti per lunghi periodi di tempo.

Al momento, comunque, non esistendo ancora un metodo di detossificazione efficace, rapido ed universale ed essendo ancora elevati i costi di simili trattamenti, si punta per lo più ad un costante e attento monitoraggio delle zone esposte a fioriture algali, e alla coltivazione di specie che hanno tempi di decontaminazione più brevi, come i mitili, riducendo, invece, al minimo le coltivazioni di pettini e di ostriche¹².

5.3 Riferimenti bibliografici

1. Sribhibhadh, A.; *Thesis*, Univ. of Washington, **1963**.
2. Prakash, A.; Medcof, J. C.; Tennant, A. D.; *Bull. Fish. Res. Bd. Canada*, **1971**, 177, p. 87.
3. Madenwald, N. D.; *Toxic Dinoflagellates*, **1985**, p. 479.

4. Desbiens, M.; Cembella, A. D.; *Proceedings of the 6th International Conference on Toxic Marine Phytoplankton*, Nantes, **1994**.
5. Shumway, S. E.; Sherman, S. A.; Cembella, A. D.; Selvin, R.; *Natural Toxins*, **1994**, 2, p. 236.
6. Shumway, S. E.; Cucci, T. L.; *Aquat. Toxicol.*, **1987**, 10, p. 9.
7. Kodama, M.; Ogata, T.; Sato, S.; Inoguchi, N.; Shimizu, M.; Daido, H.; *Toxicon*, **1989**, 27, p. 55.
8. Thurberg, F. P.; *Aquatic Application of Ozone*, **1975**, p. 50.
9. Blogoslawski, W.; Brown, C.; Rhodes, E.; Broadhurst, M.; *Proc. First Inter. Symp. On Ozone for Water and Wastewater Treatment*, New York, **1975**, p. 684.
10. Dawson, M. A.; Thurberg, F. P.; Blogoslawski, W.; Sasner, J. J.; Ikawa, M.; *Proc. Fourth Food-Drug from the Sea Conference*, Washington, **1976**, p. 152.
11. Blogoslawski, W.; Stewart, M. E.; *Mar. Biol.*, **1978**, 45, p. 261.
12. Shumway, S. E.; Sherman-Caswell, S.; Hurst, J. W.; *J. Shellfish Res.*, **1988**, 7, p. 643.

Capitolo 6

6.1 Le biotossine marine in Italia

L'incremento delle fioriture di dinoflagellati ed i conseguenti casi di avvelenamento per ingestione di molluschi contaminati, sono fenomeni che da circa due decenni si manifestano anche in Italia rappresentando motivo di seria preoccupazione per la salute pubblica. Non trascurabili sono anche i danni economici a tutta l'industria ittica che conseguono all'insorgere della tossicità; tutte le attività connesse alla pesca e all'allevamento di mitili eduli subiscono infatti un repentino arresto nel momento in cui si manifesta la tossicità.

L'area responsabile del 90% della produzione italiana di mitili è situata lungo le coste del mar Adriatico settentrionale¹, dove, a partire dal 1975, si sono verificati ricorrenti casi di maree rosse². Il fenomeno delle fioriture è diventato sempre più frequente nelle acque costiere dell'Emilia Romagna, ma talvolta ha interessato aree molto più ampie della costa Adriatica nord-occidentale. Nessuna fioritura tossica è stata descritta fino al 1989, quando sono stati riportati i primi episodi di intossicazione da DSP in pazienti che avevano ingerito mitili (*Mytilus galloprovincialis*) raccolti dal Mar Adriatico settentrionale².

Tuttavia, la presenza di cellule di *Dinophysis fortii* nell'epatopancreas dei molluschi, nonché la presenza di tossine liposolubili di tipo DSP nei tessuti dei mitili raccolti nelle acque dell'Emilia Romagna ha permesso di provare che alcuni casi di disturbi gastro-intestinali nei consumatori di molluschi non fossero dovuti a batteri o virus, ma ad intossicazioni da tossine DSP³. Sfortunatamente, le

epidemie da DSP, associate a fioriture di microalghe nocive, portate alla luce dal Centro di Ricerche di Risorse Biologiche Marine di Cesenatico e dall'Università di Bologna, si sono poi estese anche lungo le coste delle Marche, dell'Abruzzo, del Veneto e del Friuli Venezia Giulia⁴.

In un primo momento, la presenza di enterotossine negli alimenti marini è stata rivelata attraverso il metodo di McFarren (test biologico per la ricerca di biotossine liposolubili prodotte da alghe), secondo le previsioni della legge italiana; in un secondo stadio si è ricorsi anche al metodo di Yasumoto⁵.

La ricerca condotta nei laboratori di Cesenatico dal giugno 1989 al marzo 1991 con i fondi regionali dell'Emilia Romagna, secondo quanto prescritto dalla legislazione nazionale riguardo ai molluschi tossici, ha dimostrato che i livelli di tossine DSP, presenti nei mitili delle zone costiere dell'Emilia Romagna, erano tali da non permettere la vendita dei molluschi stessi per un periodo di ben otto mesi.

Il perdurare della tossicità per periodi consecutivi, da giugno 1989 fino a gennaio 1990 e da giugno 1990 a gennaio 1991, ha indicato che non ci si trovava dinanzi ad un problema occasionale, per cui era necessario far fronte ai rischi, al tempo stesso, economici e sanitari, presenti già in altri paesi della Comunità Europea. Un gran numero di nazioni europee ha stabilito dei limiti di tolleranza per le tossine DSP applicabili sia ai mitili prodotti in territorio nazionale sia a quelli importati; ma tali livelli variano fortemente da paese a paese, non essendo stati stabiliti, ad esempio, da organizzazioni internazionali come la *World Health Organization*. Nel frattempo, in diversi stati europei, Italia compresa, sono stati introdotti per le tossine DSP dei piani di sorveglianza, che prevedono l'analisi

sistematica delle acque del mare, del fitoplancton, dei molluschi, al fine di individuare cellule di *Dinophysis* spp. e di enterotossine.

Solo recentemente, con una decisione della Commissione Europea del 15 marzo 2002, che fissa norme specifiche per l'attuazione della Direttiva 91/492/CE del Consiglio, sono stati definiti i tenori massimi consentiti di alcune delle principali biotossine marine nei molluschi bivalvi e in altri organismi⁶, come riportato in maniera più dettagliata nel paragrafo 6.2.

Proprio in quest'ambito, il gruppo di ricerca del Prof. E. Fattorusso ha intrapreso, nel 1992, uno studio sulle biotossine marine, che si realizza attraverso analisi periodiche dei molluschi coltivati presso le coste dell'Emilia Romagna, nei periodi di massima proliferazione algale.

E' stato così possibile stabilire che gli epatopancreas di *Mytilus galloprovincialis* tossici contenevano quantità apprezzabili di acido okadaico, identificato mediante tecniche di spettroscopia NMR, in quantità superiori a 100 µg per 600 g di tessuto di epatopancreas. Questo risultato ha rappresentato la prima sicura evidenza della presenza di tossine DSP lungo le coste italiane⁵. Oltre all'acido okadaico, comunque, erano presenti anche altre sostanze tossiche non ben identificate.

In aggiunta alle tossine DSP, che rappresentavano la principale fonte di avvelenamento dei mitili del mar Adriatico, anche le PSP-tossine sono state ritrovate nel corso delle analisi effettuate nel 1994.

Il problema delle tossine PSP è apparso nel mar Mediterraneo solo agli inizi degli anni '90, quando sono state ritrovate nei mitili prodotti in Spagna⁶; la presenza delle tossine paralitiche si è estesa nel mar Adriatico soltanto nel 1994,

dove, benché presenti in basse quantità, hanno sollevato tutti i problemi associati comunque all'avvelenamento da questo tipo di tossine.

Attraverso delle analisi con tecniche di HPLC fluorimetrico, è stata rinvenuta presso il nostro Dipartimento la presenza di due tossine della classe delle PSP, la gonyautossina 2 (GTX-2) e la gonyautossina 3 (GTX-3)⁷. La tossicità totale, in quell'anno, si aggirava intorno a 0.10 MU g/l, ben al di sotto cioè dei livelli rilevabili con saggi biologici su topi. La bassa tossicità era dovuta essenzialmente a due fattori: i mitili potevano essere stati contaminati da dinoflagellati presenti in concentrazioni davvero basse; oppure, potevano essere andati incontro a fenomeni di depurazione prima di essere raccolti. Non è ancora chiaro quale fosse l'organismo responsabile di quest'avvelenamento dei mitili, anche se tra i dinoflagellati ritenuti produttori di tossine PSP siano stati riscontrati nel mar Adriatico l'*Alexandrium tamarense* e l'*Alexandrium minutum*.

La prima specie ha avuto una fioritura lungo le coste dell'Emilia Romagna nel 1982⁸, senza, però, causare alcun fenomeno tossico, per quanto si potrebbe supporre che nei campioni di mitili vi fossero concentrazioni troppo basse di PSP per poter essere rivelate con i metodi di laboratorio utilizzati allora. Per quanto riguarda, invece, l'*Alexandrium minutum*, non sono stati ancora eseguiti degli studi circa la sua tossicità nel mar Adriatico⁹. Tuttavia, delle analisi eseguite nell'Australia meridionale su questa specie di dinoflagellato hanno mostrato un profilo di tossicità, contenente soltanto la GTX 1 e la GTX 4¹⁰. L'assenza delle tossine C-1, C-2, C-3 e C-4, come pure della saxitossina e della neosaxitossina nei nostri campioni potrebbe far pensare proprio all'*Alexandrium minutum* come ad una probabile fonte di PSP-tossine nel mar Adriatico⁷.

Successivamente, nel 1995, sono state osservate discrepanze tra il saggio sul topo e i risultati dell'HPLC nei molluschi italiani, che suggerivano la presenza di altre sostanze con effetti sia tossici che sinergici della tossicità algale osservata nei topi. In questa occasione, per la prima volta nei mitili italiani, è stata isolata dal gruppo di ricerca del prof Fattorusso, la yessotossina in quantità relativamente alte, insieme a tracce di acido okadaico¹.

Da quel momento in poi, la YTX è diventata la principale tossina del mar Adriatico.

Insieme alla yessotossina, sono stati isolati alcuni suoi analoghi, l'omoyessotossina (homoYTX)¹¹, la 45-idrossiyessotossina (45-OHYTX)¹² e la 45-idrossiomoyessotossina (45-OHhomoYTX)¹¹, la cui caratterizzazione è avvenuta per confronto delle loro proprietà cromatografiche e spettroscopiche con quelle riportate in letteratura.

In seguito, sono stati isolati e caratterizzati strutturalmente molti nuovi analoghi della YTX dall'epatopancreas dei mitili del mar Adriatico, come l'adriatossina (ATX)¹³, la carbossiyessotossina (COOH-YTX)¹⁴, la carbossiomoyessotossina (COOHhomoYTX)¹⁵ e la 42, 43, 44, 45, 46, 47, 55-eptanor- 41- oxoomoYTX (noroxohomoYTX)¹⁶. Tutti questi nuovi analoghi sono stati isolati in forma pura, e le loro strutture chimiche determinate sulla base delle evidenze spettrali, in particolare mediante esperimenti ¹H-NMR mono e bidimensionali, ed esperimenti di LC-MS/MS.

I risultati degli studi effettuati indicavano che la composizione e l'abbondanza relativa delle YTX nei bivalvi sembrava variare in base al territorio, alle stagioni, e annualmente, come già osservato per le altre tossine DSP. Per cui,

si è reso necessario monitorare la presenza di queste tossine almeno finché i loro potenziali rischi sulla salute umana non fossero meglio compresi, soprattutto in considerazione della tossicità variabile basata su una diversa struttura chimica.

L'identificazione dell'organismo/i responsabile della produzione dei derivati della YTX è stata di cruciale importanza per il successivo controllo dei molluschi tossici. Nel 1997, Yasumoto et al. hanno identificato nel dinoflagellato *Prorocentrum reticulatum*, raccolto in Nuova Zelanda, l'organismo produttore della YTX¹⁷. Successivamente, la YTX è stata rivelata anche dal *P. reticulatum* dell'Adriatico¹⁸, e insieme alla 45, 46, 47- trinoryessotossina, nella famiglia della stessa specie raccolta in Giappone¹⁹. Nel 1999, fu osservata un'estesa fioritura di *Lingulodinium polyedrum* (*Gonyaulax polyedra*) nel mar Adriatico nord-occidentale, suggerendo che questo organismo, fosse un altro produttore della YTX e della omoYTX, che proprio in quel momento erano stati osservati nei molluschi e nel fitoplancton²⁰⁻²¹.

Tuttavia, l'origine biogenetica di tutti gli altri analoghi della YTX era ancora sconosciuta, sollevando così il dubbio se questi fossero derivati da una conversione metabolica della YTX nei molluschi o prodotti propri delle diverse specie di dinoflagellati.

Per accertare la loro origine, è stata analizzata una coltura della specie *P. reticulatum* (*Gonyaulax grindley*) raccolta lungo le coste di Cesenatico (Emilia Romagna, Italia) nel giugno 2001²². Il profilo tossico dettagliato di questa specie, ottenuto mediante HPLC accoppiata ad uno spettrometro di massa (LC-MS) ha permesso di identificare il *P. reticulatum* come l'origine biogenetica dei derivati della YTX così isolati dai mitili italiani, ossia la 45-OHYTX, l'omoYTX, la

carbossiYTX, e la noroxoYTX. Inoltre, è stato evidenziato che il *P. reticulatum* adriatico fosse in grado di produrre composti appartenenti sia alla serie delle YTX che alle omoYTX, laddove precedenti studi suggerivano la presenza di due diversi organismi responsabili della produzione di ciascuna serie omologa.

Oltre a ciò, questi risultati indicavano che la maggior parte dei derivati delle YTXs dell'Adriatico fossero i reali prodotti del dinoflagellato e non derivassero dalla conversione metabolica della YTX nei molluschi. Infine, è stato notato che il profilo tossico del *P. reticulatum* rivelato dall'analisi con LC/MS sembrava essere più complesso di quello precedentemente determinato da altri autori^{11,18-21}. Probabilmente, ciò era dovuto al diverso metodo analitico impiegato, sebbene non si possa escludere una differente produzione di tossine nelle diverse specie.

All'inizio del nuovo millennio, il profilo tossico del mar Adriatico ha subito, ancora una volta, un ulteriore cambiamento. Infatti, il problema del possibile rischio sanitario associato alle tossine ASP è stato sollevato in seguito alla comparsa di aggregati mucillaginosi contenenti diatomee del genere *Nitzschia*.

L'analisi effettuata su campioni di *Mytilus galloprovincialis* raccolti nel periodo tra il 2000 e il 2004 ha permesso di dimostrare la presenza, per la prima volta in Italia, dell'acido domoico, la principale tossina responsabile dell'avvelenamento ASP²³. L'analisi dei campioni è stata effettuata presso i laboratori del prof Fattorusso mediante un nuovo metodo LC-MS, il cosiddetto metodo HILIC che accoppia la cromatografia liquida ad interazioni idrofiliche con la spettrometria di massa. Questo metodo di rivelazione strumentale, grazie alla sua alta sensibilità, ha permesso di determinare quantità di acido domoico estremamente basse, fortunatamente ben al di sotto dei massimi livelli consentiti

(20 µg/g); ciononostante, si è reso necessario un costante monitoraggio del DA, data la sua alta pericolosità, nei mitili del mar Adriatico Settentrionale, al fine di prevenire i rischi associati alla sua presenza.

Nel corso dell'indagine sui mitili del Mar Adriatico, in aggiunta alle tipiche biotossine polieteree, a partire dal 1998 sono state ritrovate dal prof Fattorusso nuove classi di tossine, che differiscono completamente da quelle classiche, ma che destano un grande interesse a causa della loro attività citotossica, rappresentando così un ulteriore pericolo per la salute pubblica.

Un esempio di queste citotossine, è rappresentato dai clorosolfolipidi, una classe di composti isolata per la prima volta alla fine degli anni '60 da alcune microalghe d'acqua dolce. Sono composti di origine naturale abbastanza insoliti; generalmente costituiscono il 15% dei lipidi totali delle microalghe che li sintetizzano.

In base alle caratteristiche strutturali, i clorosolfolipidi isolati in precedenza possono essere suddivisi in due principali categorie: Policlorodocosano-1,14-disolfati e Policlorotetracosano-1,15-disolfati^{24,25}. Entrambe le classi sono caratterizzate da atomi di cloro presenti in numero variabile da 1 a 6, disposti in vario modo sulla catena alifatica, e da una spiccata polarità rappresentata dalla presenza di esteri solforici, collocati in genere sulle terminazioni della molecola.

Nella maggior parte dei casi non è stato possibile determinare l'esatta localizzazione degli atomi di cloro.

Il ruolo dei clorosolfolipidi non è ancora noto, mentre sono stati ottenuti dei risultati interessanti sull'origine biogenetica di queste molecole.

Durante il processo di monitoraggio effettuato dal gruppo di ricerca del prof Fattorusso sui mitili tossici del Mar Adriatico, sono stati isolati tre composti, che possono essere inclusi nella classe dei solfolipidi, anche se strutturalmente molto diversi da quelli precedentemente trovati. Il primo composto è un esacloromonosolfato²⁶, il secondo e il terzo contengono 11 atomi di cloro, oltre ad un'esterificazione con un acido grasso²⁷ (fig. 1).

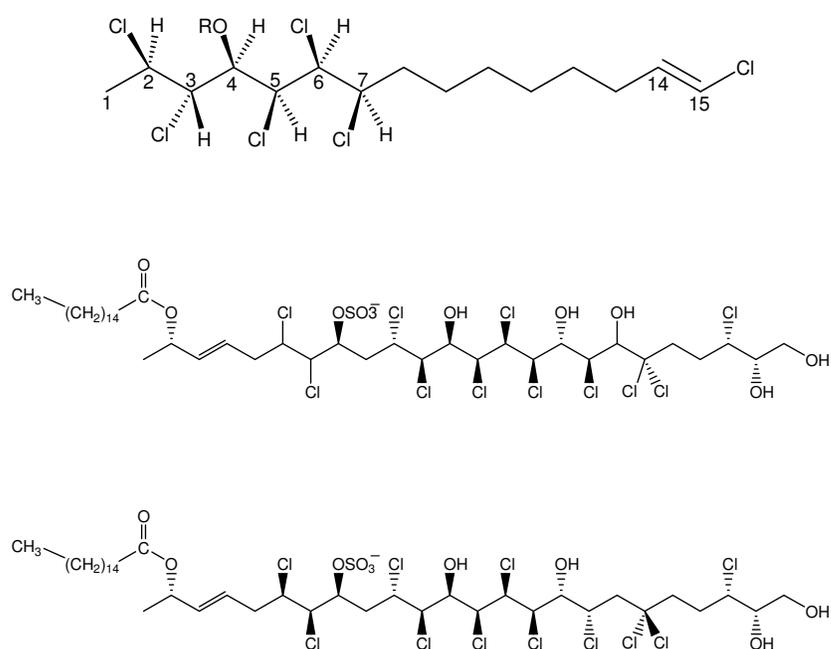


Figura 1. Struttura dei clorosolfolipidi

Nel 1998, un'analisi chimica delle ghiandole digestive del *Mytilus galloprovincialis* raccolta dal Mar Adriatico ha condotto, invece, all'isolamento di tre nuovi composti, l'oxazinina-1, l'oxazinina-2 e l'oxazinina-3²⁸ (fig. 2); i nuovi composti sono stati analizzati per l'attività citotossica e l'oxazinina-1 ha mostrato la sua capacità di inibire la crescita delle linee cellulari WEHI 164 e J774 in vitro.

La delucidazione strutturale è stata realizzata grazie all'utilizzo di tecniche spettroscopiche che includevano un'estesa analisi degli esperimenti 2D NMR e calcoli di meccanica molecolare, mentre per la determinazione della loro stereochimica assoluta l'approccio sintetico, messo a punto da Couladourous et al.²⁹, è stato determinante.

Negli anni successivi le oxazinine non sono state più ritrovate, fino all'analisi di una partita di mitili raccolta nelle acque costiere dell'Emilia Romagna nel marzo 2002, dove sono state ritrovate in quantitativi inferiori rispetto alla prima volta, insieme ad un altro nuovo derivato, quale l'oxazinina-4³⁰ (fig. 2).

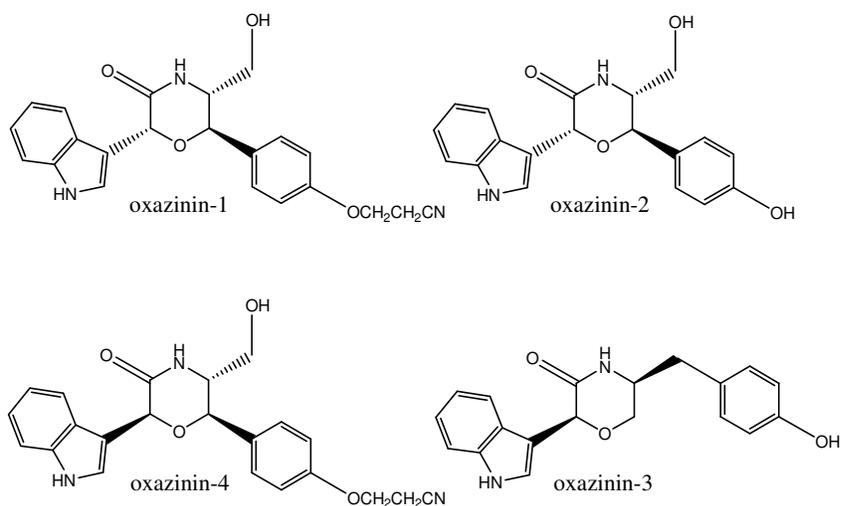


Figura 2. Struttura delle oxazinine -1, -2, -3 e -4

6.2 Tenori massimi delle biotossine algali nei molluschi eduli

L'Unione Europea ha proposto normative sanitarie, limiti di tolleranza e metodi di analisi ufficiali per tutte le tossine responsabili delle intossicazioni alimentari conseguenti al consumo di molluschi eduli. In particolare, il Ministero della Salute ha sancito con decreto del 16 Maggio del 2002 i seguenti tenori massimi di biotossine algali nonché le metodiche per la loro determinazione:

Classi di Tossine	Tenori massimi per le biotossine
Acido okadaico	160 µg eq OA/Kg
Yessotossina	1mg eq YTX/Kg
PSP-tossine	800 µg eq STX/Kg
ASP-tossine	20 µg eq DA/g

6.3 Conclusioni

Gli studi effettuati nel corso di questi anni hanno evidenziato uno scenario inusuale e in continua evoluzione della tossicità dei molluschi in Italia. Il profilo tossico nei mitili del Mar Adriatico differisce di gran lunga da quello degli altri Paesi, dove il fenomeno delle DSP è stato ampiamente approfondito, e dove, al contrario, i nuovi analoghi della YTX non sono mai stati riportati finora.

La presenza nei molluschi di molte tossine della classe delle YTX crea gravi inconvenienti dovuti all'insufficienza dei dati tossicologici per questo tipo di tossine e rende anche difficile la loro quantificazione in assenza di standard.

Inoltre, la presenza dei composti citotossici sopra riportati nei molluschi eduli, insieme alla contaminazione delle tossine DSP e YTX, aumenta il potenziale rischio alla salute umana, considerando che queste scoperte ampliano il profilo tossico del Mar Adriatico. Per prevenire i danni sanitari ed economici dovuti alla contaminazione delle fioriture di alghe marine, è necessario realizzare un attento monitoraggio, sia sulla vendita che sull'allevamento dei molluschi.

Nell'ambito di questo campo di ricerca si è inserito il mio lavoro di tesi, allo scopo non solo di monitorare la presenza di tossine marine, già note, nei mitili del mar Adriatico durante i periodi di massima fioritura delle microalghe tossiche, ma anche di chiarire la struttura chimica di nuove sostanze nocive per la salute pubblica, che compromettono la bontà degli alimenti di origine marina. In particolare, mi sono occupata dell'analisi tossicologica di due partite di mitili tossici raccolti rispettivamente nel 2004 (capitolo 7) e 2005 (capitolo 8) e di colture cellulari del dinoflagellato *Alexandrium ostenfeldii* fiorito nel mar Adriatico a partire dal novembre del 2003 (capitolo 9).

6.4 Riferimenti bibliografici

1. Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Magno, S.; Poletti, R.; Satake, M.; Viviani, R.; Yasumoto, T.; *Toxicon*, **1997**, 35, p. 177.
2. Boni, L.; Mancini, L.; Milandri, A.; Poletti, R.; Pompei, M.; Viviani, R.; *International Conference on Marine Toxins*, Bologna, **1990**.
3. Fattorusso, E.; *Tossine in alimenti marini*, Napoli, **1993**.
4. Viviani, R.; Boni, L.; Milandri, A.; Poletti, R.; Pompei, M.; *Atti Soc. It. Sci. Vet.*, **1990**, 44, p. 675.

