

Laboratorio di Preparazioni Estrattive

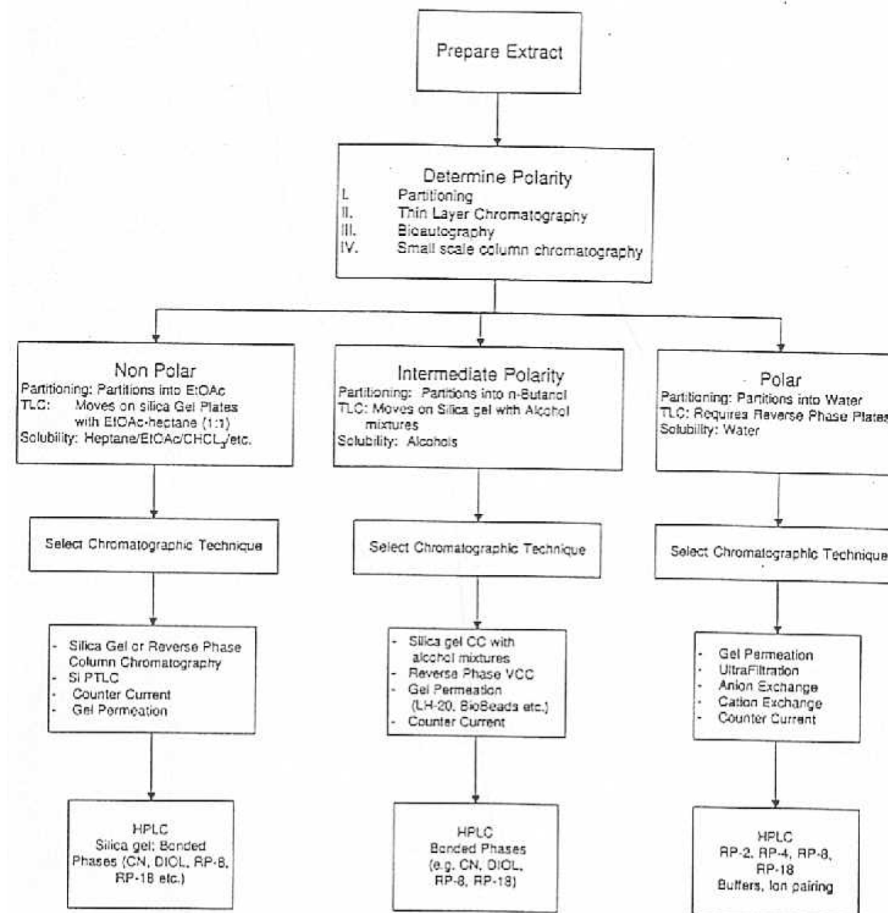
Estrattiva

Fasi Preliminari alla Estrazione da Piante (2)



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Schema generale per l'ottenimento di un composto naturale biologicamente attivo (1)



General isolation approach

Schema generale per l'ottenimento di un composto naturale biologicamente attivo (2)

Il procedimento generale include i seguenti stadi:

- Fasi preliminari (selezione, raccolta, identificazione e conservazione del campione biologico)
- estrazione iniziale
- saggi biologici sull'estratto
- determinazione della natura (polarità) del prodotto naturale
- selezione di un primo stadio cromatografico basato sulla polarità
- ulteriori cromatografie
- sviluppo di un metodo di separazione HPLC (se possibile)

Fasi preliminari

Le fasi preliminari consistono nella:

- **selezione,**
- raccolta,
- identificazione
- immagazzinamento

dell'organismo naturale da sottoporre ad estrazione.

Fasi preliminari: Selezione

Approccio casuale (random)

Approcci selettivi (anche in combinazione):

etnofarmacologici
chemotassonomici
geografici
strutturali

Selezione casuale

Alcuni gruppi, interessati a screening casuali su larga scala, raccolgono i campioni basandosi sulla massima variabilità tassonomica allo scopo di ottenere la maggiore diversità di prodotti da testare su un particolare e altamente specifico bersaglio biologico, quale un particolare enzima o recettore. Questo approccio completamente casuale (random). in genere è considerato troppo dispendioso e poco utile nella scoperta di nuovi farmaci;

Selezione etnofarmacologica

Si interessa dei metaboliti secondari presenti in piante usate da alcune popolazioni nella medicina tradizionale.

Selezione tassonomica

S'interessa solo di particolari generi o specie non sufficientemente studiate o perché è noto che organismi appartenenti a tali classi contengono una particolare tipologia di composti, anche in considerazione del fatto che i metaboliti secondari tendono ad avere una distribuzione tassonomica abbastanza ristretta.

Selezione geografica

studia le piante peculiari di particolari zone della terra.