5. Fattorusso, E.; Ciminiello, P.; Costantino, V.; Magno, S.; Mangoni, A.; Milandri, A.; Poletti, R.; Pompei, M.; Viviani, R.; *Marine Pollution Bulletin*, **1992**, *24*, p. 234.
6. Commissione Europea del **15 marzo 2002**
7. Viviani, R.; *Science of the Total Environment*, **1992**, p. 631.
8. Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Magno, S.; Oshima, Y.; Poletti, R.; Viviani, R.; Yasumoto, T.; *Marine Pollution Bulletin*, **1995**, *30*, p. 733.
9. Boni, L.; *Inf. Bot. It.*, **1983**, *15*, p. 18.
10. Honsell, G.; *Toxic Phytoplankton Bloom in the Sea*, **1993**, p. 127.
11. Satake, M.; Tubaro, A.; Lee, J.; Yasumoto, T. *Nat. Toxins* 1997, **5**, 107.
12. Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Magno, S.; Poletti, R.; Viviani, R.; *Toxicon* **1999**, *37*, p. 689.
13. Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Magno, S.; Poletti, R.; Viviani, R.; *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, p. 8897.
14. Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Poletti, R.; Viviani, R.; *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, *2*, p. 291.
15. Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Poletti, R.; Viviani, R.; *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13*, p. 770.
16. Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Poletti, R.; *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, 596.
17. Yasumoto, T. and Kusumi, T. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1853.
18. Boni, L.; Ceredi, A.; Guerrini, F.; Milandri, A.; Pistocchi, R.; Poletti, R.; Pompei, M. In *Harmful Algal Blooms- Proceedings of the 90th International Conference*, Horbart, Australia, Hallegraeff, G.M.;

- Blackburn, S.I.; Bolch, C.J.; Lewis, R.J. (Eds.), *Invergovernmental Oceanographic Commission of Unesco*, **2001**, p. 137.
19. Satake, M.; Ichimura, T.; Sekiguchi, K.; Yoshimatsu, S.; Oshima, Y. *Nat. Toxins* **1999**, *7*, p. 147.
20. Draisci, R.; Ferretti, E.; Palleschi, L.; Marchiafava, C.; Poletti, R., Milandri, A.; Ceredi, A.; Pompei, M. *Toxicon* **1999**, *37*, p. 1187.
21. Satake, M; Tubaro, A.; Lee, S.J.; Yasumoto, T. *Natural toxins* **1997**, *5(3)*, p. 107
22. Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Magno, S.; Guerrini, F.; Pistocchi, R.; Boni, L. *Toxicon* **2003**, *42(1)*, p. 7.
23. Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Magno, S.; Tartaglione, L.; Quilliam, M.A.; Tubaro, A.; Poletti, R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, p. 2030.
24. (a) Haines, T. H. *Ann. Rev. Microbiol.* **1973**, *27*, 403; (b) Haines, T. H. In *Lipids and Biomembranes of Eukaryotic Microorganism*, J. A. Erwin (Ed.), Academic Press, New York, **1973**, p. 197
25. Mercer, E. I. and Davies C. I. *Phytochemistry*, **1979**, *18*, 457.
26. Ciminiello, P.; Di Rosa, M.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Ianaro, A.; Poletti, R. *J. Org. Chem.* **2001**, *66 (2)*, 578.
27. Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Magno, S.; Di Rosa, M.; Ianaro, A.; Poletti, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, p. 13114
28. Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Magno, S.; Ianaro, A.; Di Rosa, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, p. 49.

29. Couladouros, E.A.; Moutsos, V. I.; Pitsinos, E. N. *Tetrahedron Letters* **2004**, *45(41)*, p. 7779.
30. Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Magno, S.; Santelia, F. U.; Moutsos, V.; Pitsinos, E. N.; Couladouros, E. A. *Tetrahedron* **2006**, *62*, p. 7738..

Capitolo 7

7.1 Analisi di una partita di mitili raccolta nel 2004

Durante lo scorso decennio, le yessotossine (YTX) sono state le principali tossine presenti nel Mar Adriatico, mentre le tossine DSP (*Diarrethic shellfish poisoning*), essenzialmente l'acido okadaico (OA) e i suoi derivati, che sono stati predominanti agli inizi degli anni '90, dal 1995 sono lentamente diminuiti fino a scomparire intorno all'inizio del nuovo millennio (Figura 1)¹.

La differenza di pericolosità di queste due classi di tossine è essenziale. L'acido okadaico è ritenuto un composto molto più tossico a causa della sua potente attività *tumor promoting*², mentre la YTX , la cui tossicologia presenta ancora molti punti oscuri, ha sicuramente una minore tossicità per via orale³.

Ciononostante, la YTX e l'OA mostrano una potenza letale pressoché uguale se testate con il saggio biologico del topo.

In considerazione della relativa pericolosità alla salute pubblica, l'Unione Europea (EU) ha recentemente stabilito diversi livelli di tolleranza nei molluschi per le tossine DSP e per le YTX (rispettivamente 16 µg di OA e 100 µg di YTX in 100 g di molluschi)⁴.

Di conseguenza, si è reso necessario istituire una nuova procedura ufficiale per l'analisi dei frutti di mare, in grado di separare le YTX e le tossine DSP in due fasi diverse (Schema 1). Infatti, il protocollo precedente non permetteva alcuna separazione tra YTX e le tossine DSP, per cui, il saggio sul topo⁵ – il metodo di

riferimento in Europa che permette di rivelare la tossicità nei frutti di mare- non poteva condurre ad alcuna preventiva ed affidabile stima delle tossine coinvolte.

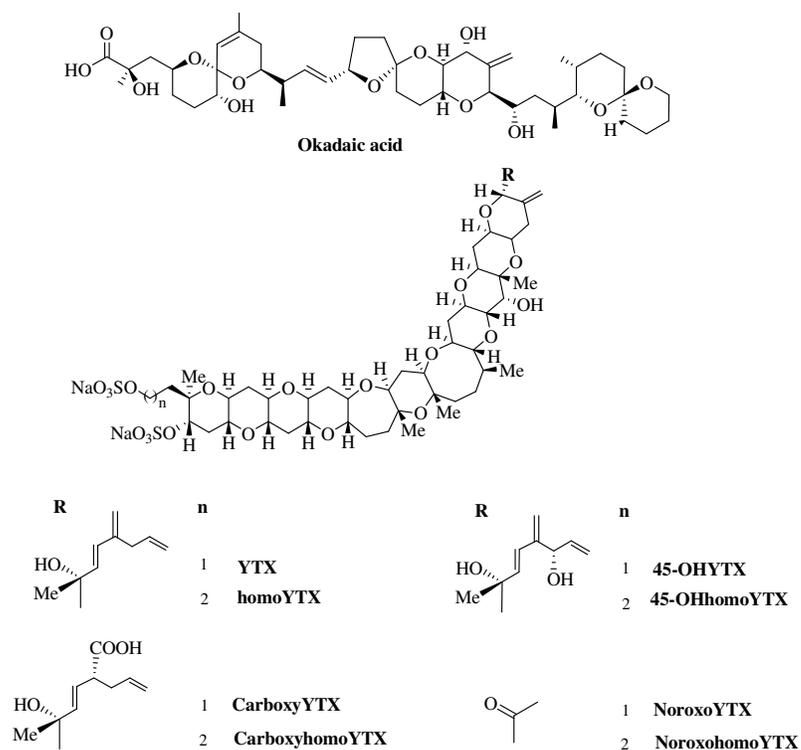
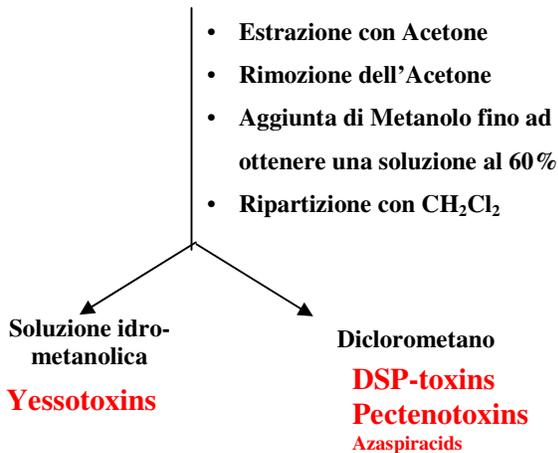


Figura 1. Principali tossine responsabili degli avvelenamenti da moluschi nel Mar Adriatico Settentrionale negli ultimi decenni.

Epatopancreas Mytilus galloprovincialis



Schema 1. Protocollo di estrazione per I molluschi tossici attualmente in vigore nella Comunità Europea.⁴

7.2 Risultati e discussione

Durante l'estate del 2004, gli enti nazionali deputati al monitoraggio continuo della tossicità nei mitili del Mar Adriatico notarono che la fase diclorometanica ottenuta dopo l'estrazione dei molluschi risultava più tossica di quella idro-metanolica. Quando abbiamo analizzato una partita di mitili tossici raccolta dal mar Adriatico nell'ottobre 2004, solamente la fase DCM dava un risultato positivo al saggio sul topo. Ciò ha rivelato un cambiamento nel profilo tossicologico messo in risalto da una diminuzione delle yessotossine e da un ritorno delle tossine DSP.

Inizialmente, la frazione tossica CH_2Cl_2 ottenuta da 100 g di mitili è stata analizzata attraverso LC/MS (cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa)⁶. Con grande sorpresa, non è stato registrato alcun picco relativo né alle

DSP tossine né alle altre principali tossine lipofile che sono abitualmente co-estratte nella fase CH_2Cl_2 , come le pectenotossine e gli azaspiracidi.

Pertanto, apparve evidente che ci si trovava di fronte ad una nuova classe di biotossine. Per tale motivo, abbiamo eseguito l'estrazione dei mitili su larga scala, che si è rivelata essere una procedura lunga e laboriosa, a causa della grande quantità di materiale di partenza (circa 150 Kg), necessario per isolare le tossine presenti in quantità sufficienti per la loro caratterizzazione mediante NMR. Al termine della purificazione, abbiamo ottenuto due frazioni tossiche contenenti rispettivamente 52 μg e 73 μg di composto **1** e **2**.

E' utile menzionare che le piccole quantità di biotossine isolate non corrispondono alla loro reale quantità nel campione naturale di partenza. Infatti, una gran parte delle tossine è andata inevitabilmente persa durante i numerosi passaggi di estrazione e purificazione, oltre ad essere consumata per il saggio sul topo effettuato in ogni fase della purificazione allo scopo di monitorare la tossicità. In base a quanto detto, si può assumere che la resa complessiva delle due biotossine ottenute dopo la purificazione è del 10 %. Malgrado le scarse quantità di tossine isolate, la loro delucidazione strutturale è stata effettuata con successo per mezzo delle tecniche spettroscopiche di NMR e MS.

Lo spettro di massa ad alta risoluzione HR-ESI del composto **1** ha fornito la seguente formula molecolare $\text{C}_{56}\text{H}_{83}\text{O}_{30}\text{S}$ (ione in modalità negativa 1107.5156, calcolato per $\text{C}_{56}\text{H}_{83}\text{O}_{30}\text{S} [\text{M} - \text{Na}^+]^-$). Ad una prima valutazione, lo spettro $^1\text{H-NMR}$ ha messo in luce una struttura simile alla YTX, e più precisamente una particolare somiglianza di **1** alla carbossiomoYTX⁷.

L'interpretazione degli esperimenti bidimensionali ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H TOCSY e ^1H - ^1H ROESY ha permesso di individuare una porzione policiclica sovrapponibile a quella della YTX, nonché la coincidenza della catena laterale di **1** con quella della carbossiomoYTX. Ciò è stato ulteriormente confermato dai patterns di frammentazione emersi dagli esperimenti di MS/MS.

Nella porzione occidentale della tossina, invece, abbiamo rivelato alcune divergenze significative rispetto alla carbossiomoYTX. Dagli esperimenti ^1H - ^1H COSY e ^1H - ^1H TOCSY è stato identificato un nuovo sistema di *spin* che si estende da C-1 a C-2a. I valori dei *chemical shifts* degli ^1H del suddetto sistema di *spin* e in particolare degli H_2 -1 erano compatibili con la presenza di una desolfatazione del tipico solfato presente sul C-1 nelle YTX. La nuova tossina è stata perciò classificata come 1- desulfocarbossiomoYTX.

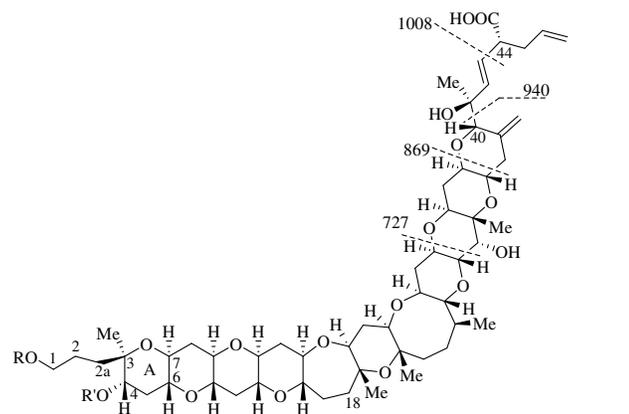
Per quanto riguarda la sua stereochimica, abbiamo potuto assumere che **1** avesse la stessa stereochimica della carbossiomoYTX sulla base della sovrapponibilità dei segnali ^1H -NMR - sia nei valori della risonanza che nella molteplicità - dell'intera porzione policiclica e della catena laterale orientale di **1** con quelli della carbossiomoYTX. Inoltre, tutte le correlazioni ROE in **1** erano coerenti con la stereochimica assunta.

Una volta caratterizzato il composto **1**, la determinazione del composto **2** è stato un compito relativamente agevole. Infatti, lo spettro di massa ad alta risoluzione HR-ESI di **2** ha suggerito la stessa formula molecolare di **1** (ione in modalità negativa 1107.5237, calcolato per $\text{C}_{56}\text{H}_{83}\text{O}_{30}\text{S}$ [$\text{M} - \text{Na}^+$]⁻), e lo spettro ^1H -NMR di **2** ha rivelato la sua forte analogia con **1**, e di conseguenza con la carbossiomoYTX. La principale differenza tra **2** e la carbossiomoYTX era

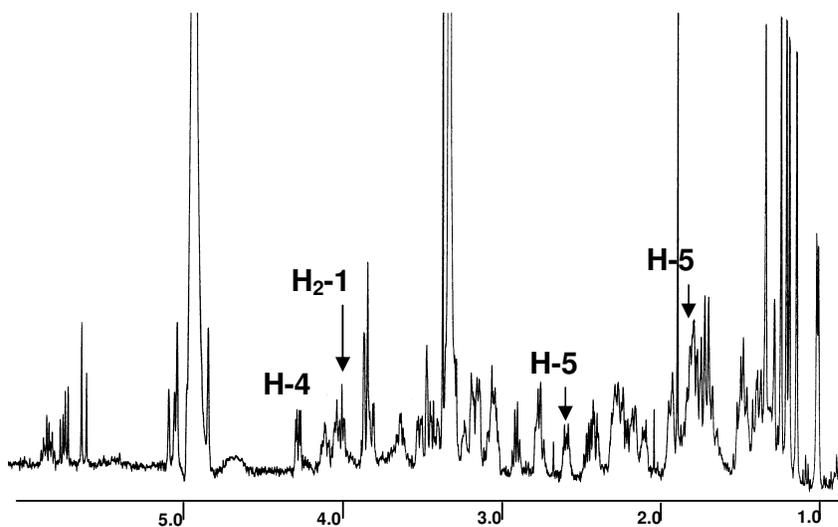
presente al C-4, dove si poteva osservare una variazione del *chemical shift* di H-4 che risuonava a campi più alti. Mediante l'interpretazione degli esperimenti ^1H - ^1H COSY e ^1H - ^1H TOCSY, partendo da H-4 è stato individuato l'intero sistema di *spin* che comprende i C-4/C-18. Sulla base dei dati precedentemente ottenuti, **2** è stato identificato come 4- desulfocarbossiomoYTX.

La stereochimica di **2** è stata assegnata attraverso le stesse valutazioni fatte per il composto **1**. In particolare, come per il primo anello della porzione policiclica – dove i *chemical shifts* nell' ^1H -NMR di **2** e della carbossimoYTX non erano coincidenti – la stereochimica è stata assegnata attraverso l'interpretazione dell'esperimento ROESY. Gli effetti ROE osservati tra CH₃-3 e H-7 così come tra H-4 e H-6 hanno suggerito che il primo anello avesse la stessa stereochimica di tutte le YTX ad oggi note.

Abbiamo cercato di valutare la *mouse lethality* sia di **1** che di **2**, ma siamo stati comprensibilmente impediti dalla scarsa quantità di composto puro a disposizione. Infatti, per poter effettuare esperimenti farmacologici quanto più possibile realistici, abbiamo testato ciascuna tossina solo ad una dose di 0.5 mg/kg. Tutti i topi sono sopravvissuti all'iniezione, per cui abbiamo potuto concludere che la *mouse lethality* di entrambe le nuove biotossine deve essere considerata > 0.5 mg/kg.

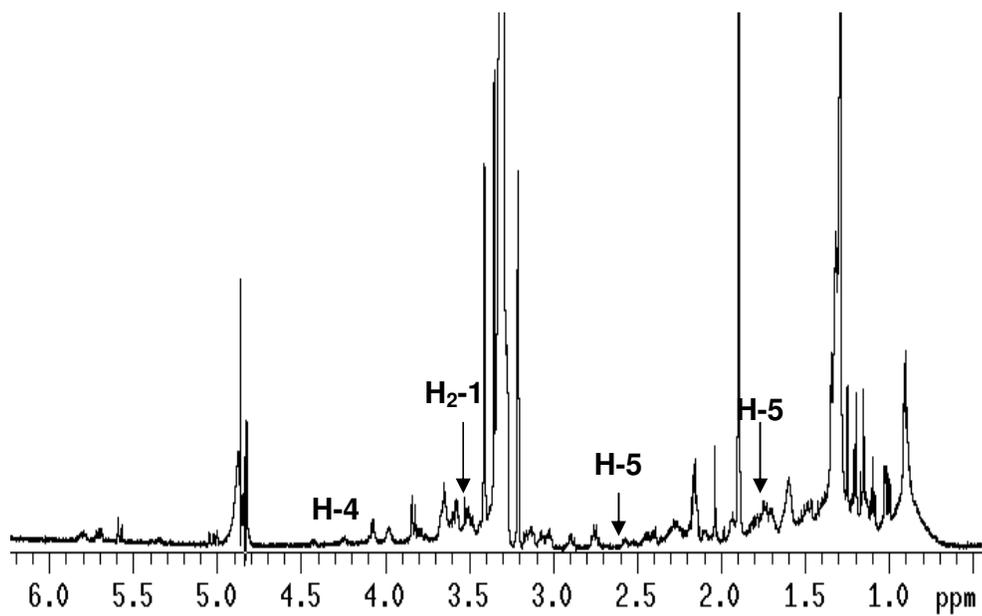


	R	R'
CarboxyhomoYTX	SO ₃ H	SO ₃ H
1-desulfoCarboxyhomoYTX (1)	H	SO ₃ H
4-desulfoCarboxyhomoYTX (2)	SO ₃ H	H

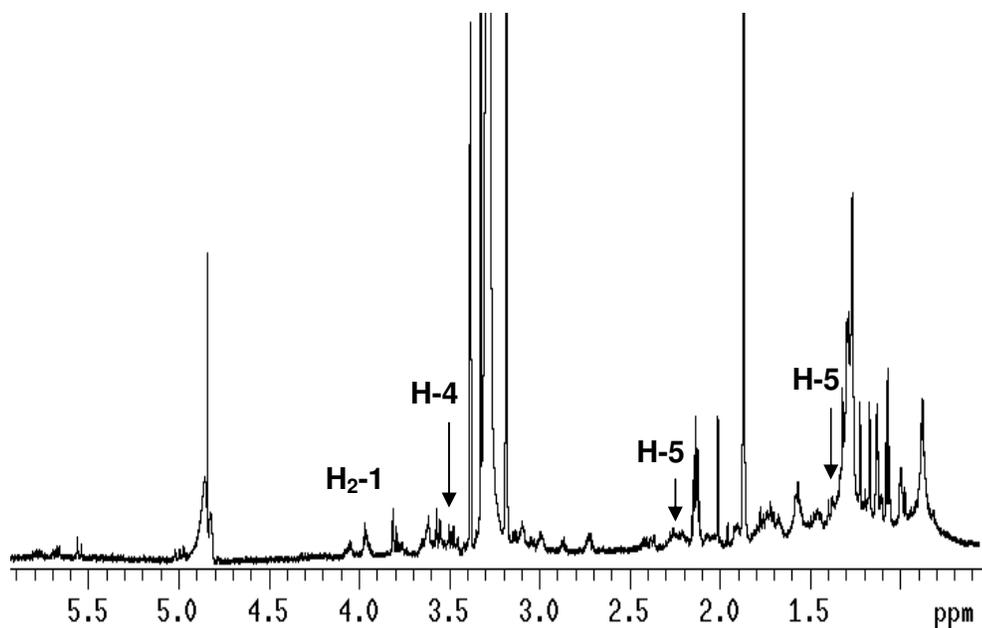


¹H carbossiomoyessotossina

Figura 2. a) Stereostruttura della carbossiomoyessotossina, 1-desulfocarbossiomoyessotossina (1), and 4-desulfocarbossiomoyessotossina (2) che mostra il pattern di frammentazione fornito da esperimenti di MS/MS effettuati in modalità negativa, usando lo ione [M-H]⁻ a m/z 1107 di ciascuna tossina come ione precursore. I patterns di frammentazione sono stati confrontati con un campione puro di carbossiomoyessotossina quando lo ione [M-H-SO₃]⁻ (m/z 1107) è stato selezionato come ione precursore; **b)** ¹H-NMR della carbossiomoyessotossina (in CD₃OD), dove sono stati evidenziati H₂-1, H-4, e H-5;



¹H-NMR 1-desulfocarbossiomoYTX



¹H-NMR 4-desulfocarbossiomoYTX

Figura 2: **c)** ¹H-NMR della 1-desulfocarbossiomoYTX (in CD₃OD): le frecce mostrano l'assenza dei tipici segnali H₂-1 quando il C-1 è solfato; **d)** ¹H-NMR della 4-desulfocarbossiomoYTX (in CD₃OD): le frecce mostrano l'assenza dei tipici segnali H-4 and H-5 quando il C-4 è solfato.

7.3 Parte Sperimentale

Analisi spettroscopiche MS e NMR. Gli spettri NMR sono stati effettuati su uno spettrometro Varian Unity Inova 700, utilizzando come standard interno CD₃OD ($\delta_{\text{H}} = 3.31$ ppm). Gli esperimenti ESI in modalità negativa sono stati ottenuti su uno spettrometro di massa API 2000 a triplo quadrupolo, dotato di una sorgente turbo ion spray (Applied biosystem; Thornhill, ON, Canada). La cromatografia liquida a media pressione (MPLC) è stata realizzata mediante un apparecchio Buchi 861 (usando colonne Develosil ODS e Toyopearl HW 40SF). Le separazioni con HPLC sono state eseguite su un apparecchio Varian [Waters 490 MS – rivelatore UV, settato ad una ($\lambda = 230$ nm) con colonna Luna C-18 5 μ m].

Isolamento dei composti 1 e 2. I composti **1** e **2** sono stati isolati da 150 Kg di mitili raccolti lungo le coste del Mar Adriatico settentrionale (a 3 m di profondità) nell'ottobre 2004. Il tessuto edule dei molluschi è stato omogenato con un omogeneizzatore Waring ed estratto con acetone (due volte) e con metanolo (una volta).

La fase organica è stata evaporata *in vacuo*, solubilizzata in MeOH:H₂O 8:2 e poi ripartita con *n*-esano. Il residuo acquoso così ottenuto è stato poi svaporato, quindi ridisciolti in una soluzione di MeOH:H₂O 6:4, e ripartito con CH₂Cl₂. Le diverse frazioni sono state saggiate mediante il saggio biologico sul topo – metodo ufficiale per le DSP tossine - e solo la fase diclorometanica è risultata positiva al test effettuato.

Di conseguenza, abbiamo proceduto con l'ulteriore separazione dell'unica fase tossica (frazione CH₂Cl₂) attraverso una MPLC su colonna Develosil ODS,

eluita con diverse miscele di MeOH:H₂O (nell'ordine 1:1 , 6:4 , 8:2 , 9:1, e MeOH 100%).

Il residuo tossico è stato cromatografato sempre su MPLC, usando una resina ad esclusione molecolare (Toyopearl HW- 40 SF) e come unico eluente il MeOH 100%.

La purificazione finale è stata eseguita su HPLC a fase inversa (colonna Luna C-18, 10 µm) eluita isocraticamente con una miscela di H₂O:MeOH:CH₃CN 2:2:1 (rivelatore UV, λ = 230 nm). I composti **1** e **2** sono eluiti rispettivamente dopo 5.83 e 5.67 min. Durante tutte le fasi della purificazione, la presenza delle tossine nelle frazioni ottenute è stata verificata mediante il saggio ufficiale del topo.

1- desulfocarbossiomoYTX. HR-ESIMS (ione in modalità negativa) *m/z* 1107.5156 (calcolato per C₅₆H₈₃O₃₀S [M – Na⁺]); trovato 1107.5198. I dati ¹H-NMR sono riportati in Tab.1. Il grado di purezza di **1** (> 90%) è stato valutato sulla base sia delle analisi all'HPLC che all'NMR.

4- desulfocarbossiomoYTX. HR-ESIMS (ione in modalità negativa) *m/z* 1107.5237 (calcolato per C₅₆H₈₃O₃₀S [M – Na⁺]); trovato 1107.5198. I dati ¹H-NMR sono riportati in Tab. 2. Il grado di purezza di **2** (> 90%) è stato valutato sulla base sia delle analisi all'HPLC che all'NMR.

7.4 Conclusioni

La presenza della 1-desulfocarbossiomoYTX e della 4-desulfocarbossiomoYTX nei mitili dell'Adriatico dà origine a una serie di problematiche che sarebbe opportuno approfondire nell'immediato futuro.

Malgrado la loro piccola innovazione strutturale, le nuove desulfoYTXs non vengono ritrovate nella frazione idro-metanolica insieme alle YTX, ma in quella diclorometanica delle DSP, se estratte secondo il protocollo ufficiale EU. Pertanto, è indispensabile una revisione dei test di controllo adottato dall'EU.

Un aspetto che deve essere considerato è la mancanza di un gruppo solfato. Quest'ultimo, infatti, diminuisce l'idrofilicità delle desulfoYTXs rispetto alle YTX. Così, la permeabilità delle biomembrane e, conseguentemente, il livello tossicologico potrebbe esserne influenzato.

Infine, sarebbe interessante accertare se la mancanza di un estere solforico nelle carbossiomoYTXs rappresenti il risultato del metabolismo dei molluschi o sia collegato alla via metabolica dell'alga produttrice.

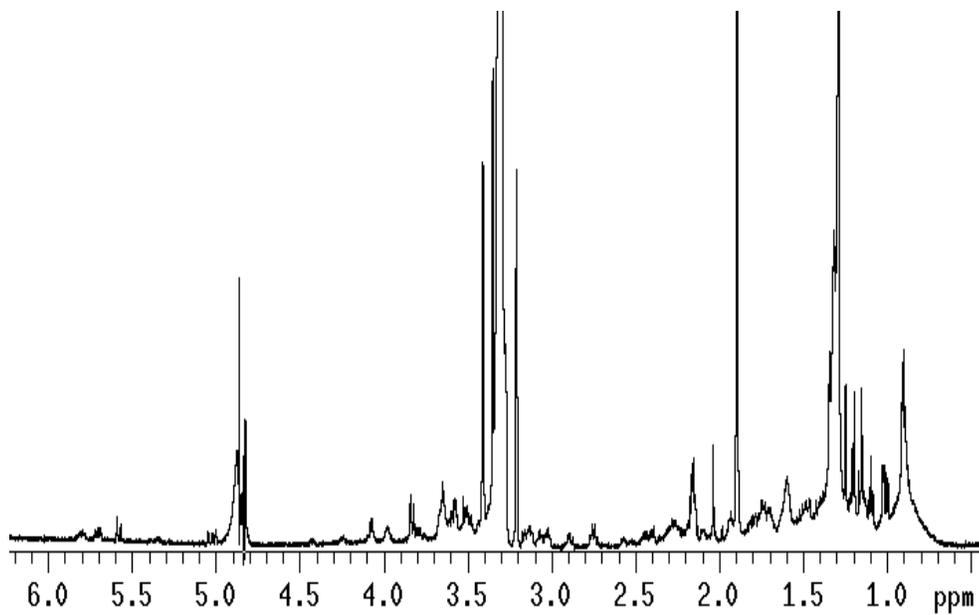
7.5 Riferimenti bibliografici

1. Ciminiello, P.; Fattorusso, E. in *Progress in Molecular and Subcellular Biology. Subseries Marine Molecular Biotechnology: Molluscs* (Eds.: G. Cimino, M. Gavagnin), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **2006**, p.53.
2. Sassa, T. W. W.; Richter, N. U.; Suganuma, M.; Suguri, H.; Yoshizawa, S.; Hirota, M.; Fujiki, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *159*, p. 944.

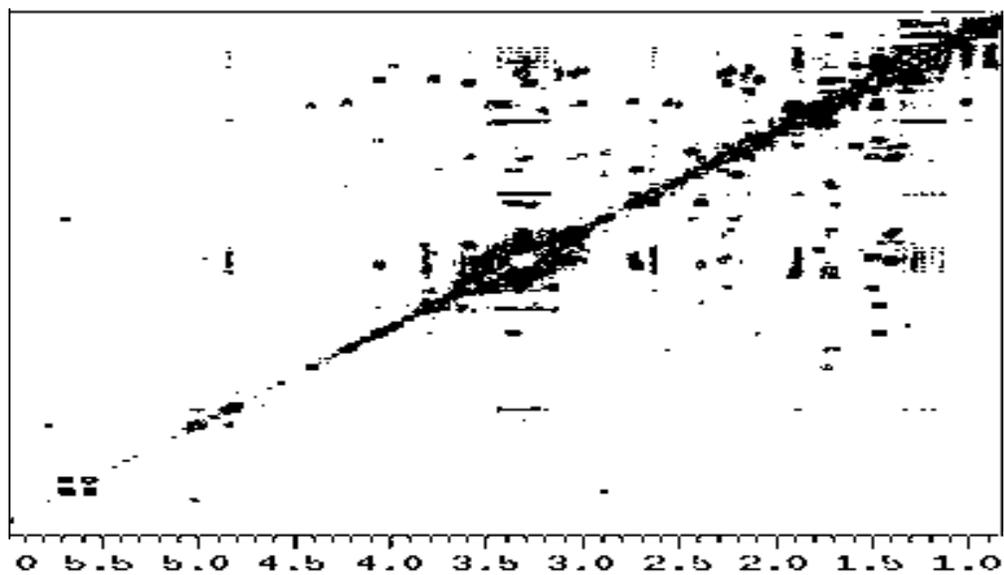
3. Ferrari, S.; Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Forino, M.; Malaguti, C.; Tubaro, A.; Poletti, R.; Yasumoto, T; Fattorusso, E.; Rossini, G. P.; *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, p. 1251.
4. Directive of the European Commission 2002/225/EC and “decreto del Ministero della Salute-**16/05/2002**.”
5. Yasumoto, Y.; Oshima, M. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish* **1978**, *44*, p.1249.
6. Quilliam M. A.; Hess, P.; Dell'Aversano, C.; in *Mycotoxins and phycotoxins in perspective at the turn of the millennium* (Eds: deKoe, W. J.; Samson, R. A.; Van Egmond, H. P.; Gilbert, J.; Sabino, M.); deKoe, W. J.: Wageningen, The Netherlands, **2001**, p. 383.
7. Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Poletti, R.; Viviani, R. *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13*, p. 770.

Tabella 1. Dati spettroscopici ^1H NMR della carbossiomoyessotossina e le desulfocarbossiomoyessotossine (CD_3OD)

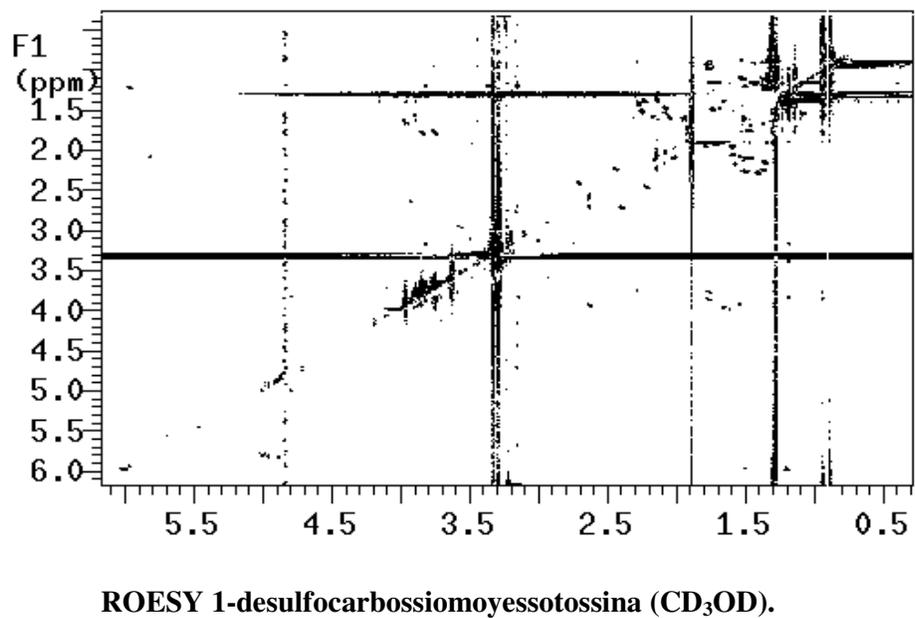
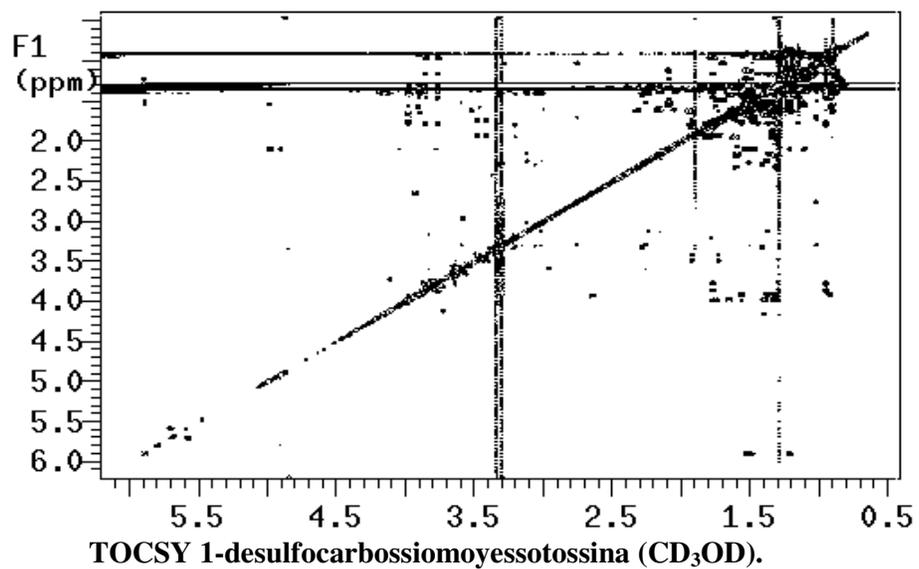
Position	Carboxyhomo YTX	1-desulfo carboxyhomoYTX (1)	4-desulfo carboxyhomoYTX (2)	Position	Carboxyhomo YTX	1-desulfo carboxyhomoYTX (1)	4-desulfo carboxyhomoYTX (2)
1	3.96, 4.00	3.54, 3.54	3.98, 3.98	25	1.46, 1.78	1.46, 1.78	1.46, 1.78
2	1.78, 1.83	1.59, 1.62	1.75, 1.79	26	1.70	1.70	1.70
2a	1.61, 1.78	1.63, 1.74	1.57, 1.74	$\text{CH}_3\text{-26}$	1.02	1.02	1.02
$\text{CH}_3\text{-3}$	1.19	1.21	1.13	27	2.76	2.76	2.76
4	4.21	4.22	3.52	28	3.28	3.28	3.28
5	1.70, 2.56	1.72, 2.57	1.58, 2.04	29	1.50, 2.25	1.50, 2.25	1.50, 2.25
6	3.00	3.01	2.98	30	3.60	3.60	3.60
7	3.33	3.30	3.23	31	3.15	3.15	3.15
8	1.39, 2.16	1.34, 2.14	1.34, 2.14	32	3.82	3.82	3.82
9	3.12	3.12	3.11	$\text{CH}_3\text{-33}$	1.19	1.19	1.19
10	3.11	3.11	3.10	34	3.75	3.75	3.75
11	1.38, 2.22	1.38, 2.22	1.37, 2.21	35	1.46, 2.09	1.46, 2.09	1.46, 2.09
12	3.01	3.03	3.00	36	4.02	4.02	4.02
13	3.06	3.04	3.05	37	3.36	3.36	3.36
14	1.42, 2.28	1.42, 2.28	1.41, 2.28	38	2.41, 2.70	2.41, 2.70	2.41, 2.70
15	3.31	3.31	3.30	$\text{CH}_2\text{-39}$	4.89, 5.08	4.89, 5.08	4.89, 5.08
16	3.21	3.20	3.21	40	3.79	3.79	3.79
17	1.78, 1.93	1.78, 1.93	1.77, 1.91	$\text{CH}_3\text{-41}$	1.34	1.34	1.34
18	1.79, 1.86	1.79, 1.86	1.79, 1.86	42	5.58	5.58	5.58
$\text{CH}_3\text{-19}$	1.24	1.25	1.25	43	5.70	5.70	5.70
20	3.41	3.41	3.41	44	2.89	2.89	2.89
21	1.72, 1.91	1.72, 1.91	1.72, 1.91	45	2.21, 2.43	2.21, 2.43	2.21, 2.43
22	3.49	3.49	3.49	46	5.78	5.78	5.78
$\text{CH}_3\text{-23}$	1.17	1.15	1.16	47	4.92, 5.03	4.92, 5.03	4.92, 5.03
24	1.47, 1.73	1.47, 1.73	1.47, 1.73				

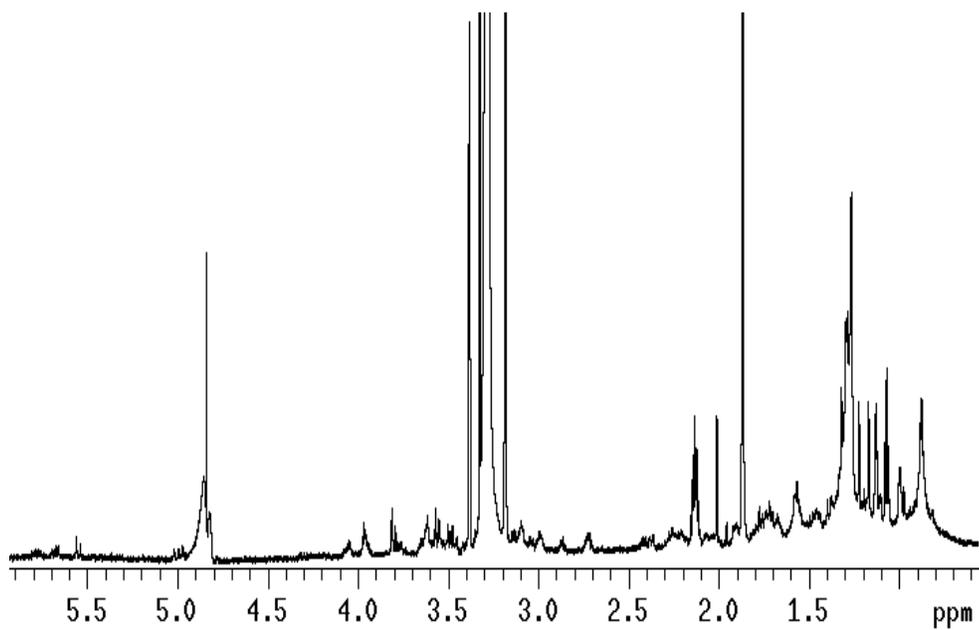


^1H 1-desulfocarbossiomoyessotossina (CD_3OD).

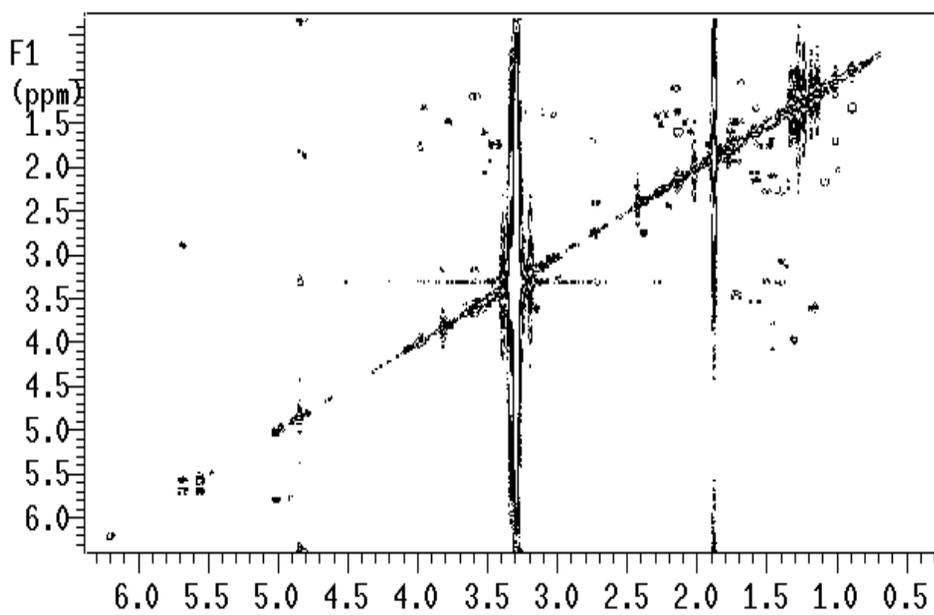


COSY 1-desulfocarbossiomoyessotossina (CD_3OD).

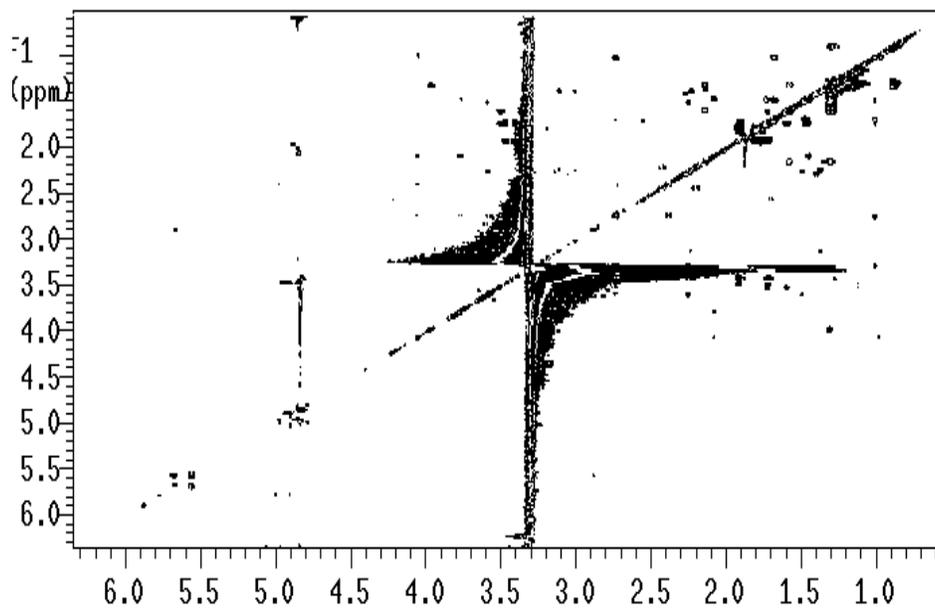




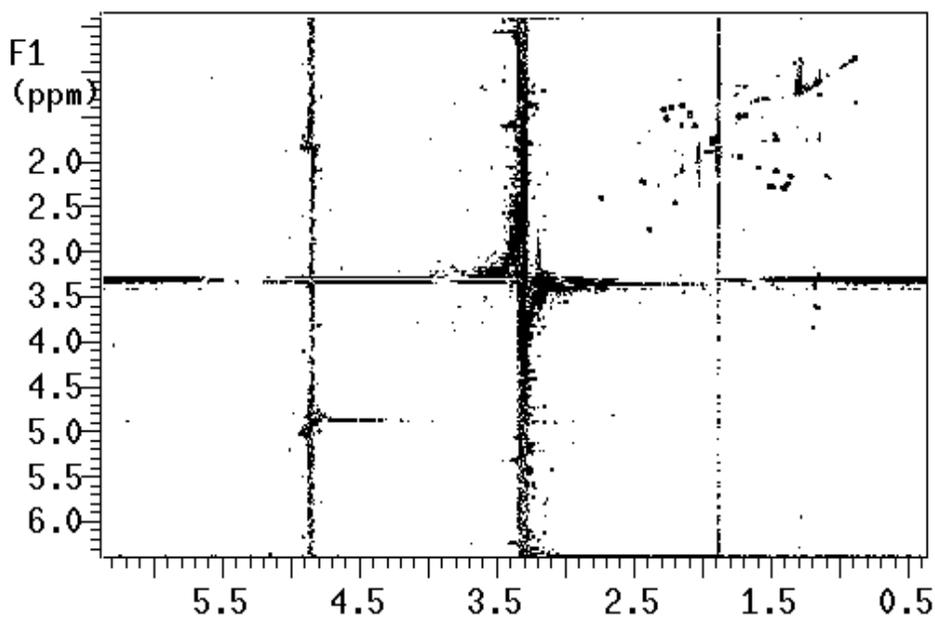
¹H 4-desulfocarbossiomoyessotossina



COSY 4-desulfocarbossiomoyessotossina



TOCSY 4-desulfocarbossiomoyessotossina



ROESY 4-desulfocarbossiomoyessotossina

Capitolo 8

8.1 Analisi di una partita di mitili raccolta nell'ottobre 2005.

Nel corso del continuo monitoraggio dei mitili tossici del Mar Adriatico effettuato dal gruppo di ricerca del prof. Fattorusso e della prof.ssa Ciminiello, presso cui ho svolto il dottorato, sono stati isolati e caratterizzati stereotutturalmente non solo molte biotossine marine¹, ma anche nuove e interessanti classi di composti citotossici, come i clorosolfolipidi²⁻³ e le oxazinine⁴⁻⁶.

Le oxazinine rappresentano una classe di molecole caratterizzata da un tipico anello oxazinico che riprende l'anello oxazinonico comune a diversi prodotti naturali marini, come la bassiatina⁷, la lateritina⁸, la metacitofilina⁹ e la javanicunina¹⁰. Gli studi preliminari tossicologici effettuati sulle oxazinine hanno suggerito che la loro citotossicità fosse legata essenzialmente alla funzione $-CN^4$.

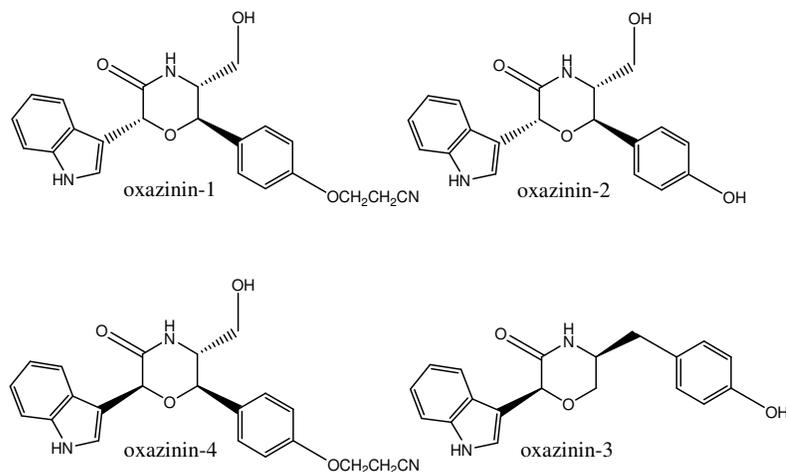


Figura 1. Stereo-struttura delle oxazinine -1, -2, -3, e -4.

Dal momento che, nel corso dell'ultimo decennio la presenza delle oxazinine è stata ripetutamente rivelata nei molluschi dell'Adriatico, sarebbe

opportuna un'attenta valutazione del loro rischio sanitario e del loro impatto ambientale.

Nel lavoro seguente sono riportate la struttura e la stereochimica relativa di due oxazinine (oxazinina-5 e 6) e del loro relativo precursore a struttura lineare (pre-oxazinina 7) realizzata attraverso l'uso di tecniche NMR e spettrometria di massa. Inoltre, uno studio sintetico ha permesso di determinare anche la stereochimica assoluta dei tre nuovi composti grazie al confronto delle proprietà spettroscopiche dei prodotti naturali e dei loro corrispondenti modelli sintetici.

8.2 Risultati e discussione.

Nell'ottobre 2005, dall'analisi di una partita di mitili tossici raccolta lungo le coste del Mar Adriatico settentrionale, abbiamo isolato due nuove oxazinine, denominate oxazinina -5 (**1**) e -6 (**2**), insieme al loro relativo precursore a struttura lineare (pre-oxazinina-7). Le proprietà cromatografiche di questi composti, nonché i loro dati spettroscopici ^1H - e ^{13}C -NMR hanno suggerito la loro appartenenza alla classe delle oxazinine.

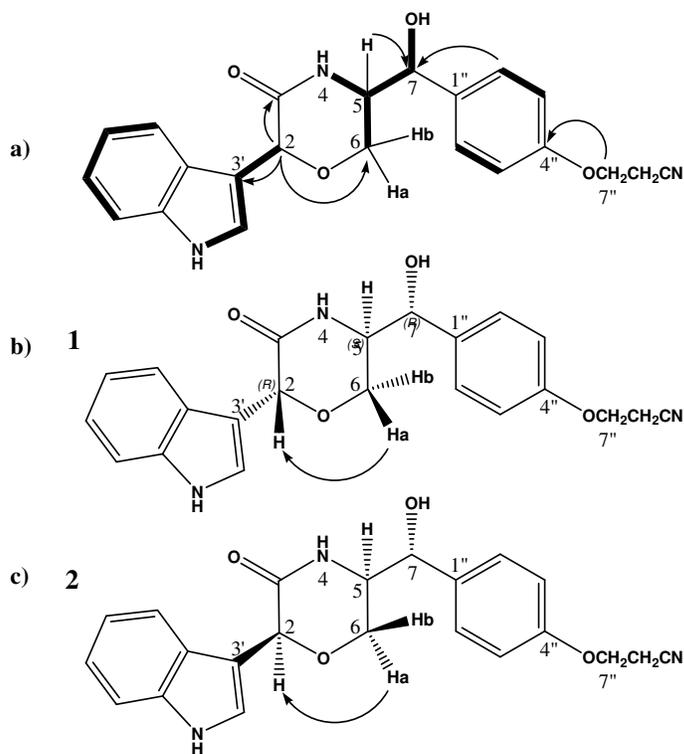


Figura 2. Struttura delle oxazinine 5 e 6: a) le linee in grassetto indicano i sistemi di spin della molecola ottenuti dagli esperimenti COSY e TOCSY; le frecce rappresentano alcune correlazioni chiave HMBC per l'oxazinina-5 e -6. b) stereostruttura dell'oxazinina-5: correlazioni decisive ROE. c) stereostruttura dell'oxazinina-6: correlazioni decisive ROE.

8.2.1 Determinazione strutturale dell'oxazinina-5 (1).

La struttura planare del composto **1** (m/z 391.8 $[M+H]^+$) è stata determinata principalmente confrontando i suoi dati NMR con quelli delle oxazinine già riportate in letteratura. In particolare, l'analisi degli esperimenti bidimensionali

mononucleari ^1H - ^1H COSY e ^1H - ^1H TOCSY ha permesso di individuare il tipico anello indolico sostituito sul C-3' e l'anello fenolico *para*-disostituito legato alla catena $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$, grazie alla buona sovrapposizione delle sue proprietà spettroscopiche con quelle delle oxazinine riportate in letteratura.

La determinazione del sistema di *spin* NH-4/C-5/(C-7)/C-6, in cui, rispetto all'oxazinina-3, era presente la nuova modifica strutturale, ha reso necessaria un'analisi più accurata. Data la sua posizione chiave nell'anello oxazinico, H-5 giocava un ruolo cruciale nella delucidazione strutturale del sistema di *spin* cui apparteneva. Infatti, H-5 sembrava essere accoppiato con NH-4, H₂-6 e H-7 (δ 4.58 ppm). Dal momento che quest'ultimo protone risultava essere legato al carbonio a δ 74.7, e accoppiato ad un protone scambiabile a δ 3.57 (7-OH), abbiamo potuto localizzare un gruppo idrossilico sul C-7, in pieno accordo con la formula molecolare ottenuta dallo spettro di massa ad alta risoluzione HR-ESI di **1**.

A questo punto, le correlazioni diagnostiche HMBC e ROE – mostrate in figura 2- hanno permesso di connettere tutti i sistemi di *spin* isolati, determinando così la struttura planare della molecola sotto indagine.

Un'attenta analisi delle costanti di accoppiamento $^3J_{\text{H-H}}$ e delle correlazioni ROE è stata cruciale per definire la stereochimica relativa dell'anello oxazinico di **1**. In particolare, un forte effetto ROE tra H-2 e H-6a è stato determinante per definire la loro orientazione *cis*. Per di più, la costante di accoppiamento tra H-6a/H-5 (7.5 Hz) e H-6b/H-5 (4.0 Hz) suggeriva una relazione *trans* tra H-6a e H-5, una volta assunta la conformazione preferenziale a sedia dell'anello. Sfortunatamente, l'assenza di una conformazione predominante intorno al legame

C-6/C-7 ($^3J_{\text{H-H}}$ 8.3 Hz) non dava la possibilità di affidarsi al metodo di Murata per poter estendere la stereochimica relativa anche al C-7.