Selezione ecologica

Ad esempio, le ascidie e le spugne con le superfici libere da incrostazioni, possono produrre sostanze che ne inibiscono la formazione. D'altra parte gli organismi che costituiscono le incrostazioni sono spesso ricchi di metaboliti secondari e si ritiene che questi vengano prodotti proprio allo scopo di facilitare la colonizzazione. Organismi che vivono in aree infestate da predatori, spesso producono sostanze tossiche o sgradevoli che agiscono da deterrente nei confronti dei predatori. Tutti questi organismi possono essere oggetto di studio.

Selezione mista

E' anche possibile utilizzare un approccio che combini aspetti diversi. Ad esempio, sulla base di notizie etnofarmacologiche, una certa specie è conosciuta possedere determinate proprietà farmacologiche; anche se questa specie è stata studiata nei suoi costituenti, non c'è stata tuttavia una correlazione tra i singoli costituenti e l'attività farmacologica. In questi casi è opportuno operare una estrazione guidata da test biologici.

Selezione computerizzata (1)

Un recente approccio alla selezione delle piante è basato sull'uso del calcolatore chiamato L.I.S.T. == Literature Information Selection Technique, che correla l'attività biologica, le informazioni botaniche e tassonomiche mediante dei database relazionali come ad esempio il NAPRALERT. Per esempio in diversi studi recenti il database NAPRALERT è stato applicato con successo. In particolare nel caso dell'estrazione di principi attivi dalla *Selaginella willdenowii* sono stati isolati tre nuovi composti biflavonoidi con una significativa attività citotossica nei confronti di alcune linee cellulari umane ad attività cancerosa.

Selezione computerizzata (2)

J. Chem. Inf. Comput. Sci. **1985**, 25, 99–103

NAPRALERT: Computer Handling of Natural Product Research Data

W. D. LOUB,* N. R. FARNSWORTH, D. D. SOEJARTO,[†] and M. L. QUINN

Program for Collaborative Research in the Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy,
University of Illinois at Chicago, Chicago, Illinois 60612

Received March 1982

Research in natural products, not unlike many other fields of investigation, requires access to large amounts of prior experimental data relevant to specific projects. The most efficient method of identifying and analyzing these data currently employs computer handling of the information. The NAPRALERT database has been designed to meet this need relevant to the development of natural products. It has also been designed, through analysis of existing literature and its contained data, to provide a means to predictively identify taxonomic sources most promising from specific biological activities.

Selezione computerizzata (3)

Table I. Secondary Literature Indexes Used in the NAPRALERT Program

title	period covered
<i>Index Catalog of the Surgeon General</i>	1880–1961
<i>Index Medicus</i>	1897–1927; 1960 to present
<i>Chemical Abstracts</i>	1907 to present
<i>Quarterly Cumulative Index Medicus</i>	1916–1956
<i>Biological Abstracts</i>	1926 to present
<i>Current List of Medical Literature</i>	1941–1959
<i>United States Armed Forces Medical Journal</i>	1950–1960
<i>National Library of Medicine Catalog</i>	1956–1965
<i>National Library of Medicine Current Catalog, Cumulative Listing</i>	1966 to present
<i>Current Contents, Life Sciences</i>	1967 to present

The NAPRALERT file has been especially designed to be of value in drug development and contains information relevant to the research efforts of natural product chemists, biochemists, pharmacognosists, agricultural chemists, and others. It covers the chemistry and biological activities of extracts and/or secondary constituents isolated from or identified in plants, marine organisms, microbes, and, to some extent, animal data as well. Chemical information regarding vertebrate animals, including enzymes, proteins, amino acids, simple sugars, nucleoproteins, and lipids, with the exception of certain reptilian toxins, is not included in the database. One important design feature of this database is the recording of information capable of predicting or rank ordering organisms as to their probability of having specific biological properties if properly investigated. This feature and other possible uses that can be made of NAPRALERT's wide variety of information on natural products are discussed in the following paragraphs.