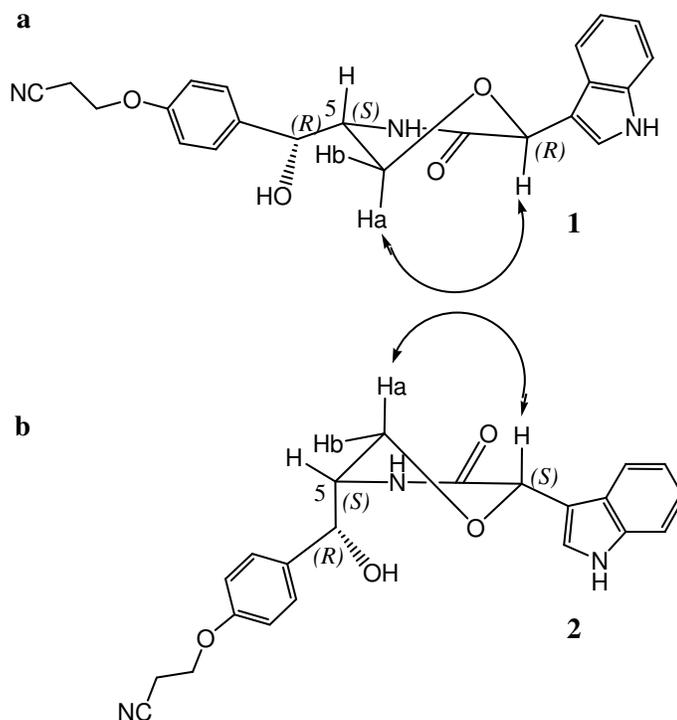
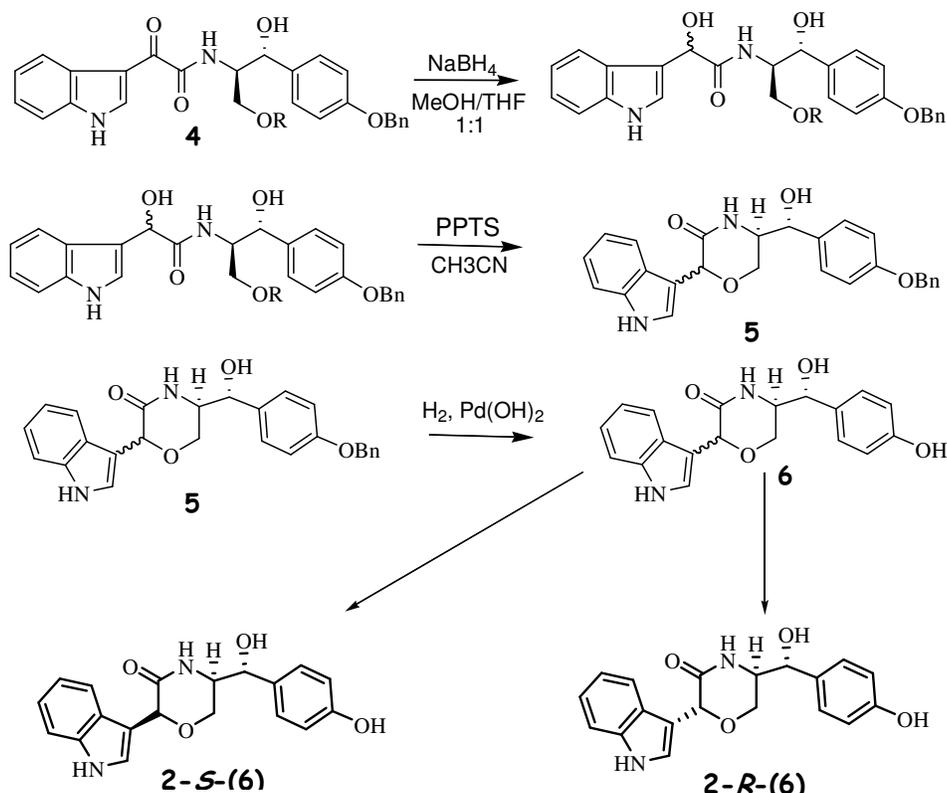


Figura 3. Conformazione preferenziale di **1** (a) e **2** (b) in cui è indicata la correlazione ROE cruciale per poter assegnare la configurazione dell'anello oxazininico, che indicava una relazione di-assiale tra H-2 and H-6a.

Allo scopo di stabilire non solo la stereochimica relativa sul C-7, ma anche la stereochimica assoluta dell'intera molecola, abbiamo fatto ricorso alla strategia sintetica messa a punto da Couladouros et al., che partiva da uno scheletro morfolinonico dell'oxazinina. In questo modo, la riduzione della funzione chetonica della 3-ammide indol-glicossilica **4** (schema 1) con NaBH_4 forniva un triolo, che dopo successivi trattamenti con PPTS in acetonitrile a refluxo ha fornito il morfolinone **5**, sottoforma di una miscela diastereoisomerica sul C-2 (nel rapporto di 1:1). L'idrogenolisi finale del gruppo protettivo benzilico ha fornito

una miscela equimolare di 2(*R*)-**6** e 2(*S*)-**6**. I due diastereoisomeri sono stati separati mediante HPLC su una colonna Chirex usando acetato di etile come eluente.



Schema 1. Preparazione dei modelli sintetici **6** e **7**. Reattivi e condizioni: (a) NaBH₄, MeOH/THF (1:1 v/v), 0°C→rt, 30 min; (b) PPTS, CH₃CN, a refluxo, 3 h, 18%; (c) H₂, Pd(OH)₂/C, AcOEt/EtOH (4:1 v/v), rt, 8 h, 75%; (d) H₂, Pd(OH)₂/C, AcOEt/EtOH (4:1 v/v), rt, 8 h, 78%; i diastereoisomeri 2(*R*)-**6** e 2(*S*)-**6** sono stati separati mediante colonne HPLC Chirex (R)-NGLY e DNB, con acetato d'etile come eluente.

Poiché le proprietà NMR del modello sintetico 2(*R*)-**6** erano quasi completamente sovrapponibili con quelle dell'oxazinina-5, abbiamo potuto confermare la stereochimica relativa dell'anello oxazinico riportato precedentemente. Per giunta, poiché lo spettro di dicroismo circolare (CD) del prodotto sintetico combaciava perfettamente con quello dell'oxazinina-5, abbiamo

potuto affermare anche la stereochimica assoluta dell'intera molecola, come riportato in figura.

8.2.2 Determinazione strutturale dell'oxazinina-6 (**2**).

Attraverso un'estesa analisi NMR, il composto **2** (m/z 391.9 $[M+H]^+$) forniva la stessa struttura planare di **1**, suggerendo così una relazione diastereoisomerica tra loro. La delucidazione stereochimica di **2** è stata problematica a causa di una parziale sovrapposizione dei due protoni in posizione 6, confermata da una valutazione poco chiara dei valori delle loro J . Per superare così ogni dubbio, abbiamo effettuato lo spettro $^1\text{H-NMR}$ di **2** in solventi deuterati diversi dal CD_3CN , e abbiamo constatato che il C_6D_6 fosse il solvente che permetteva una migliore dispersione dei *chemical shift* dei protoni.

A questo punto lo spettro ROESY- in C_6D_6 - è risultato ancora una volta cruciale. Un forte effetto ROE tra H-2 e H-6a è stato diagnostico anche in questo caso per poter assegnare la loro relazione *cis*; al contrario, le costanti di accoppiamento tra H-6a/H-5 (3.9 Hz) e H-6b/H-5 (7.7 Hz) erano questa volta indicative di una relazione *cis* tra H-6a e H-5, quando l'anello oxazinico assumeva una conformazione a sedia.

Analogamente al composto **1**, la stereochimica assoluta di **2** è stata dedotta dal confronto dei suoi dati NMR e del suo assorbimento al CD con quelli del modello sintetico 2(*S*)-**6**.

8.2.3 Determinazione strutturale dell'oxazinina-7(3).

Un'approfondita analisi degli esperimenti COSY e TOCSY di **3** ha permesso di identificare i seguenti sistemi di *spin*, evidenziati in grassetto in figura 5:

- un anello indolico;
- un anello fenilico *para*-disostituito legato alla catena $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$;
- il sistema di spin NH-3/C-4/(C-6)/C-5.

L'esperimento HMQC è stato determinante per poter legare ciascun protone al proprio carbonio corrispondente. Infine, considerando che la formula molecolare ($\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_5\text{N}_3$) ottenuta dallo spettro HR-ESI a ioni positivi, abbiamo potuto localizzare un atomo di carbonio e uno di ossigeno oltre a quelli già presenti nei sistemi di spin della molecola descritta prima.

A questo riguardo, il valore del *chemical shift* di un carbonio pari a δ 183.3 ppm è stato utile per poter identificare una funzione chetonica, localizzata in posizione 1 grazie alle correlazioni HMBC tra il protone ammidico e C-1, e tra H-2' e lo stesso C-1. La correlazione HMBC tra H-5 e C-2'' ha permesso di determinare l'intera struttura di **3**.

L'ultimo passo di questo studio è stato la delucidazione stereostutturale di questo nuovo membro delle oxazinine. Anche in questo caso, l'approccio sintetico è stato decisivo. Infatti, la sovrapposizione delle proprietà NMR e la coincidenza dello spettro CD di **3** con quelle del modello sintetico **7** hanno fornito la stereochimica assoluta al C-4 e al C-5.

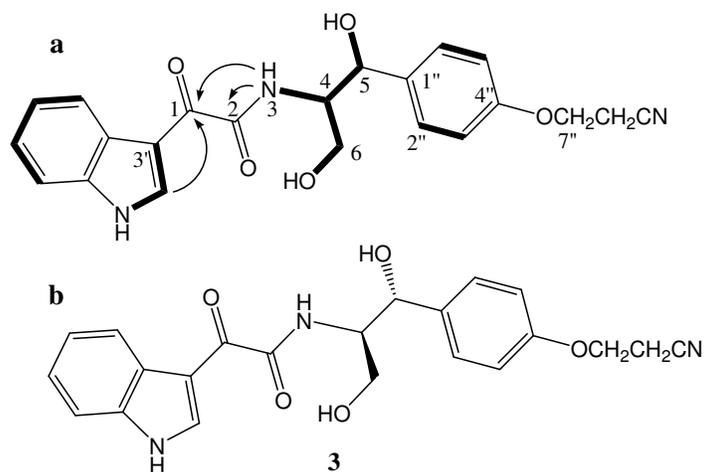
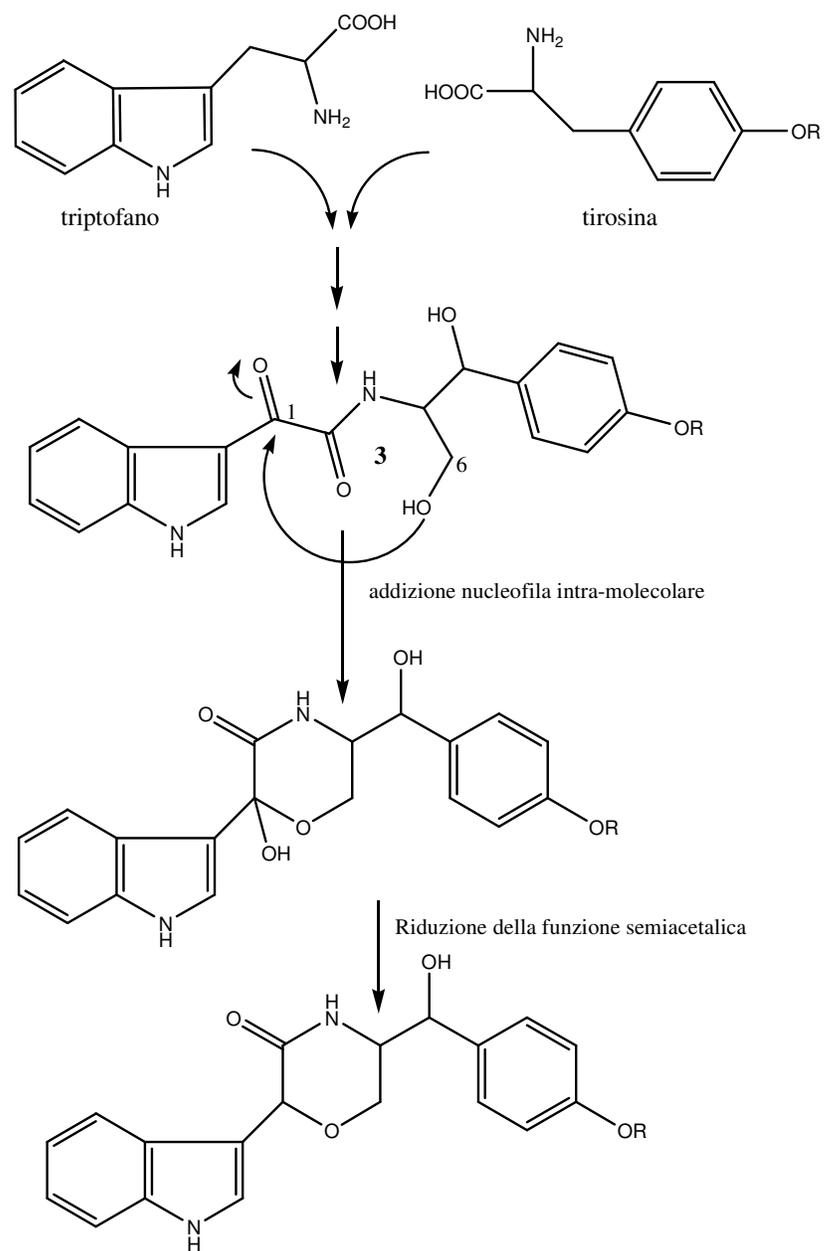


Figura 5. Struttura della pre-oxazinina-7: a) Le linee in grassetto indicano i sistemi di spin della molecola risultati da esperimenti ^1H - ^1H COSY e ^1H - ^1H TOCSY; le frecce rappresentano alcune diagnostiche correlazioni HMBC; b) la stereochimica assoluta è stata fornita dal confronto con il modello sintetico.

8.2.4 Conclusioni.

La compresenza di **1**, **2** e **3** ha permesso di ipotizzare un possibile *pathway* biogenetico di questa interessante classe di molecole citotossiche. In particolare, **3** – la cui biogenesi più probabile deriva dal triptofano e dalla tirosina- può essere considerato l'ipotetico precursore delle oxazinine da cui viene generato il tipico anello oxazinico attraverso un'addizione nucleofila intra-molecolare del gruppo idrossilico al C-6 al gruppo carbonilico su C-1, seguito da una riduzione della funzione emiacetalica (Schema II).



Schema II. Possibile biosintesi delle oxazinine.

E' ragionevole ipotizzare che la presenza delle ossazinine nei molluschi derivi da una sorgente esogena- più precisamente un microrganismo come una microalga. L'eventuale scoperta di tale organismo/i produttore consentirebbe di confermare il *pathway* biogenetico delle oxazinine ipotizzato.

Lo studio effettuato sui molluschi contaminati ha da sempre contribuito a delineare il complesso profilo tossicologico del Mar Adriatico rivelando una peculiarità inimmaginabile in qualsiasi altro luogo del mondo.

Sfortunatamente – come succede per la maggior parte delle biotossine naturali – la scarsa disponibilità dei composti tossici puri proibisce la valutazione reale dei rischi alla salute dell'uomo. Allo scopo di ottenere quantità di composti puri sufficienti per approfonditi studi tossicologici, si potrebbe perseguire nell'approccio sintetico. In verità, gli studi sintetici verso l'introduzione della catena $-OCH_2CH_2CN$ sulle oxazinine sono sotto indagine, e l'esito positivo del completamento della strategia sintetica delle oxazinine precedentemente descritte e impiegate in questo lavoro per la preparazione dei modelli **1**, **2** e **3**, rappresenterebbe una valida strada per superare la scarsità dei composti puri. Anche in quest'ambito l'individuazione dell'organismo produttore consentirebbe di isolare una grande quantità di composto puro necessaria gli studi tossicologici

8.3 Parte sperimentale

Gli spettri NMR sono stati misurati su uno spettrometro Varian Inova700 e il solvente è stato usato come standard interno (CD₃CN: $\delta_H = 1.94$; $\delta_C = 1.3$ e

118.3). Gli spettri ESI a ioni positivi sono stati ottenuti su uno spettrometro di massa API-2000 a triplo-quadrupolo fornito di una sorgente turbo ion spray (Applied biosystem; Thornill, ON, Canada).

Gli spettri CD sono stati registrati su uno spettropolarimetro J-710 (Jasco, Tokyo, Japan) dotato di J-710 per un software Windows (Jasco). Tutti gli spettri sono stati misurati in MeOH a temperatura ambiente.

La cromatografia liquida a media pressione (MPLC) è stata effettuata su un apparecchio Buchi 861 collegato a colonne Develosil ODS e Toyopearl HW-40SF. Le separazioni HPLC sono state eseguite su un apparecchio Varian, dotato di un rivelatore UV Waters 490 MS e un rivelatore ad indice di rifrazione RI-3, utilizzando colonne Luna C-18 5 μ e Luna Silica 5 μ . Il rivelatore UV è stato settato alla lunghezza d'onda di 230 nm; la TLC è stata effettuata su lastre di gel di silice (Merck, prerivestite), usando come fase mobile AcOEt/ MeOH (95: 5); le oxazinine sono state rivelate mediante riscaldamento delle lastre dopo trattamento con acido solforico al 50%. Tutte le reazioni sono state realizzate sotto un flusso di argon secco, con solventi anidri, distillati recentemente, in condizioni anidre salvo otherwise noted. Tutte le reazioni sono state agitate magneticamente su piastre magnetiche Teflon, e le temperature sono state misurate esternamente.

Le reazioni che richiedevano ambienti anidri sono state realizzate in forni (120°C, 24 h) o in vetreria a fiamma secca (vuoto < 0.5 Torr). Le rese si riferiscono a materiali cromatograficamente e spettroscopicamente (¹H NMR) omogenei.

Il gel di silice E. Merck (60, granulometria 0.040-0.063 mm) è stato usato per colonne cromatografiche flash.

Isolamento ed estrazione

I mitili tossici *M. galloprovincialis* sono stati raccolti lungo le coste di Cesenatico (Mar Adriatico) nell'ottobre 2005 a tre metri di profondità, che corrispondono ai più alti livelli di allevamento di mitili in quest'area. I campioni sono stati depositati presso il Dipartimento di Chimica delle Sostanze Naturali, Napoli. Dopo la raccolta, i mitili sono stati congelati a -20°C fino all'estrazione.

Le ghiandole digestive (5000g di peso secco dopo l'estrazione) sono state rimosse, omogeneizzate con un frullatore Waring ed estratte per due volte con una soluzione di CH₃CN/H₂O 8:2 + 0.1% di HCOOH a temperatura ambiente. Gli estratti combinati, dopo filtrazione, sono stati concentrati sottovuoto fino ad ottenere un residuo che è stato poi disciolto in una miscela CH₃CN/H₂O 2:1 e ripartito con CH₂Cl₂. La fase diclorometanica ottenuta è stata concentrata e poi cromatografata mediante MPLC su una colonna Develosil ODS usando come miscele di eluenti H₂O/ MeOH a polarità decrescente (dal 60% al 100% di MeOH). La frazione eluita con il 90% di metanolo è stata successivamente separata su una colonna Toyopearl HW-40 SF con metanolo 100% come eluente.

La frazione contenente le oxazinine è stata purificata prima su HPLC a fase inversa eluita con CH₃CN/H₂O/CH₃OH 15:50:35 e poi su HPLC a fase diretta usando AcOEt/CH₃OH 95:5 come eluente, ottenendo rispettivamente 2.2, 2.8 e 2.4 mg di oxazinina- 5, -6 e -7 puri.

Oxazinina-5: ν_{MAX} (KBr) 3476, 3342, 3187, 2932, 2259, 1661, 1662 cm⁻¹. Ioni ESI-MS in modalità positiva: m/z 391.9 [M+H]⁺ e m/z 414.1 [M+Na]⁺. HRMS

(ioni ESI in modalità positiva): $[M+H]^+$, trov. 392.1621. $C_{22}H_{22}N_3O_4$ calc. 392.1610. I dati spettroscopici 1H e ^{13}C NMR (CD_3CN) sono stati riportati in tabella 1.

Oxazinina-6: ν_{MAX} (KBr) 3478, 3344, 3186, 2931, 2263, 1660, 1623 cm^{-1} . Ioni ESI-MS in modalità positiva: m/z 391.9 $[M+H]^+$ e m/z 414.1 $[M+Na]^+$. HRMS (ioni ESI in modalità positiva): $[M+H]^+$, trov. 392.1602. $C_{22}H_{22}N_3O_4$ calc. 392.1610. I dati spettroscopici 1H e ^{13}C NMR (CD_3CN) sono stati riportati in tabella 2.

Pre-oxazinina-7: ν_{MAX} (KBr) 3483, 3337, 3192, 2936, 2270, 1658, 1622 cm^{-1} . Ioni ESI-MS in modalità positiva: m/z 408.2 $[M+H]^+$ e m/z 430.1 $[M+Na]^+$. HRMS (ioni ESI in modalità positiva): $[M+H]^+$, trov. 408.1568. $C_{22}H_{22}N_3O_4$ calc. 408.1559. I dati spettroscopici 1H e ^{13}C NMR (CD_3CN) sono stati riportati in tabella 3.

Studi sintetici

Riduzione dell'ammide 4: il sodio boro idruro (51 mg, 1.35 mmol) è stato aggiunto in piccole porzioni ad una soluzione di ammide **4** (300 mg, 0.67 mmol) in una miscela di MeOH (5 ml) e THF (5 ml) a 0 °C. La reazione è stata condotta a temperatura ambiente e dopo 30 minuti è stata saturata aggiungendo lentamente una soluzione acquosa di cloruro di ammonio (10 ml). La miscela è stata estratta con AcOEt (4 x 50 ml); gli estratti organici combinati sono stati lavati con acqua (20 ml), essiccata su Na_2SO_4 , e concentrata sotto pressione ridotta, fornendoci il

prodotto in forma di solido bianco amorfo. L'analisi TLC ($R_f = 0.14, 0.24$; 40% acetone in diclorometano) e l'analisi ^1H -NMR (i dati non sono mostrati) ha rivelato essere una miscela equimolare dei trioli diastereoisomerici sul C-1.

HRMS (ESI ioni positivi): $[\text{M}+\text{H}]^+$, misurato 447.1939. $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_5$ calcolato 447.1920. dal momento che, basandoci su precedenti studi sintetici relativi, ci si aspettava che entrambi i diastereoisomeri conducessero alla stessa miscela di morfolinoni diastereoisomerici non è stato fatto nessuno sforzo per separarli cosicché la miscela è stata usata nello *step* successivo senza un'ulteriore purificazione.

Morfolinone 5: una quantità catalitica di p-toluensolfonato di piridinio (10 mg) è stata aggiunta ad una soluzione dei trioli ottenuti precedentemente (290 mg, 0.65 mmol) in acetonitrile (100 ml) sotto agitazione a temperatura ambiente e la miscela è stata portata a 80°C. Completata la reazione (3 h) la metà del solvente è stata rimossa a pressione ridotta, mentre la parte rimanente è stata diluita in acqua (30 ml) ed estratta con AcOEt (3 x 50 ml). Gli estratti organici combinati sono stati lavati con acqua (30 ml), essiccati su Na_2SO_4 , e concentrati sotto pressione ridotta. Il residuo è stato purificato mediante flash cromatografia (30% AcOEt in esano) fornendo così una miscela equimolare di morfolinoni **5** diastereoisomeri al C-2 (50 mg, 0.12 mmol) (resa del 18%, per due passaggi) sotto forma di un olio incolore. $R_f = 0.38$ (40% acetone in diclorometano); HRMS (ESI ioni positivi): $[\text{M}+\text{H}]^+$, trovato 429.1797. $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_4$ calc. 429.1814. ^1H NMR (500 MHz, CD_3CN): δ 9.31 (br s, 1H, ArNH), 9.27 (br s, 1H, ArNH), 7.63 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.59 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.48–6.96 (m, 26H, ArH), 6.80 (br s, 1H, NHCO), 6.76 (br s, 1H, NHCO), 5.38 (s, 1H, COCHO), 5.29 (s, 1H, COCHO),

5.10 (s, 2H, OCH₂Ph), 5.08 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.70 (d, J=7.9 Hz, 1H, CHOH), 4.54 (d, J=7.9 Hz, 1H, CHOH), 3.83-3.46 (m, 8H, CHNHCO + CHCH₂O + CHOH); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃CN): δ 134.6, 132.2, 129.7, 129.5, 129.4, 129.1, 129.0, 128.9, 128.9, 128.7, 128.6, 126.3, 126.2, 122.8, 122.8, 120.4, 120.4, 120.3, 115.8, 115.7, 112.5, 112.4, 75.4, 75.0, 74.7, 74.5, 70.7, 70.6, 64.1, 62.8, 58.6, 58.5.

Morfolinone 6: ad una soluzione di 5 (30 mg, 0.07 mmol) in una soluzione di AcOEt/EtOH (20 ml, 4:1 v/v) a temperatura ambiente è stata aggiunta una quantità catalitica di Pd(OH)₂/C (5 mg); la miscela è stata agitata sotto idrogeno atmosferico per 8 h. La miscela ottenuta come prodotto è stata filtrata su Celite e concentrata sotto pressione ridotta per dare i corrispondenti fenoli liberi sottoforma di un solido bianco amorfo. Il residuo è stato purificato con colonne cromatografiche flash (40% acetone in diclorometano) fornendo 17.8 mg di morfolinone **6** (0.053 mmol, resa del 75%) come solido bianco amorfo. I due diastereoisomeri [2(*R*)-**6** e 2(*S*)-**6**] sono stati separati impiegando una colonna Chirex (*R*)-NGLY e una colonna HPLC DNB (50 x 4.60 mm, 5 μm) usando AcOEt come eluente. I loro dati ¹H- e ¹³C-NMR sono riportati rispettivamente nella tabella 1 e 2. 2(*R*)-**6**: HRMS (ESI ioni positivi): [M+H]⁺, trov. 339.1360; C₁₉H₁₉N₂O₄ calc. 339.1345. 2(*S*)-**6**: [M+H]⁺, trovato 339.1329; C₁₉H₁₉N₂O₄ calc. 339.1345.

Modello sintetico 7: ad una soluzione di 4 (30 mg, 0.07 mmol) in una soluzione di AcOEt/EtOH (20 ml, 4:1 v/v) a temperatura ambiente è stata aggiunta una quantità catalitica di Pd(OH)₂/C (5 mg); la miscela è stata agitata sotto idrogeno atmosferico per 8 h. La miscela ottenuta come prodotto è stata filtrata su Celite e

concentrata sotto pressione ridotta per dare il corrispondente fenolo libero sottoforma di solido bianco amorfo. Il residuo è stato purificato con colonne cromatografiche flash (40% acetone in diclorometano) fornendo 18.5 mg di **7** (0.052 mmol, resa del 78%) come solido bianco amorfo. I suoi dati ¹H- e ¹³C-NMR sono riportati nella tabella 3. HRMS (ESI ioni positivi): [M+H]⁺, misurato 355.1355; C₁₉H₁₉N₂O₅ calcolato 355.1339.

8.4 Riferimenti bibliografici

1. P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. Fattorusso, M. Forino, S. Magno, *Pure Appl. Chem.* **2003**, *75*, p. 325 and literature cited there.
2. P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. Fattorusso, M. Forino, S. Magno, M. Di Rosa, A. Ianaro, R. Poletti, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, p. 13114.
3. P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. Fattorusso, M. Forino, S. Magno, P. Di Meglio, A. Ianaro, R. Poletti, *Tetrahedron* **2004**, *60*, p. 7093.
4. P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. Fattorusso, M. Forino, S. Magno, M. Di Rosa, A. Ianaro, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, p. 49.
5. P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. Fattorusso, C. Fattorusso, M. Forino, S. Magno, *Tetrahedron* **2001**, *57*, p. 8189.
6. P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. Fattorusso, M. Forino, S. Magno, F.U. Santelia, V.I. Moutsos, E.N. Pitsinos, E.A. Couladouros, *Tetrahedron* **2006**, *62*, p. 7738.
7. T. Kagamizono, E. Nishino, K. Matsumoto, A. Kawashima, M. Kishimoto, N. Sakai, B. He, Z. Chen, T. Adachi, *J. Antibiot.* **1995**, *48*, p. 1407.

8. K. Hasumi, C. Shinohara, T. Iwanaga, A. Endo, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, p. 1782.
9. M. Ijima, T. Masuda, H. Nakamura, H. Naganawa, S. Kurasawa, Y. Okami, M. Ishizuka, T. Takeuchi, Y. Iitaka, *J. Antibiot.* **1992**, *45*, p. 1553.
10. S. Nakadate, K. Nozawa, H. Horie, Y. Fujii, M. Nagai, S. Komai, T. Hosoe, K. Kawai, T. Yaguchi, K. Fukushima, *Heterocycles* **2006**, *68*, p. 1969.
11. Matsumori, D. Kaneno, M. Murata, H. Nakamura, K. Tachibana, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, p. 866.
12. E. A. Couladouros, V. I. Moutsos, E. N. Pitsinos *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, p. 7779.

Tabella 1. Dati spettroscopici ^1H e ^{13}C NMR dell'oxazinina-**5** e 2(*R*)-**6** (CD_3CN).

Position	Oxazinin- 5				2(<i>R</i>)- 6			
	δ_{H}	δ_{C}	J [Hz]	m	δ_{H}	δ_{C}	J [Hz]	m
1								
2	5.29	74.3		s	5.28	75.0		s
3		170.2				170.5		
4-NH	6.76			bs	6.74			bs
5	3.81	58.5	4.0;7.5;8.3	m	3.79	57.5	4.0;7.5;8.3	m
6a	3.50	64.2	7.5;12.0	dd	3.50	63.7	7.5;12.0	dd
6b	3.59		4.0;12.0	dd	3.59		4.0;12.0	dd
7	4.58	75.7	8.3	d	4.52	76.2	8.3	d
1'	9.33			bs	9.26			bs
2'	7.27	125.3		s	7.26	124.9		s
3'		113.2				113.2		
3'a		127.8				127.4		
4'	7.58	120.5	8.2	d	7.59	120.8	8.2	d
5'	7.05	120.3	7.5;8.2	dd	7.05	120.6	7.5;8.2	dd
6'	7.14	122.5	7.5;8.2	dd	7.13	123.2	7.5;8.2	dd
7'	7.40	112.3	8.2	d	7.41	112.8	8.2	d
7'a		137.4				137.4		
1''		135.5				137.6		
2''-6''	7.34	129.2	8.5	d	7.17	129.4	8.8	d
3''-5''	6.97	115.6	8.5	d	6.78	116.1	8.8	d
4''		158.9				157.8		
7''	4.19	64.0	6.0	t				
8''	2.85	19.6	6.0	t				
CN		119.7						
7-OH	3.57			bs		3.65		bs

Tabella 2. Dati spettroscopici ^1H e ^{13}C NMR dell'oxazinina-6 e 2(S)-6

Position	Oxazinin-6 ^a		2(S)-6 ^a			Oxazinin-6 ^b	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C} m	J [Hz] ^c	δ_{H}	J [Hz] ^c m
1							
2	5.38	73.7	5.38	74.5	s	5.72	s
3		170.4		170.1	bs		bs
4-NH	6.76		6.74			6.38	
5	3.62	56.8	3.59	57.0	3.9;7.7;9.2 m	3.24	3.9;7.7;9.2 m
6a	3.55	62.5	3.55	62.2	3.9;11.8 dd	3.14	3.9;11.8 dd
6b	3.57		3.57		7.7;11.8 dd	3.43	7.7;11.8 dd
7	4.72	75.8	4.66	76.2	9.2 d	3.97	9.2 d
1'	9.31		9.32			6.73	
2'	7.24	125.8	7.25	126.1		7.27	
3'		113.5		113.0			
3'a		127.6		127.9			
4'	7.63	119.5	7.64	120.4	8.2 d	8.08	8.2 d
5'	7.07	119.6	7.07	120.6	7.5;8.2 dd	7.22	7.5;8.2 dd
6'	7.16	121.8	7.17	122.3	7.5;8.2 dd	7.21	7.5;8.2 dd
7'	7.43	112.7	7.43	112.8	8.2 d	7.05	8.2 d
7'a		138.2		137.6			
1''		136.2		133.6			
2''-6''	7.29	128.6	7.17	129.4	8.4 d	6.71	8.8 d
3''-5''	6.93	114.9	6.78	116.1	8.4 d	6.43	8.8 d
4''		159.5		157.8			
7''	4.18	64.0				3.11	6.0 t
8''	2.84	19.1				1.63	6.0 t
CN		119.6					
7-OH	3.81			3.60	bs	3.50	bs

a) *Chemical shifts* registrati in CD_3CN ;

b) *Chemical shifts* registrati in C_6D_6 ;

c) I valori delle J sono stati valutati in C_6D_6 .

Tabella 3. Dati spettroscopici ^1H e ^{13}C NMR della pre-oxazin-7 e del composto 7 (CD_3CN).

Position	Pre-oxazin-7				7			
	δ_{H}	δ_{C}	J [Hz]	m	δ_{H}	δ_{C}	J [Hz]	m
1		183.3				182.0		
2		162.3				163.6		
3-NH	7.79			bs	7.78			bs
4	4.06	57.4		m	4.03	57.8		m
5	5.00	72.0	3.2	d	4.92	72.6	3.2	d
6a	3.63	62.8	11.4;5.6	dd	3.61	63.2	11.4;5.6	dd
6b	3.70	62.8	11.4;5.6	dd	3.69		11.4;5.6	dd
1'	10.10			bs		10.13		bs
2'	8.81	139.4		s	8.83	139.8		s
3'		113.4				113.2		
3'a		127.6				127.6		
4'	8.31	122.3	9.1	d	8.31	122.7	9.1	d
5'	7.29	124.5	7.3;9.1	dd	7.29	124.8	7.3;9.1	dd
6'	7.30	124.5	7.3;9.1	dd	7.30	124.8	7.3;9.1	dd
7'	7.54	113.0	9.1	d	7.55	113.0	9.1	d
7'a		137.2				139.8		
1''		136.5				134.6		
2''-6''	7.32	128.1	8.9	d	7.21	128.3	9.0	d
3''-5''	6.88	114.8	8.9	d	6.74	115.8	9.0	d
4''		158.4				157.2		
7''	4.14	63.6	6.2	t				
8''	2.81	19.0	6.2	t				
CN		119.4						
5-OH	3.89			bs	4.10			bs
6-OH	3.56			bs	3.48			bs

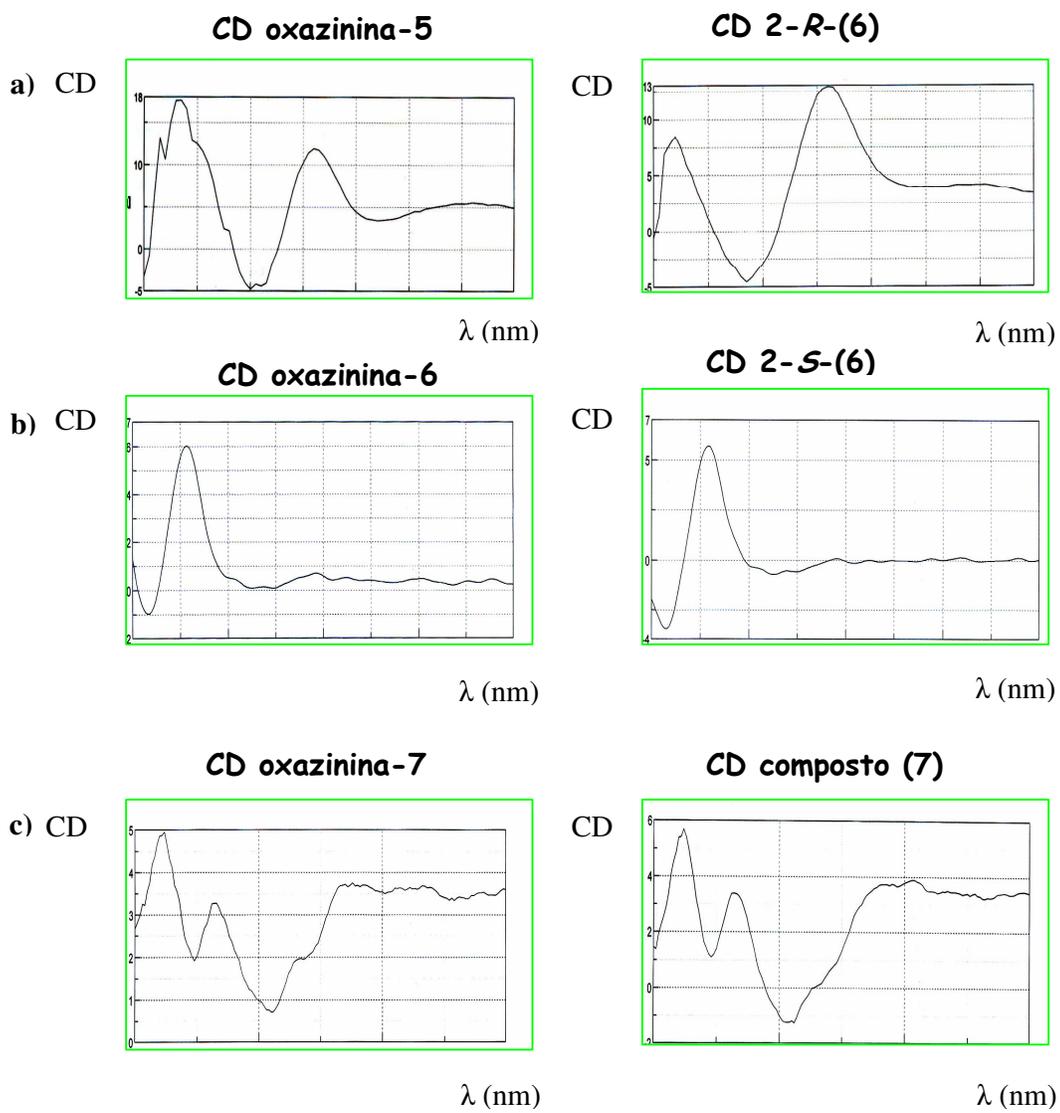
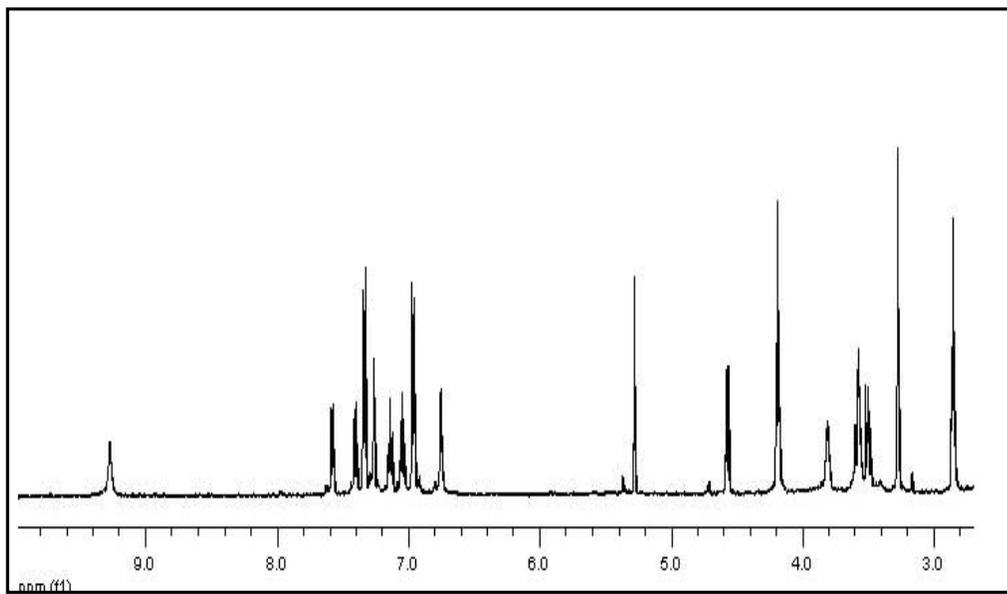
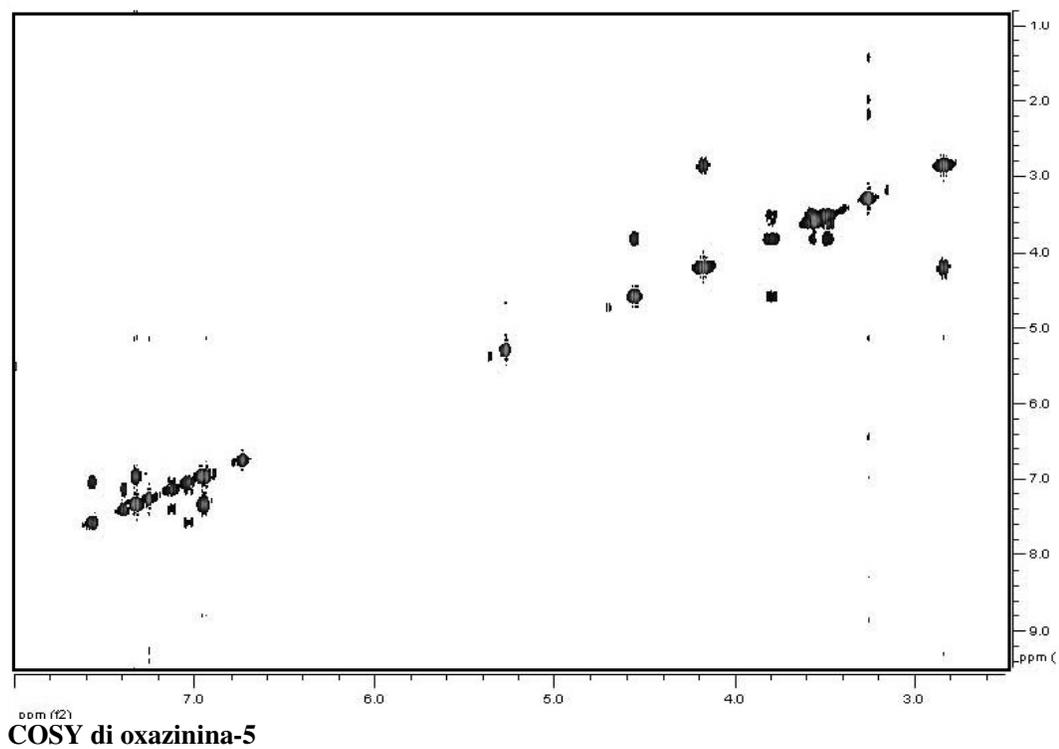


Figura 4. Spettri CD di : a) oxazinina-5 e 2(R)-6; b) oxazinina-6 e 2(S)-6; c) oxanina-7 e composto 7.

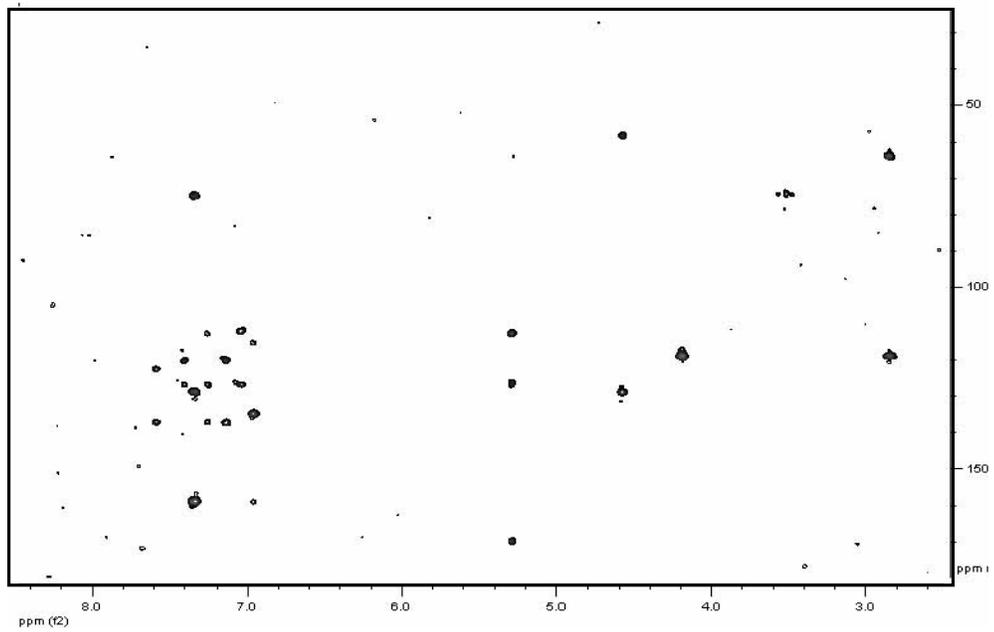
Spettri NMR delle Oxazinine.



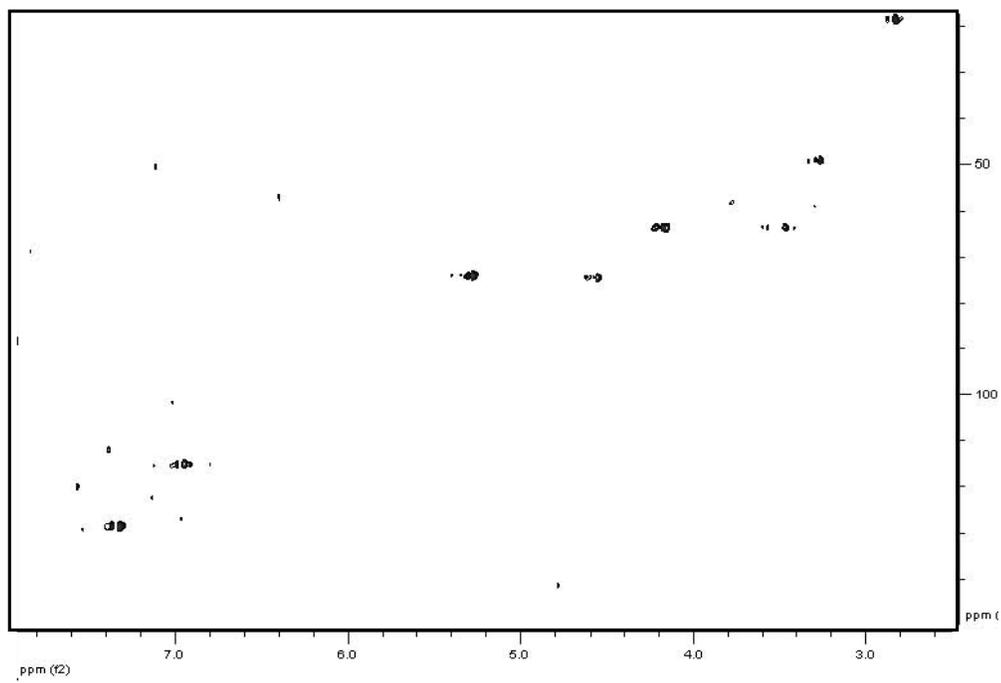
¹H- NMR di oxazinina-5.



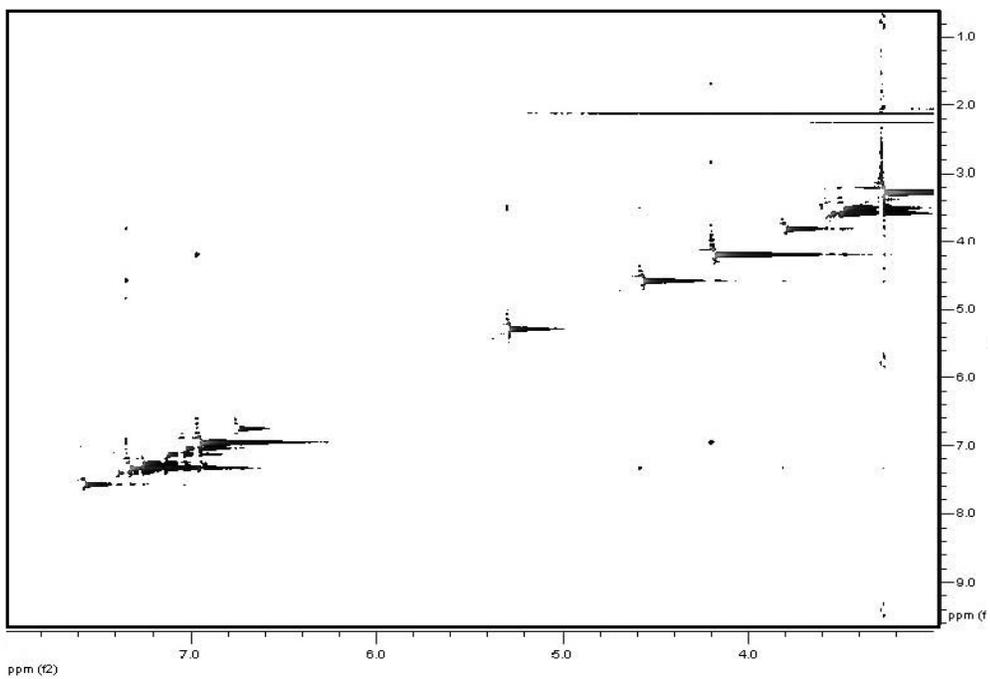
COSY di oxazinina-5



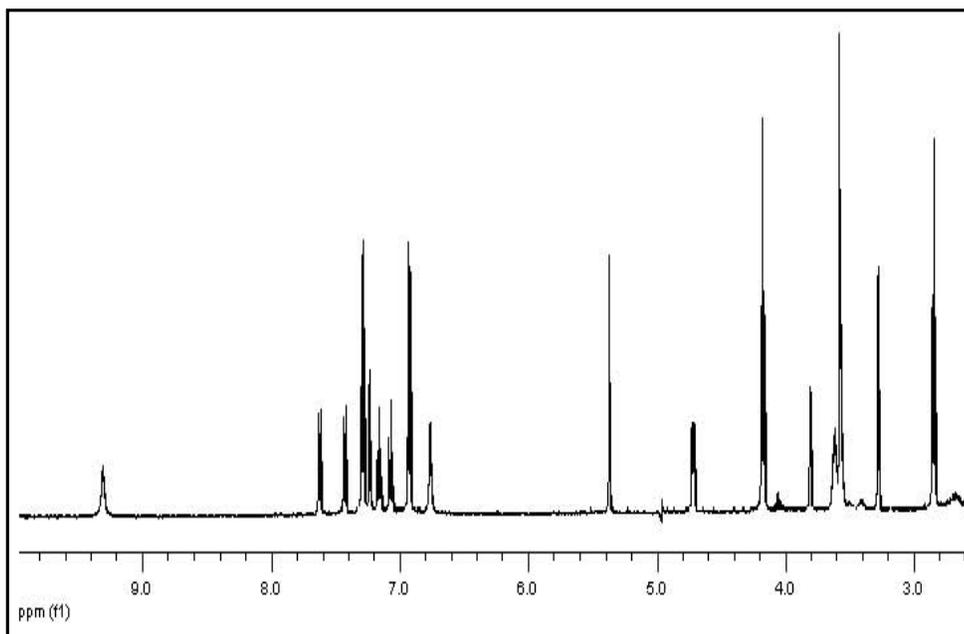
HMBC di oxazinina-5.



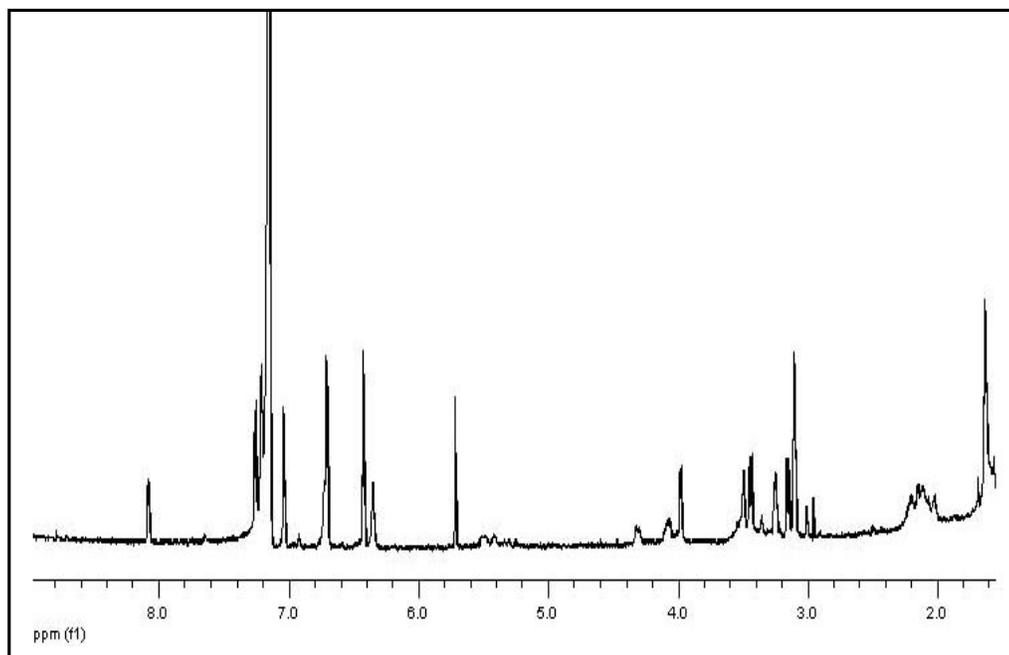
HMQC di oxazinina-5.



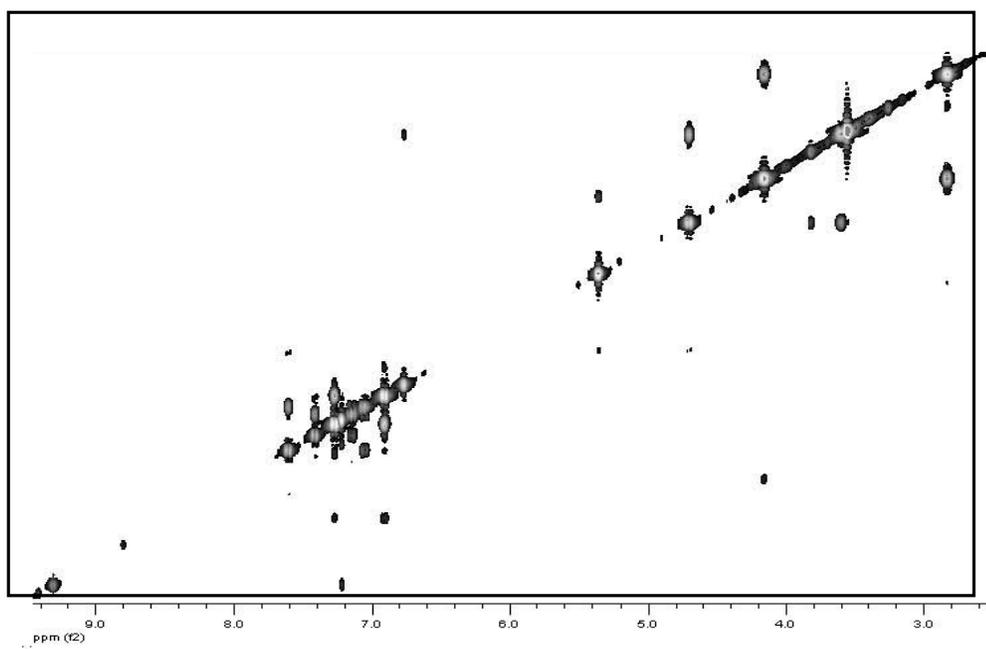
ROESY di oxazinina-5.



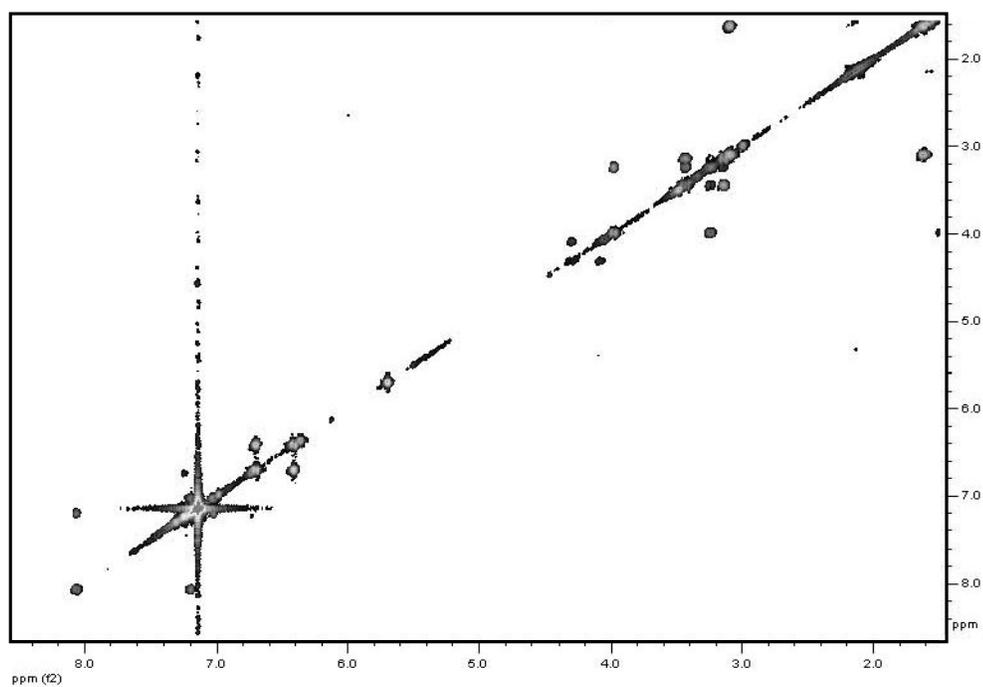
¹H-NMR di oxazinina-6 (CD₃CN)



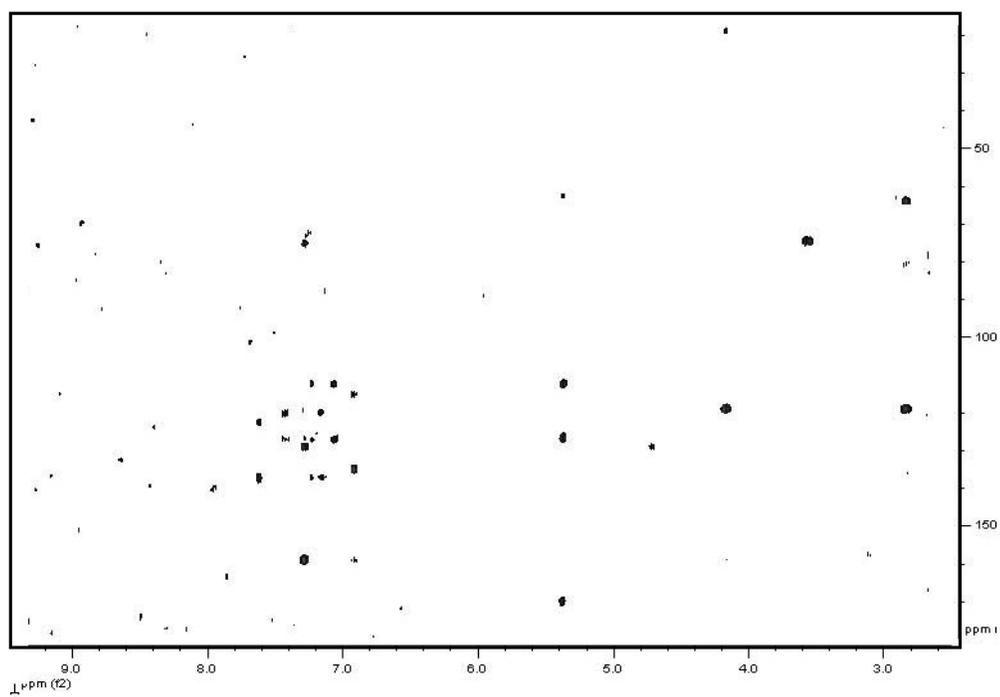
¹H-NMR di oxazinina-6 (C₆D₆)



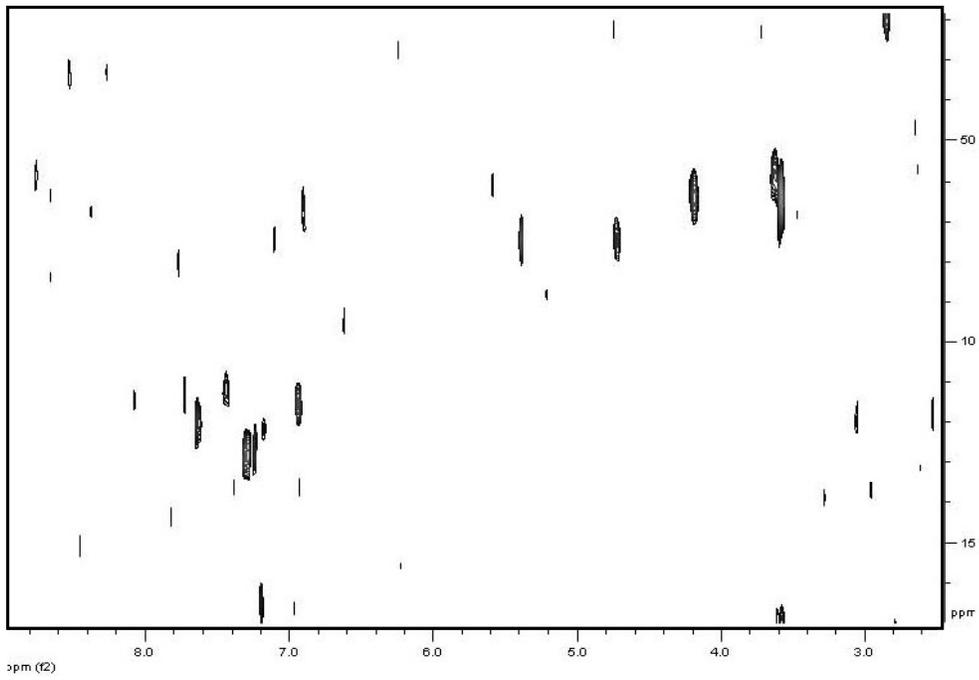
COSY di oxazinina-6 (CD₃CN).



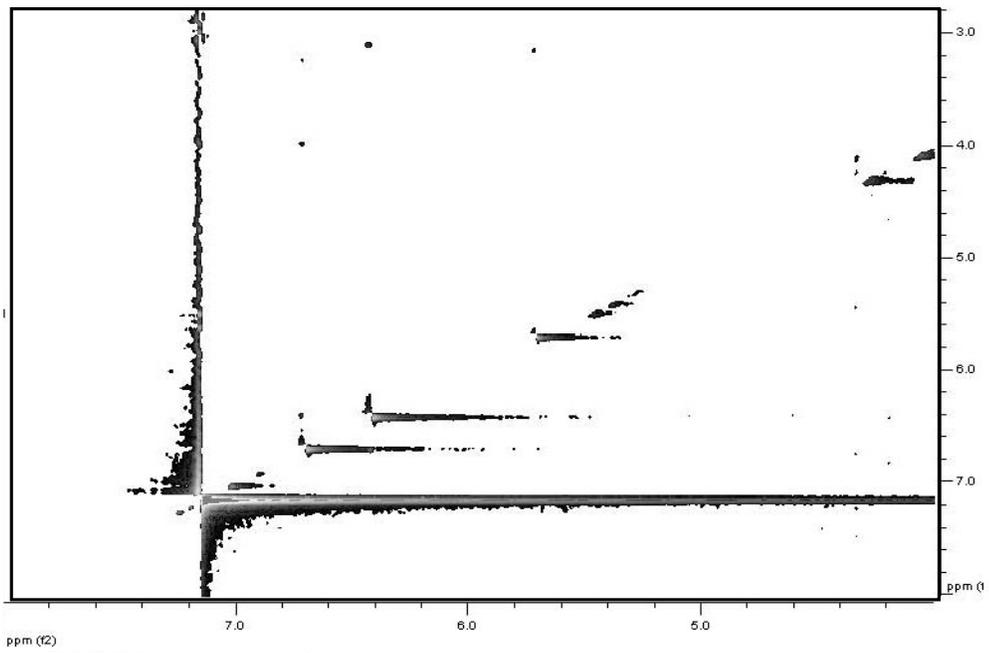
COSY di oxazinina-6 (C_6D_6).



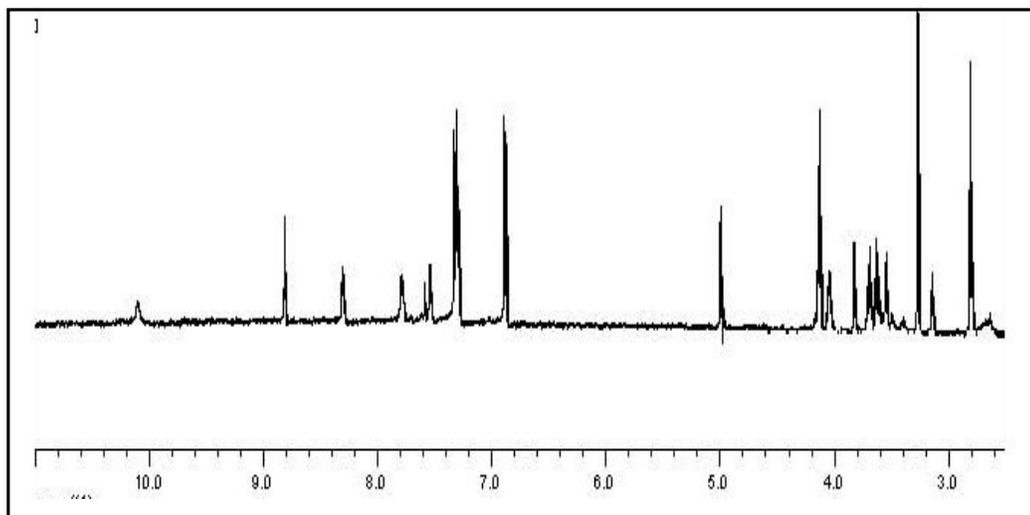
HMBC di oxazinina-6.



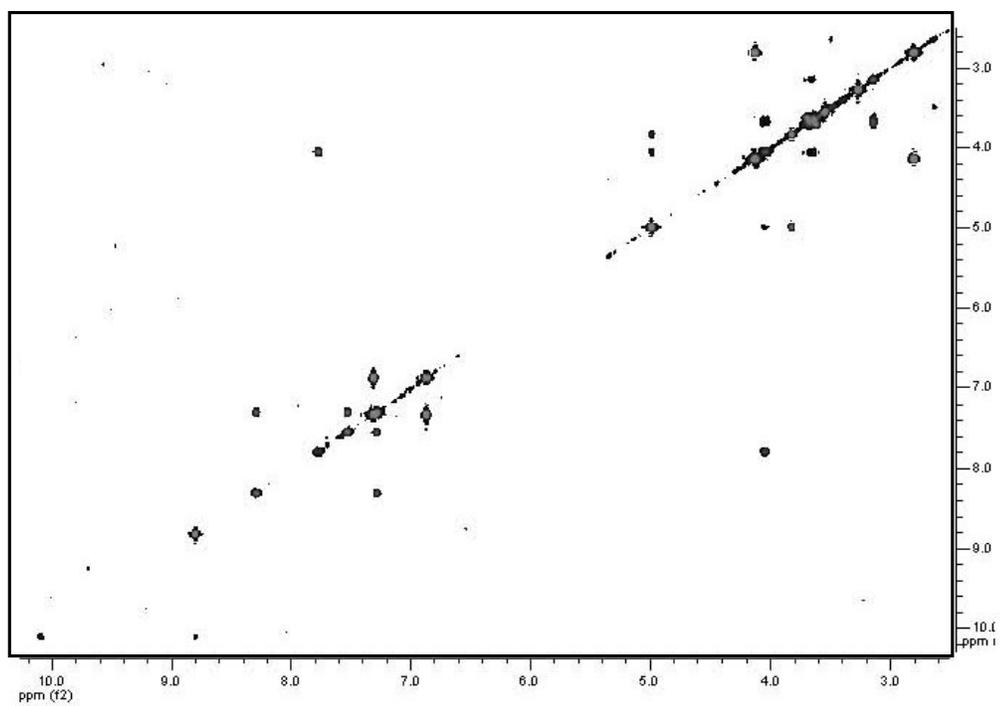
HMQC di oxazinina-6.



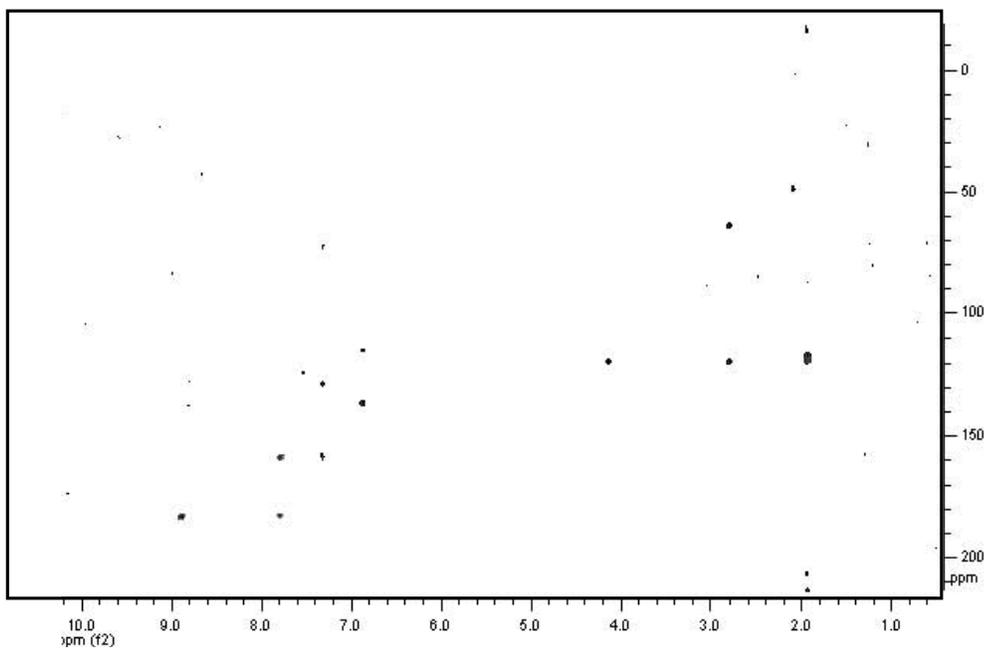
ROESY di oxazinina-6.



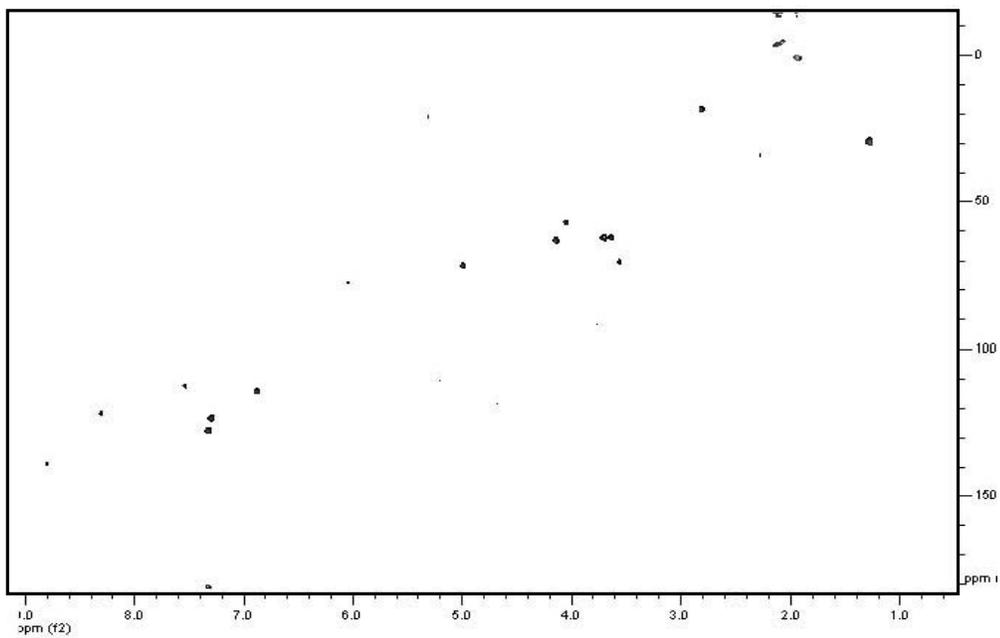
¹H-NMR di oxazinina-7.



COSY di oxazinina-7.



HMBC di oxazinina-7



HMQC di oxazinina-7.

Capitolo 9

9.1 Gli spirolidi

Gli spirolidi sono una famiglia di biotossine marine, appartenenti alla classe dei macrocicli imminici, isolate negli ultimi anni da organismi ittici contaminati presenti nelle acque dell'Europa e del Nord America. Il primo episodio di tossicità dovuto agli spirolidi è stato registrato agli inizi degli anni '90 in seguito ad ingestione di molluschi bivalvi raccolti lungo le coste orientali della Nova Scotia, Canada¹.

Dal punto di vista strutturale, gli spirolidi sono caratterizzati da un sistema ad anello in cui sono presenti tre cicli legati da spiro-giunzioni eteree e da un inconsueto ciclo a 7 termini contenente una funzione imminica.

Gli spirolidi B e D sono stati isolati per la prima volta dalle ghiandole digestive dei mitili (*Mytilus edulis*) e pettini (*Pacopecten magellanicus*) raccolti dai siti di acquicoltura⁴. Successive indagini hanno portato all'isolamento degli spirolidi A, C, e 13-desmetil spirolide C³, e degli spirolidi inattivi E e F¹ (Fig.1).

Questi ultimi sono cheto-ammine derivati dall'apertura dell'anello contenente l'immina. La classe degli spirolidi è cresciuta negli anni includendo molti isomeri e composti con piccole modifiche strutturali come il 13, 19-didesmetil spirolide C, lo spirolide G⁵ e il 20-metil- spirolide G⁶.

Studi recenti riguardanti la biogenesi degli spirolidi hanno permesso di ipotizzarne una possibile origine polichetidica. Le indagini biogenetiche sono

state effettuate mediante l'utilizzo di isotopi marcati stabili. In particolare, il 13-desmetil spirolide C è stato isolato da colture del dinoflagellato *A. ostenfeldii*, nel cui mezzo era stato precedentemente aggiunto [1,2-¹³C₂]acetato, [1-¹³C]acetato, [2-¹³CD₃]-acetato, e [1,2-¹³C₂,¹⁵N]glicina. Lo schema biosintetico è stato determinato mediante spettroscopia ¹³C-NMR sia mono che bidimensionale, che ha fornito indicazioni circa l'origine polichetidica degli spirolidi, comune alla maggior parte delle tossine polieteree prodotte da dinoflagellati (Fig. 2).

La tossicità sull'uomo è ancora sconosciuta, tuttavia, si sono verificati disturbi gastrici e tachicardia in seguito al consumo di molluschi contaminati, nel periodo in cui gli spirolidi sono stati isolati dai molluschi della Nova Scotia.

Nei topi, l'iniezione intraperitoneale degli estratti lipofili di mitili contaminati provoca una sindrome tossica inconsueta, che si manifesta con piloerezione, iperestensione degli arti posteriori, inarcamento della coda, neuroconvulsioni e rapida morte entro 2-3 minuti dall'iniezione. Studi tossicologici in vivo sul topo hanno, inoltre, fornito valori di LD₅₀ di 40 µg/kg e di 1 mg/Kg se somministrati, rispettivamente, per via intraperitoneale e per os². Ulteriori studi hanno indicato che gli spirolidi, nei mammiferi, sembrano essere antagonisti dei recettori muscarinici, e deboli attivatori dei canali transmembranari del Ca²⁺ di tipo L³.

E' stato dimostrato che, anche piccole differenze strutturali tra uno spirolide e l'altro possono comportare enormi variazioni nella tossicità. Infatti, la porzione bioattiva della struttura di questi composti è stata identificata nell'immina presente nel ciclo a 7 termini.

Di conseguenza, l'idrolisi dell'immina a gruppi chetonico e amminico, che si verifica ad esempio in seguito al metabolismo dei molluschi, dando origine ai già citati spiroolidi E ed F, porta alla formazione di un metabolita non tossico¹.

Gli spiroolidi che contengono un gruppo dimetilico vicinale nell'anello a sette termini sono resistenti all'idrolisi dell'acido ossalico, dal momento che essi non vengono rapidamente idrolizzati. Queste osservazioni suggeriscono che l'altro gruppo metilico sull'anello imminico a sette termini blocca il processo dell'idrolisi imminica, probabilmente a causa di un ingombro sterico.

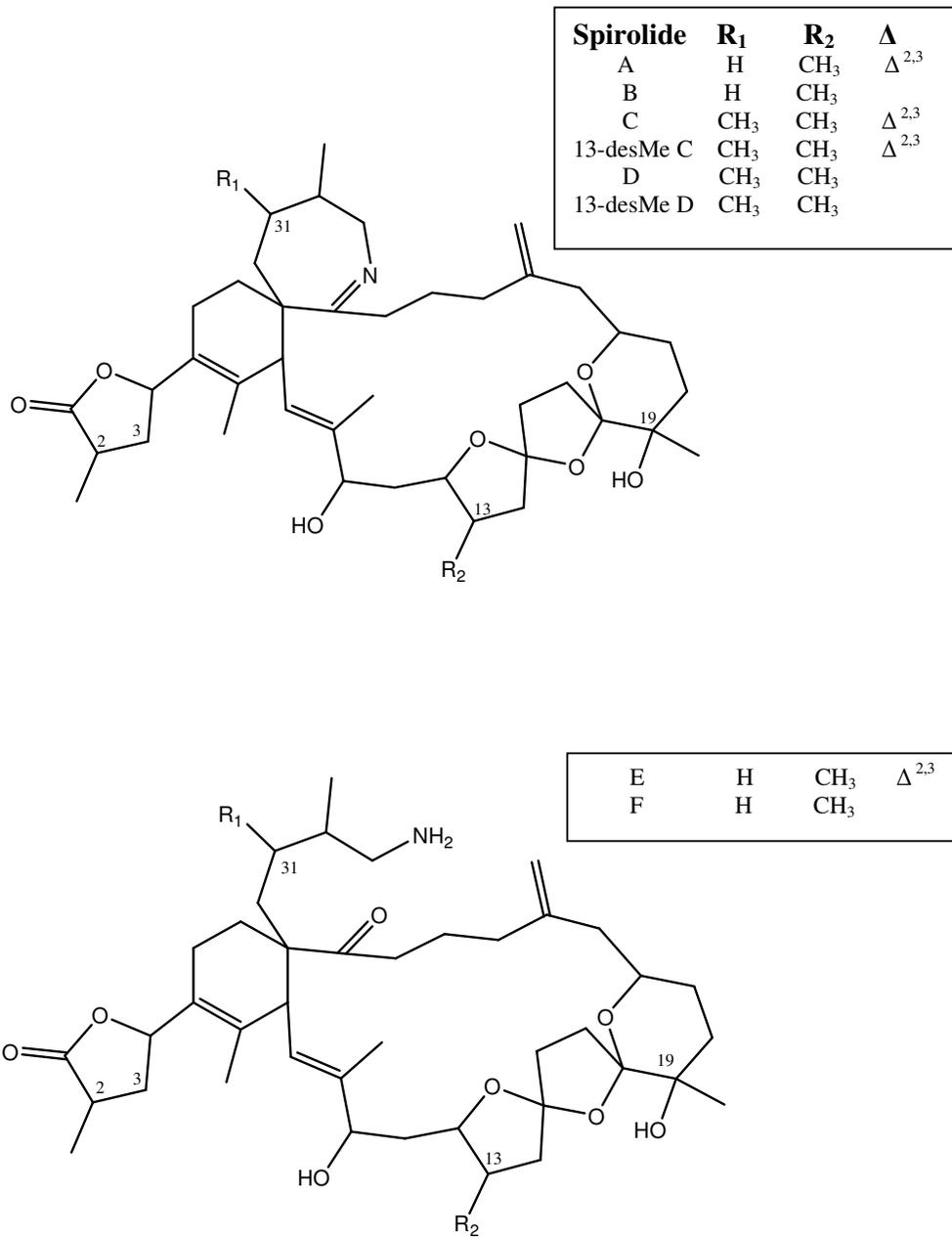


Figura 1. Struttura chimica degli Spirolidi

Recentemente, è stato riconosciuto come organismo produttore degli spiroolidi, il dinoflagellato *Alexandrium ostenfeldii* (Paulsen) Balech e Tangen (1985) proveniente da Ship Harbour, nella Nova Scotia⁷⁻⁹, anche se non sono mai stati registrati casi di avvelenamento umano legato alla fioritura di tali organismi.

È stato scoperto che l' *A. ostenfeldii* è molto comune nelle acque temperate del nord, trovandosi principalmente lungo le coste di Danimarca¹⁰, Norvegia¹¹, Scozia⁶, coste atlantiche del Canada⁹ e Nuova Zelanda¹².

Estratti grezzi ottenuti da diversi ceppi dell'*A. ostenfeldii* della Nova Scotia raccolti nelle diverse zone costiere hanno mostrato importanti, e in qualche caso anche drammatiche differenze nella tossicità e nel profilo delle tossine prodotte.

In particolare, le cellule dell'*A. ostenfeldii* della Nova Scotia contengono alti livelli di spiroolidi A, B, D, 13-desMeC, 13-desMeD, ma questi composti non sono stati trovati nei ceppi della Nuova Zelanda, le quali, invece, producono tossine PSP¹². A rendere ancora più confusa la situazione, è stata la scoperta di ceppi trovati in Scandinavia che producono sia spiroolidi che tossine PSP, ma a livelli molto bassi⁸.

In Italia, la presenza di *A. ostenfeldii* non era mai stata rivelata fino al 2003, quando sono state osservate fioriture del dinoflagellato lungo le coste dell'Emilia Romagna. A tal proposito è stata condotta una dettagliata analisi presso il nostro laboratorio, mediante l'impiego di tecniche di accoppiamento cromatografia liquida-spettrometria di massa (LC-MS), del profilo tossico di una coltura cellulare di *A. ostenfeldii*¹³.

Sulla scia dei precedenti lavori, è stata valutata la presenza degli spirolidi e delle tossine PSP nelle colture cellulari dell'*A. ostenfeldii* del Mar Adriatico. Il precedente lavoro caratterizzava l'*A. ostenfeldii* adriatico come un organismo che produce molti spirolidi, ma nessuna delle principali tossine PSP.

Le analisi LC-MS che sono state riportate sulle colture dell'*A. ostenfeldii* adriatico provavano che il 13-desmetil spirolide C (**4**) fosse la principale tossina prodotta dal dinoflagellato, tra tutti gli spirolidi noti in quel momento. La presenza di **4** (ione $[M+H]^+$ a m/z 692.5) era stata accertata grazie alla presenza dei tre seguenti *clusters* di frammentazione caratteristici dello spettro di MS/MS, acquisito su uno spettrometro di massa ESI a triplo quadrupolo:

- i) ioni a m/z 674, 656, e 638 dovuti, rispettivamente, alle conseguenti perdite di tre molecole d'acqua;
- ii) ioni a m/z 462, 444, 426, 408 dovuti al frammento tipo A e associati alle perdite d'acqua (fig 2);
- iii) un abbondante ione a m/z 164 dovuto al frammento tipo B (fig 2).

Le analisi effettuate dimostravano anche che le colture di *A. ostenfeldii* contenevano una miscela complessa di altri, potenzialmente nuovi, spirolidi.

Sfortunatamente, la scarsa quantità di materiale a disposizione ha impedito la piena determinazione strutturale di questi nuovi spirolidi, anche mediante le analisi MS/MS. Quindi, la coltura in larga scala di *A. ostenfeldii* sembrava essere uno *step* inevitabile per poter isolare i nuovi derivati in quantità maggiori.

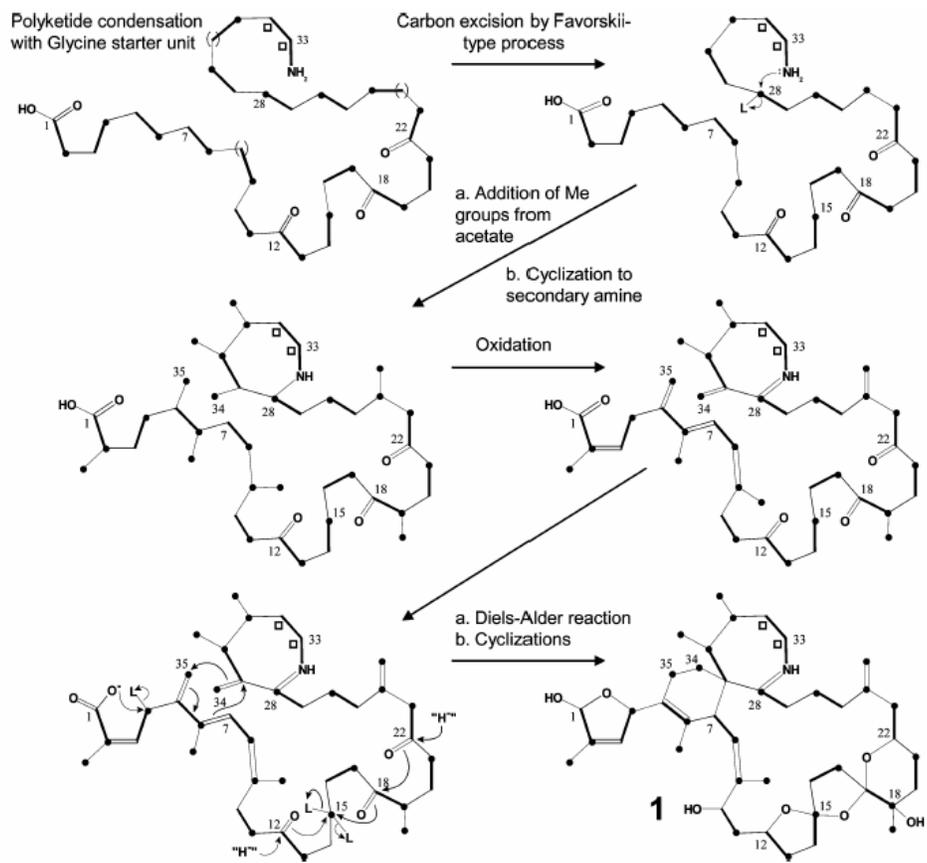


Figura 2. Schema biosintetico degli Spirolidi.

9.2 Risultati e discussione

9.2.1 Identificazione di spirolidi noti nelle colture di *A. ostenfeldii* adriatico.

Diverse colture cellulari di *A. ostenfeldii* sono state unite e centrifugate per separare i *pellet* cellulari dal mezzo di coltura. I *pellet* sono stati estratti con una soluzione di MeOH/H₂O 8:2, mentre il mezzo di coltura è stato concentrato mediante un'estrazione in fase solida (SPE). L'estratto dei *pellet* e gli eluati dell'SPE sono stati uniti e analizzati direttamente mediante LC-MS. La separazione cromatografica è stata portata avanti usando una colonna a fase inversa e una fase mobile tamponata, come suggerito da Quilliam et al. per l'analisi di diverse tossine lipofile¹⁴.

La rivelazione MS è stata realizzata utilizzando uno spettrometro di massa a trappola ionica operante in modalità *Data Dependent* (DD). Gli esperimenti DD producono dati esaurienti in una singola analisi, usando una piccola quantità di campione e in tempi brevi. In particolare, lo spettrometro di massa è stato settato per operare un esperimento di massa in *full-scan* nel *range* a *m/z* 150-1000, e successivamente, una scansione di MS/MS sugli ioni più intensi presenti nello spettro di massa in *full scan*. Gli esperimenti DD sono stati inizialmente effettuati su una soluzione standard di **4**; lo spettro ottenuto confermava che la frammentazione dello ione pseudo-molecolare generava le perdite d'acqua attese, i frammenti tipo A ma non il frammento tipo B, che si formava, invece, quando gli esperimenti di MS/MS erano realizzati su uno spettrometro di massa con analizzatore a triplo quadupolo. La tabella 1 riporta i risultati in DD per composti

che abbiamo identificato come spiroolidi sulla base dei loro tempi di ritenzione, ioni protonati e *patterns* di frammentazione.

Abbiamo osservato un numero molto più alto di spiroolidi in questo estratto di *A. ostenfeldii* rispetto a quelli riportati nel precedente lavoro. Alcuni dei derivati rilevati corrispondevano a quelli descritti in letteratura, mentre altri sembrava non fossero mai stati riportati prima.

In particolare, un composto con uno ione protonato a m/z 678.5 produceva il picco LC-MS più abbondante. Il suo *pattern* di frammentazione somigliava al 13,19-didesmetil spirolide C, recentemente descritto, per la presenza dei seguenti *clusters* di ioni nello spettro di MS/MS dello ione a m/z 678 registrato su uno MS a triplo quadrupolo:

- i) ioni a m/z 660, 642, e 624 dovuti, rispettivamente, alle conseguenti perdite di tre molecole d'acqua;
- ii) ioni a m/z 448, 430, 412, 394 dovuti ai frammenti tipo A;
- iii) uno ione abbondante a m/z 164 dovuto al frammento di tipo B.

L'individuazione indubitabile del 13,19. didesmetil C (**5**) come il componente principale di queste colture, ha richiesto il loro isolamento su larga scala, seguito da una successiva e approfondita analisi NMR. In tabella 2 sono riportati i dati NMR di **5** registrati in CD₃OD e CD₃OD con lo 0.1% di TFA. Nella soluzione acida di CD₃OD sono stati rilevati significativi *shifts* a campi bassi lungo la catena C-25/C-33. Com'è già stato riportato, ciò può essere spiegato prendendo in considerazione la protonazione dell'azoto imminico, che influenza le proprietà spettroscopiche di tutti i nuclei nelle vicinanze³.

Gli altri due principali composti presenti nell'estratto crudo avevano rapporto massa/carica, rispettivamente, a 692.5 e a 694.5. Il primo ione è stato identificato essere il 13-desMeC dal confronto con le sue proprietà LC-MS (tempo di ritenzione, pattern di frammentazione, rapporti ionici) e i suoi dati NMR con quelli di un campione standard. Il composto a m/z 694.5 sembrava essere potenzialmente un nuovo spiroside. È stato, quindi, isolato in forma pura e ne è stata approfondita l'indagine spettroscopica, come descritto nel paragrafo seguente.

9.2.2 Delucidazione strutturale del nuovo 27-idrossi-13,19-didesmetil spiroside C(8).

I dati HRESI-MS del composto **8** erano coerenti con la formula molecolare $C_{49}H_{59}NO_8$ ($[M+H]^+$ 694.43179 \pm 0.0001, calc. 694.43189). Lo spettro di massa dello ione $[M+H]^+$ a m/z 694.5 conteneva tre caratteristici *clusters* di ioni:

i) gli ioni a m/z 676, 658, 640 e 622 dovuti, rispettivamente, alle successive perdite di quattro molecole d'acqua;

ii) gli ioni a m/z 464, 446, 428, 410 dovuti al frammento di tipo A con le relative perdite d'acqua;

iii) un picco a m/z 180 dovuto al frammento di tipo B.

Ciascun picco di frammentazione di **8** differiva solo per 16 unità di massa rispetto ai picchi di frammentazione del 13,19-didesMeC. Inoltre, nello spettro di MS/MS di **8** era presente un'ulteriore perdita d'acqua dallo ione pseudo-molecolare protonato rispetto al composto **5**. I dati descritti indicavano che **8**, in confronto a **5**, possedeva un ulteriore atomo di ossigeno, in pieno accordo con la formula molecolare calcolata. I dati di MS/MS hanno permesso di localizzare la

posizione del gruppo ossigenato nella porzione della struttura che produce il frammento di tipo B.

I risultati derivanti da un'ampia analisi 1D- e 2D-NMR di **8** hanno confermato la precedente ipotesi strutturale e hanno permesso di posizionare la funzione ossigenata sul nuovo composto. In particolare, l'interpretazione degli esperimenti COSY e TOCSY ha permesso di identificare quattro sistemi di *spin*, rappresentati con le linee in grassetto in fig 3.

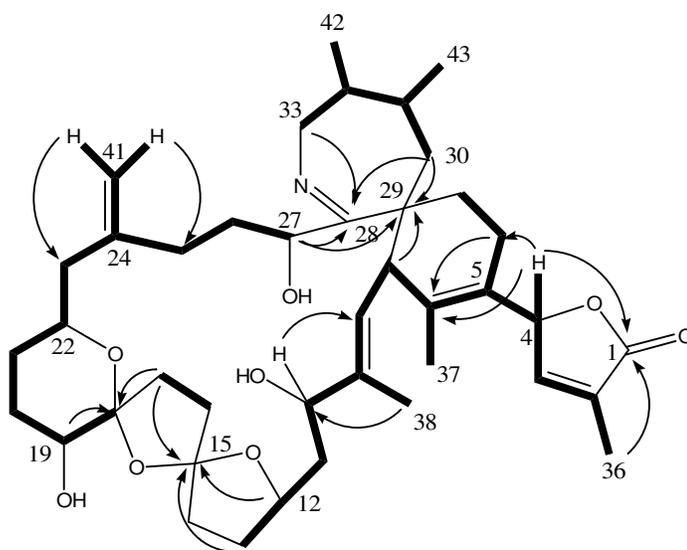


Figura 3. Le linee in grassetto rappresentano i 4 sistemi di spin 27-idrossi-13,19-didesmetil spirolide C rivelati in un esperimento HOHAHA. Le frecce evidenziano correlazioni HMBC chiave determinati per l'assegnazione della struttura planare di **8**.

Inoltre, attraverso un esperimento HSQC tutti i protoni sono stati correlati ai loro relativi carboni. Allo scopo di stabilire la posizione della funzione ossigenata sul C-27, che rappresenta l'innovazione strutturale del composto **8** rispetto al **5**, abbiamo focalizzato l'attenzione sugli H₂-41 risonanti rispettivamente a 4.78 (H-41a) e 4.80 (H-41b).

In particolare, H-41a, presentando un accoppiamento *long range* con H-25, ha permesso di selezionare un sistema di *spin* che coinvolgeva C-25, C-26 e C-27 (tab. 2), in cui, rispetto a **5**, una funzione ossimetinica (δ_H 4.22 e δ_C 69.2) sostituiva il tipico gruppo metilenico sul C-27, comune a tutti gli spiroolidi finora caratterizzati. Alcune correlazioni HMBC chiave insieme ad alcune significative correlazioni ROE, tutte descritte in figura 3, sono state determinanti per connettere i 4 sistemi di *spin*, definendo così la struttura planare del 27-idrossi-13,19-didesmetil spirolide C (figura 4).

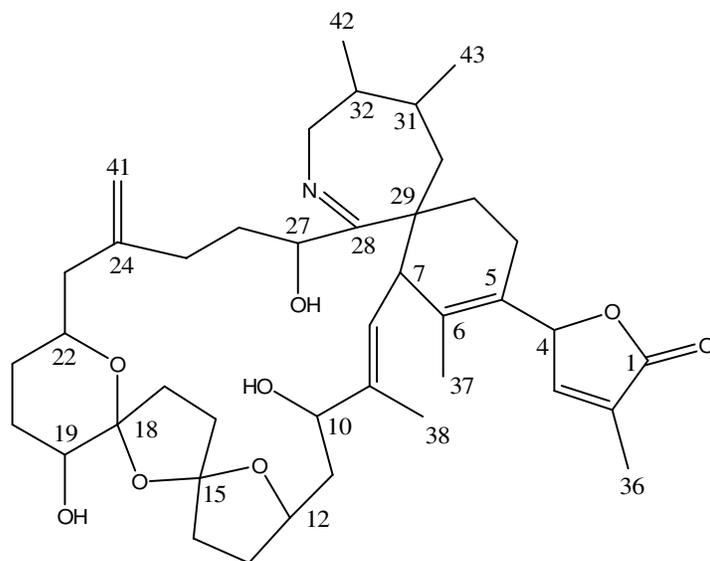


Figura 4. Struttura planare del 27-idrossi-13,19-didesmetil spirolide C.

9.2.3 Indagine strutturale degli spiroolidi minori mediante LC-MS/MS.

La maggior parte degli spiroolidi riportati nella tabella 1 erano presenti in quantità troppo esigue per poterne effettuare un'indagine NMR; per questo motivo, sono state investigate solo mediante l'analisi MS/MS. Gli spettri dello ione prodotto sono stati registrati su uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo selezionando come ioni precursori, gli ioni più abbondanti (m/z 692, 708, 710, 734, 750 e 764) (figura 5). L'analisi dei pattern di frammentazione di ciascun componente suggeriva che questi ioni fossero dei nuovi potenziali spiroolidi.

- In particolare, era presente un composto con uno ione protonato a m/z 692.5 (Rt 9.33 min) (figura 5a), un analogo isobaro di **4**, che eluiva 2.3 min dopo, ed era paragonabile a **4** nei frammenti di tipo A, ma presentava un diverso frammento di tipo B (m/z 178 contro m/z 164 di **4**). Con una soglia di incertezza, si poteva ipotizzare che fosse presente un ulteriore gruppo metilico o metilenico nella struttura parziale che produce il frammento B, e nel contempo mancasse uno dei suddetti gruppi nella catena comprendente i C-12 e C-25.
- Un composto a m/z 708.5 (Rt 6.91 min) (figura 5b), che possiede lo stesso frammento di tipo B di **8**, ma che presenta frammenti di tipo A di 14 unità di massa più piccoli. Quanto detto, suggeriva che un ulteriore gruppo metilico o metilenico fosse presente nella regione C-12/C-25, molto probabilmente un metile in posizione C-13 o C-19, come succede negli scheletri spiroolidici più comuni.

- Un composto a m/z 710.5 (Rt 6.17 min) (figura 5c) mostrava lo stesso frammento di tipo B di **8** ma il suo peso molecolare e i frammenti di tipo A erano *shiftati* di 16 unità di massa più in basso. Di conseguenza, molto probabilmente conteneva una funzione ossigenata in più nella regione C-12/C-25.
- L'analisi dello spettro di MS/MS dello ione a m/z 734.5 (Rt 7.32 min) (figura 5d) mostrava la presenza di una miscela di due composti presentanti lo stesso ione $[M+H]^+$ e lo stesso ione frammento di tipo B a m/z 164, ma due diversi *clusters* di frammenti di tipo A, rispettivamente a m/z 504/486/468 e m/z 476/458/440.
- Un composto a m/z 750.5 (Rt 6.98 min) (figura 5e) presentava un peso molecolare che differiva da quello di **8** di 56 unità di massa. La modifica strutturale è presumibilmente nella catena che produce il frammento di tipo B (m/z 236), perché anch'esso differisce di 56 una rispetto al corrispondente ione in **8** (m/z 180).
- Un composto a m/z 764.5 (Rt 7.53 min) (figura 5f) era paragonabile al composto a m/z 750.5 nei frammenti di tipo B, ma presentava frammenti di tipo A di 14 una più piccoli.

L'assegnazione della struttura completa può essere completata solo attraverso l'indagine NMR che richiede una maggiore quantità di ciascuno spiroside puro. Proprio a questo scopo, una coltura in larga scala di *A. ostenfeldii* è attualmente sotto analisi nei nostri laboratori.

9.3 Parte Sperimentale

Colture di *A. Ostensfeldii*

Le colture cellulari di *A. Ostensfeldii* sono state isolate da campioni raccolti nel novembre 2003 nel mar Adriatico nord occidentale, lungo le coste dell' Emilia Romagna (Italia). Il dinoflagellato è stato isolato mediante il metodo della micropipetta e dopo un'iniziale crescita in micro-piastre, si è lasciato crescere le colture unialgali in beute sterili Erlenmeyer sigillate con tappi di cotone sotto i 20°C a 16:8 h LD cycle (ca 90 μ mol m⁻² s⁻¹ lampada bianca); i nutrienti sono stati aggiunti alla concentrazione f/2, e l'acqua salina aggiustata a 30 psu. Per gli studi sulla tossicità l'*A. Ostensfeldii* è stato coltivato in un volume maggiore usando beute Erlenmeyer da 2 litri, ciascuna contenente circa 1,5 l di mezzo di coltura. Le cellule sono state raccolte in fase stazionaria avanzata di crescita al 30° giorno da un volume totale di 20 l. La raccolta è stata effettuata in due fasi: all'inizio le alghe sono state concentrate attraverso una filtrazione blanda su filtri da 0.45 μ m Millipore per evitare la rottura delle cellule e poter valutare in maniera corretta il contenuto di tossine nelle cellule e nel mezzo; la sospensione algale concentrata (10-15 ml) è stata successivamente centrifugata a 3000 g per 15 minuti a 10°C. Il pellet algale e i terreni di coltura sono stati congelati e conservati a -20°C per le analisi del contenuto di tossine. Il numero di cellule su cui sono state determinate le tossine è stato valutato attraverso il conteggio in un subcampione, effettuato al momento della raccolta, secondo il metodo di Utermöhl.

Saggi di estrazioni e purificazioni

Le cellule coltivate (18×10^7 cellule) sono state estratte in una soluzione (20ml) di metanolo/acqua (8:2 v/v) e soniate, in un bagno di ghiaccio, per 5 minuti. La miscela è stata centrifugata a 5000 rpm per 10 minuti e il pellet è stato estratto altre 2 volte, ciascuna con 20 ml di metanolo/acqua (8:2 v/v). I surnatanti sono stati tutti uniti e il volume è stato portato a 60 ml con il solvente di estrazione. Il mezzo di coltura (20 l) è stato filtrato separatamente con dei filtri da $0.45 \mu\text{m}$ (Millipore, Malsheim, France). Il filtrato è stato estratto attraverso SPE, quindi caricato su colonne Sep-Pak C-18 equilibrate precedentemente con acqua. Le colonne sono state eluite con 10 ml acqua, 10 ml acqua/acetonitrile (7:3 v/v), 10 ml acqua/acetonitrile 1:1 v/v) e 10 ml di acetonitrile. L'estratto dei pellet e tutti gli eluati dell'SPE sono stati riuniti e separati su una colonna ODS equilibrata con una soluzione di acetonitrile/acqua (1:9 v/v). La colonna è stata eluita con diverse miscele di acetonitrile/acqua a polarità decrescente (1:9, 3:7, 1:1, v/v) fino ad arrivare all'acetonitrile 100%.

La successiva purificazione della frazione contenente gli spiroolidi è stata effettuata mediante HPLC con rivelatore UV (λ 210 nm) utilizzando una colonna $10 \mu\text{m}$ Luna C18 $250 \times 10 \text{ mm}$ (Phenomenex, Torrance, CA, USA) eluita isocraticamente con una soluzione di acetonitrile/acqua (2:8 v/v) a cui è stato aggiunto lo 0.1% di acido trifluoroacetico. L'ultima purificazione HPLC è stata eseguita su una colonna da $3 \mu\text{m}$ Hypersil C-8 BDS, $50 \times 4.60 \text{ mm}$ (Phenomenex, Torrance, CA, USA) eluita con acqua (eluente A) e acetonitrile (eluente B).

Per l'eluizione è stato usato un sistema a gradiente, vale a dire dal 10 al 30% di B in 4 minuti, 30-80% in 24 min, 80-100 % B in 15 min. Il flusso era di 750 µl min⁻¹ (rivelatore UV 210 nm). Le analisi LC-MS sono state effettuate durante la procedura di purificazione per controllare la presenza di spirolidi in ogni frazione.

9.4 Riferimenti Bibliografici

1. Hu, T., Curtis, J.M., Oshima, Y., Walter, J.A., W.M., Wright, J.L.C., *Tetrahedron Letters* **1996**, 37 (43), p. 7671.
2. Richard, D., Arsenault, E., Cembella, A., Quilliam, M. A. *Harmful Algal Blooms 2000*. In Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO (Hallegraeff, G. M., Blackburn, S. I., Bolch, C. J., Lewis, R. J., Eds.) **2000**, p. 383.
3. Hu, T., Burton, I. W., Cembella, A. D., Curtis, J. M., Quilliam, M. A., Walter, J. A., Wright, J. L. C. *J. Nat. Prod.* **2001**, 64, p.308.
4. Hu, T., Curtis, J. M., Oshima, Y., Quilliam, M. A., Walter, J. A., Watson-Wright, W., Wright, J. L. C. *J. Chem. Soc., Chem. Communic.*, **1995**, p.2159.
5. MacKinnon, S., L., Walter, J., A., Quilliam, M., A., Cembella, A., D., LeBlanc, P., Burton, I., W., Hardstaff, W., R., Lewis, N., I. *J. Nat. Prod.* **2006**, 69, p. 983.
6. Aasen, J., MacKinnon, S. L., LeBlanc, P., Walter, J. A., Hovgaard, P., Aune, T., Quilliam, M. A. *Chem. Res. Toxicol.* 2005, 18, p. 509.
7. Cembella, A. D., Lewis, N. I., Quilliam, M. A. *Natural Toxins* **1999**, 7, p. 197.

8. Cembella, A. D., Quilliam, M. A., Lewis, N. I. *Phycologia* **2000**, 39, p. 67.
9. Cembella, A. D., Bauder, A. G., Lewis, N. I., Quilliam, M. A. *J. Plank. Res.*, **2001**, 23 (12), p. 1413.
10. Moestrup, O., Hansen, P. J. *Ophelia* **1988**, 28 (3), p. 195.
11. John, U., Cembella, A.D., Hummert, C., Elbrächter, M., Groben, R., Medlin, L. K. *Eur. J. Phycol.* **2003**, 38, p. 25.
12. Mackenzie, L., White, D., Oshima, Y., Kapa, J. *Phycologia* **1996**, 35 (2), p. 148.
13. Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Magno, S., Tartaglione, L., Cangini, M., Pompei, M., Guerrini, F., Boni, L., Pistocchi, R. *Toxicon* **2006**, 47, p. 597.
14. Quilliam, M. A., Hess, P., Dell'Aversano, C. In, *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the turn of the Millenium*, (deKoe. W. J., Sampson, R. A., van Egmond, H. P., Gilbert, J., Sabino, M. Eds) deKoe, W. J., Wageningen, The Neatherlands, **2001**, p. 383.

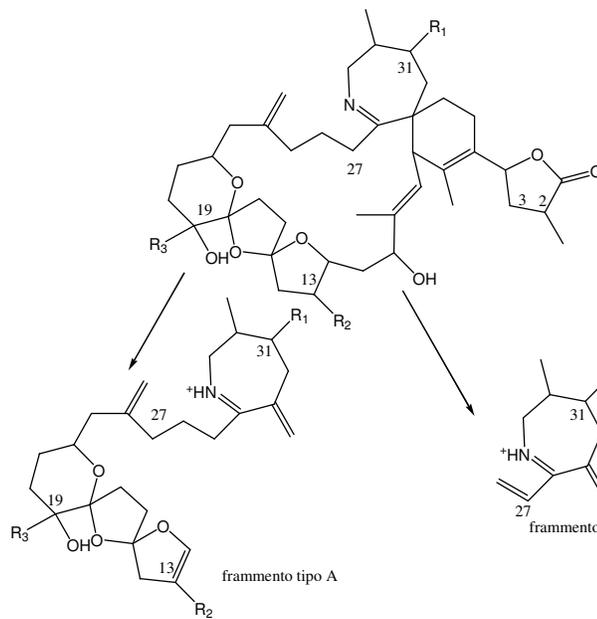
Tabella 1. Composti protonati, frammentazioni dovute a conseguenti perdite d'acqua, frammenti caratteristici di tipo A con le perdite d'acqua associate per alcuni spiroolidi presenti nell'estratto crudo di colture cellulari di *Alexandrium ostenfeldii* (i valori *m/z* in grassetto indicano I picchi più abbondanti di ciascun cluster).

[M+H]⁺ (<i>m/z</i>)	Rt (min)^b	Perdite d'acqua (<i>m/z</i>)	Frammenti di tipo A (<i>m/z</i>)
596.5	6.95	578/560/542/524	448/ 430 /412/394
596.5	6.95	578/560/542/524	446 /428/410/392
660.5	8.85	642/624/606	530/ 512 /494/476/458
678.5 ^c	6.67	660/642/624	448/ 430 /412/394
692.5	9.33	674/656/638/620	444 /426/408
692.5 ^d	7.04	674/656/638	462/ 444 /426/408
694.5	6.43	676/658/640/622	464/ 446 /428/410
706.5	7.25	688/670/652/634	460 /442/424/406
708.5	6.91	690/672/654/636	478/ 460 /442/424
710.5	6.17	692/674/656/638	462 /444/426
710.5	5.90	692/674/656/638	490/ 472 /454/436
734.5	7.32	716/698/680	504/ 486 /468
734.5	7.32	716/698/680	476/ 458 /440
750.5	6.98	732/714/696	520/ 502 /484/466
764.5	7.53	746/728/710	534/ 516 /498

Tabella 2. Dati ^1H and ^{13}C NMR del 13,19- didesmetil spiroside C (**5**) in CD_3OD e CD_3OD con lo 0.1 % di TFA, e 27-idrossi-13,19-didesmetil spiroside C (**8**) (CD_3OD). I valori di chemical shift in grassetto indicano le maggiori differenze tra i composti **5** e **8**. I valori di ^{13}C NMR di **5** and **8**, sono stati ottenuti rispettivamente mediante HSQC e HMBC.

Posizione	5 (CD_3OD 0.1% TFA)		5 (CD_3OD)		8 (CD_3OD)	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	176.6	-	176.5	-	176.8
2	-	131.0	-	131.0	-	131.1
3	7.14	149.3	7.12	149.5	7.15	149.8
4	5.99	81.9	5.95	82.3	5.97	82.9
5	-	126.4	-	126.7	-	126.8
6	-	132.9	-	134.2	-	134.8
7	3.83	47.8	3,59	48.6	3.87	48.9
8	5.18	122.6	5.17	124.9	5.20	125.7
9	-	146.1	-	144.0	-	143.8
10	4.12	76.8	4.09	77.4	4.11	77.8
11	1.38, 2.29	45.5	1.37, 2.32	45.5	1.41, 2.33	45.7
12	4.36	79.6	4.31	81.0	4.35	80.2
13	1.70, 2.29	32.6	1.70, 2.30	32.6	1.77, 2.30	32.8
14	1.96, 2.29	37.5	1.93, 2.27	35.9	1.98, 2.29	35.1
15	-	118.0	-	117.8	-	118.0
16	1.95, 2.25	34.9	1.93, 2.23	35.0	1.92, 2.22	35.0
17	2.08, 2.14	35.2	2.07, 2.10	34.3	2.06, 2.12	35.6
18	-	109.7	-	111.5	-	114.4
19	3.37	71.6	3.33	71.7	3.37	71.7
20	1.57, 1.72	29.3	1.58, 1.68	28.6	1.56, 1.71	27.4
21	1.21, 1.72	31.0	1.19, 1.66	30.8	1.16, 1.68	31.0
22	3.86	69.5	3.91	70.6	3.94	71.7
23	2.07, 2.38	46.1	2.01, 2.32	47.0	2.06, 2.35	47.2
24	-	145.4	-	145.8	-	147.9
25	1.87, 1.89	35.2	1.56, 2.12	35.1	1.66, 1.89	33.2
26	1.87, 1.96	22.5	1.38, 2.00	23.0	1.45, 2.42	31.5
27	2.89, 3.10	36.1	2.32, 2.32	35.3	4.22	69.2
28	-	202.7	-	178.0	-	177.1
29	-	52.5	-	50.6	-	50.8
30	1.83, 2.05	36.4	1.58, 1.74	38.3	1.61, 1.68	38.1
31	1.05	37.4	1.11	36.9	1.06	37.0
32	1.70	38.6	1.38	41.3	1.44	41.2
33	3.56, 4.24	51.6	3.45, 3.78	53.1	3.57, 3.89	53.9
34	1.70, 1.96	32.3	1.72, 1.96	33.0	1.87, 1.96	33.4
35	1.69, 2.28	20.1	1.70, 2.27	20.2	1.55, 2.14	20.1
36	1.92	10.4	1.92	10.4	1.94	10.5
37	1.74	16.7	1.73	17.1	1.77	17.2
38	1.92	12.6	1.88	12.6	1.93	12.5
39	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-
41	4.92, 4.95	113.1	4.74, 4.78	111.2	4.78, 4.80	111.3
42	1.07	18.7	1.05	18.7	1.05	18.6
43	1.13	20.0	1.01	20.0	1.01	19.7

Figura 1. Strutture dei principali spiroliidi e dei relativi ioni frammento ottenuto nello spettro di MS/MS.



	Spirolide	R ₁	R ₂	R ₃	Δ	[M+H] ⁺ (m/z)	A-type Fragments (m/z)	B-type Fragment (m/z)
1	A	H	CH ₃	CH ₃	Δ ^{2,3}	692.5	462/ 444 /426	150
2	B	H	CH ₃	CH ₃		694.5	462/ 444 /426	150
3	C	CH ₃	CH ₃	CH ₃	Δ ^{2,3}	706.5	476/ 458 /440	164
4	13-desMeC	CH ₃	H	CH ₃	Δ ^{2,3}	692.5	462/ 444 /426/408	164
5	13,19-didesMeC	CH ₃	H	H	Δ ^{2,3}	678.5	448/ 430 /412/394	164
6	D	CH ₃	CH ₃	CH ₃		708.5	476/ 458 /440	164
7	13-desMeD	CH ₃	H	CH ₃		694.5	462/ 444 /426	164

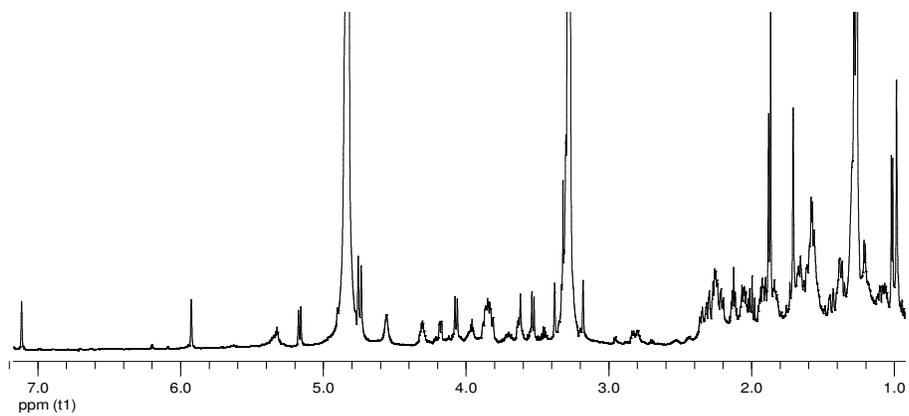
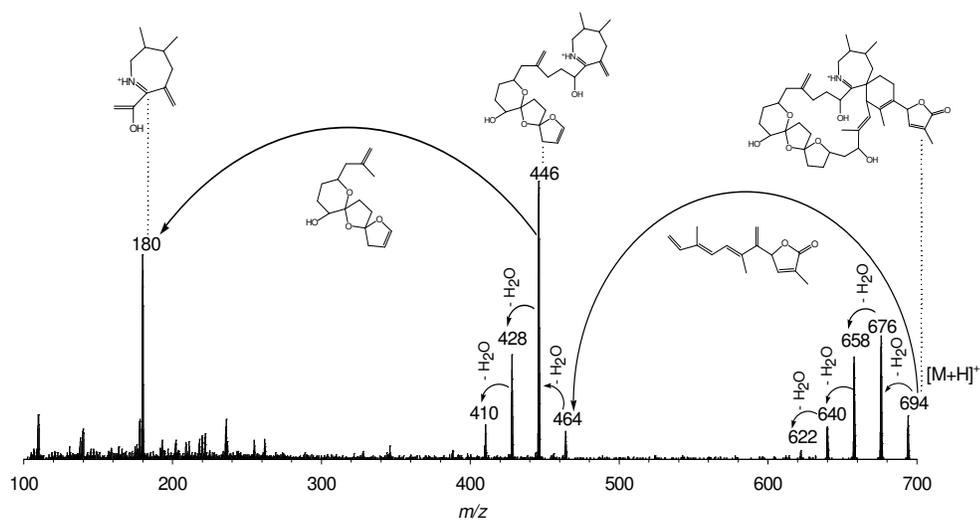


Figura 2. a) spettro di MS/MS; b) spettro $^1\text{H-NMR}$ del 27-idrossi-13,19-didesmetil spirolide C (**8**).

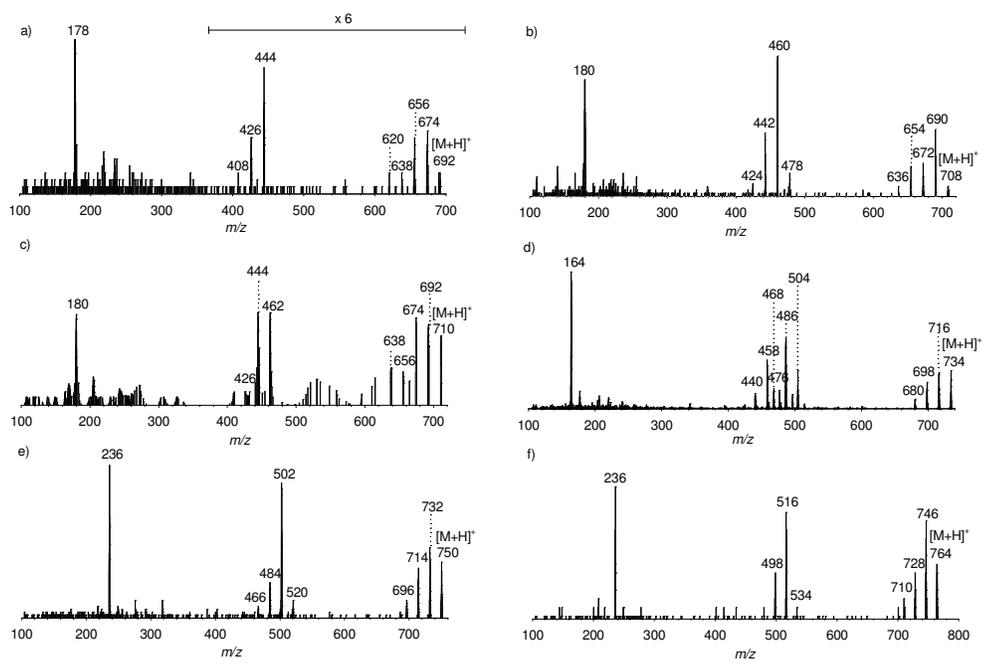
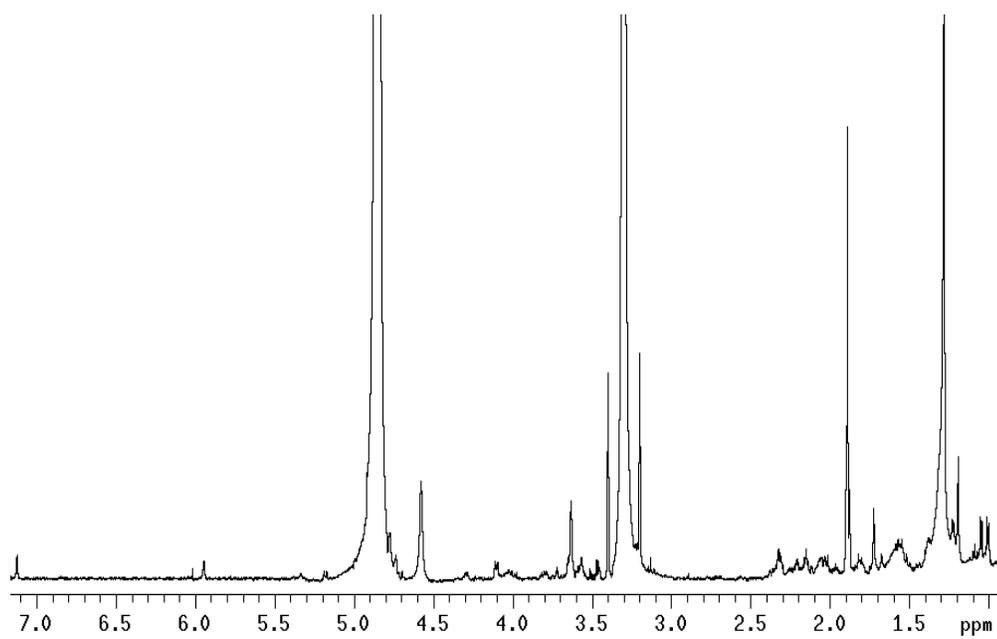
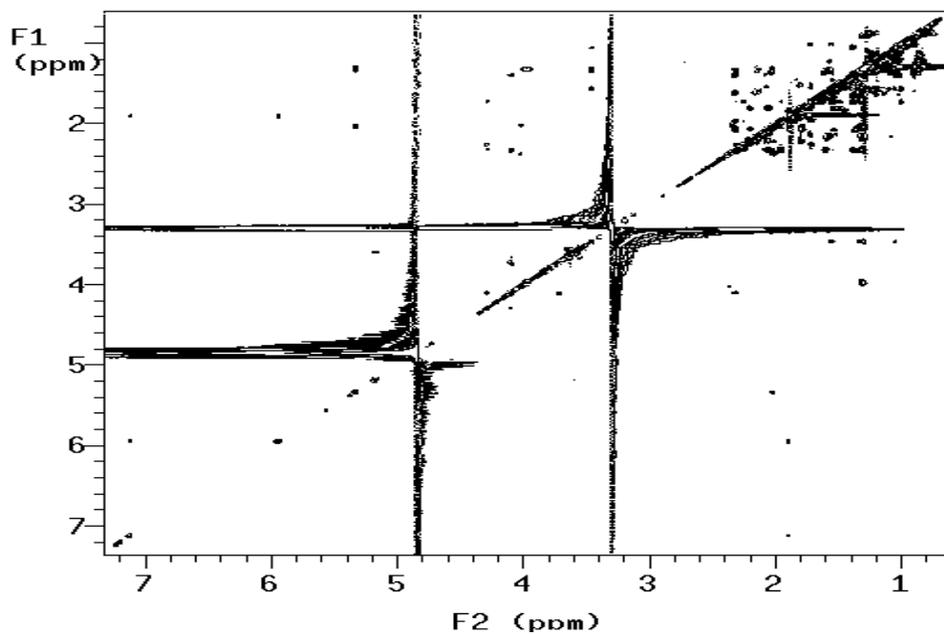


Figure 5. Spettri MS/MS di spirolidi minori dalle colture di *A. ostentfeldii*.

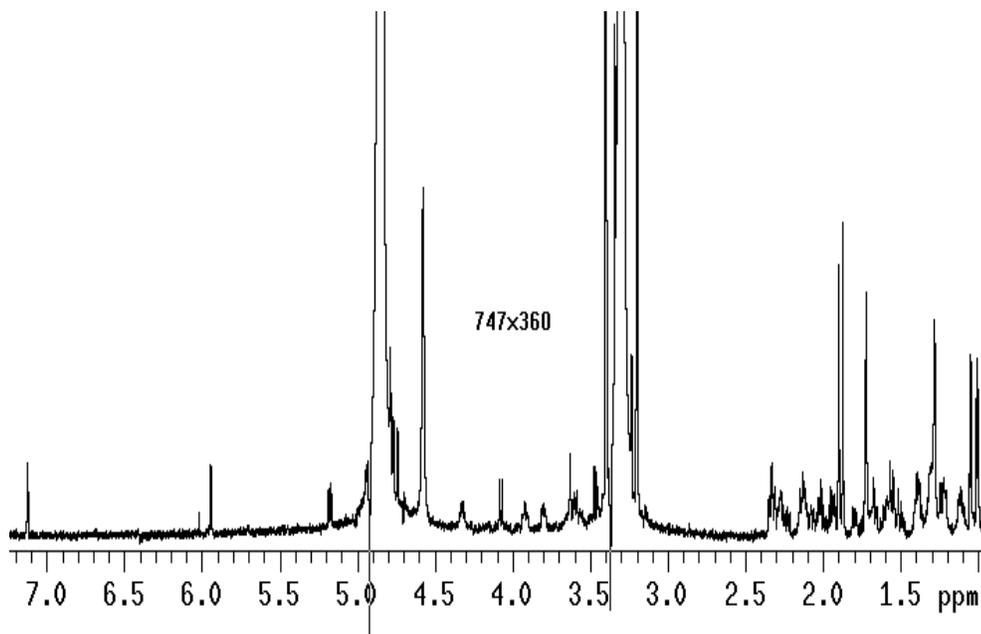
Spettri NMR degli Spirolidi



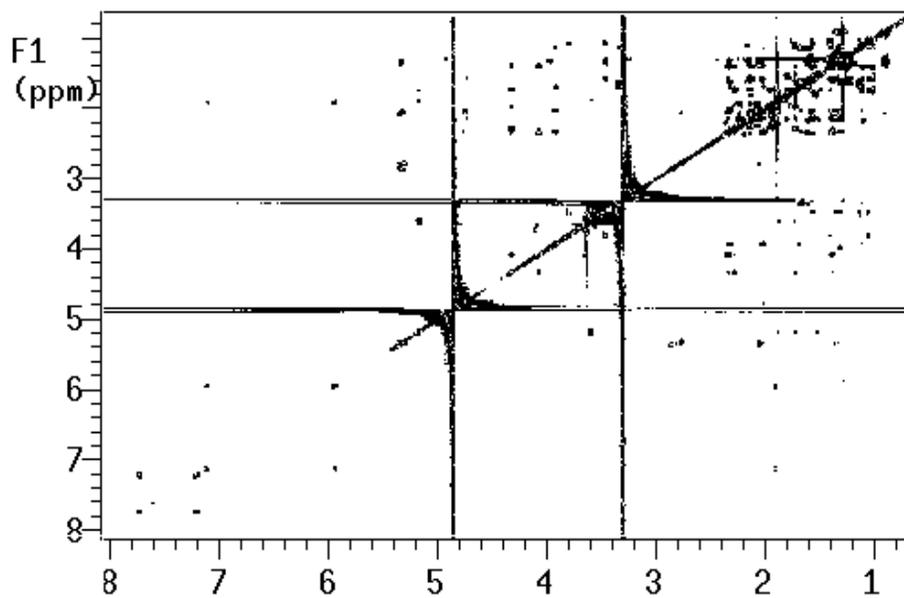
¹H-NMR 13-desmetil spirolide C (CD₃OD)



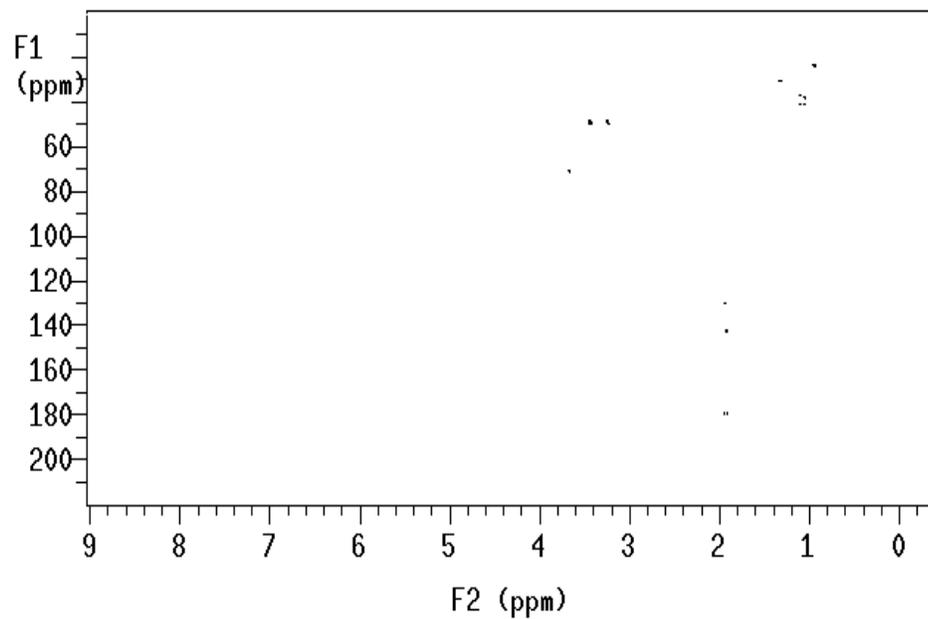
TOCSY 13-desmetil spirolide C (CD₃OD)



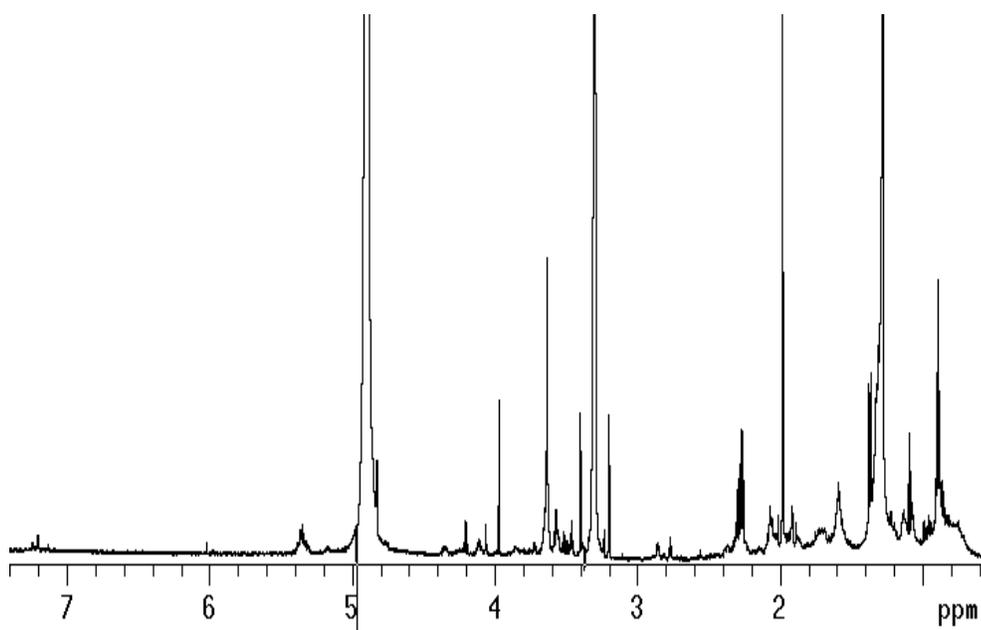
¹H-NMR 13,19-didesmetil spiroside C (CD₃OD)



TOCSY 13,19-didesmetil spiroside C (CD₃OD)



HMBC 13,19-didesmetil spiroside C(CD₃OD)



¹H-NMR 13-desmetil spiroside C (CD₃OD + 0.1% TFA)