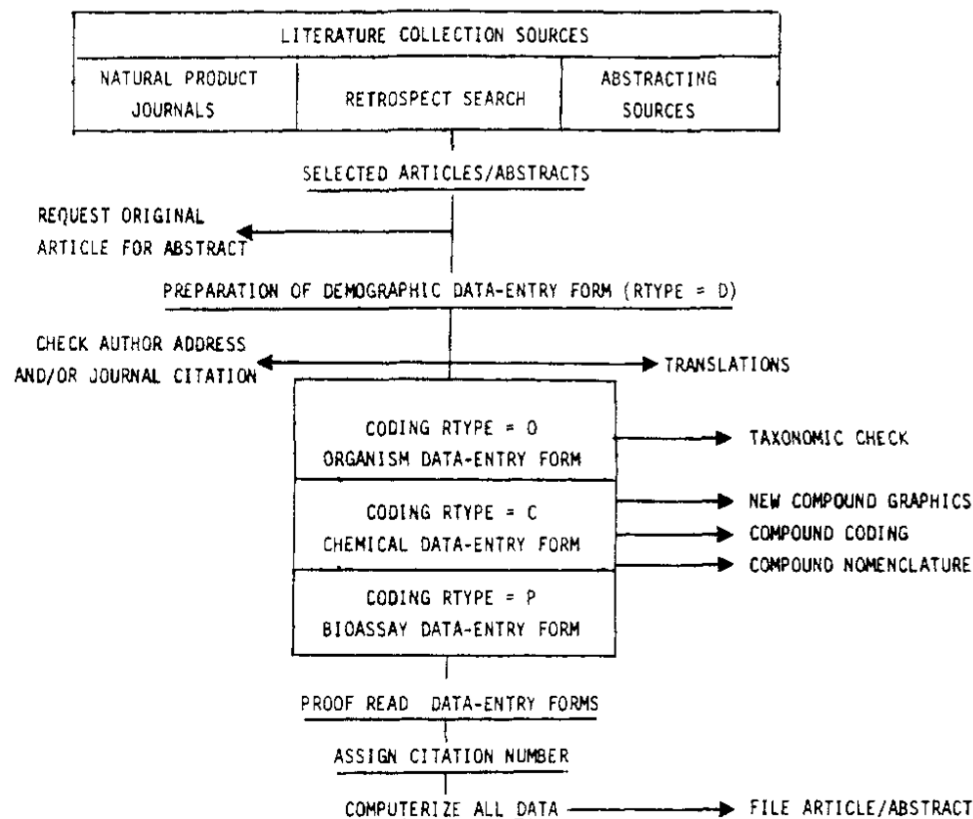


Figure 1. Diagram of NAPRALERT organization.

Selezione computerizzata (3)

The NAPRALERT file has been especially designed to be of value in drug development and contains information relevant to the research efforts of natural product chemists, biochemists, pharmacognosists, agricultural chemists, and others. It covers the chemistry and biological activities of extracts and/or secondary constituents isolated from or identified in plants, marine organisms, microbes, and, to some extent, animal data as well. Chemical information regarding vertebrate animals, including enzymes, proteins, amino acids, simple sugars, nucleoproteins, and lipids, with the exception of certain reptilian toxins, is not included in the database. One important design feature of this database is the recording of information capable of predicting or rank ordering organisms as to their probability of having specific biological properties if properly investigated. This feature and other possible uses that can be made of NAPRALERT's wide variety of information on natural products are discussed in the following paragraphs.

Selezione computerizzata (4)



Pergamon

0031-9422(95)00212-X

Phytochemistry, Vol. 40, No. 1, pp. 129-134, 1995
Copyright © 1995 Elsevier Science Ltd
Printed in Great Britain. All rights reserved
0031-9422/95 \$9.50 + 0.00

CYTOTOXIC BIFLAVONOIDS FROM *SELAGINELLA WILLDENOWII*

GLORIA L. SILVA, HEEBYUNG CHAI, MAHABIR P. GUPTA,* NORMAN R. FARNSWORTH, GEOFFREY A. CORDELL,
JOHN M. PEZZUTO, CHRISTOPHER W. W. BEECHER and A. DOUGLAS KINGHORN†

Program for Collaborative Research in the Pharmaceutical Sciences, Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy,
College of Pharmacy, University of Illinois at Chicago, Chicago, IL 60612, U.S.A.; *CIFLORPAN, Facultad de Farmacia,
Universidad de Panamá, Republic of Panama

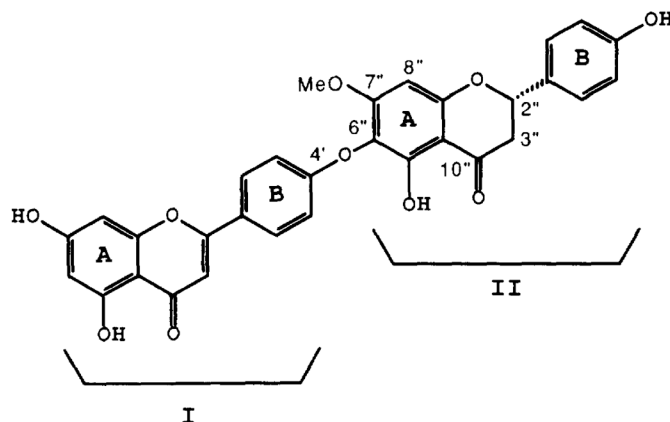
(Received 21 December 1994)

Key Word Index—*Selaginella willdenowii*; Selaginellaceae; pteridophyte; leaves; cytotoxic biflavones;
2'',3''-dihydroisocryptomerin; ¹³C NMR.

Abstract—Bioactivity-guided fractionation of the leaves of *Selaginella willdenowii* afforded three known biflavones, 4',7''-di-*O*-methylamentoflavone, isocryptomerin and 7''-*O*-methylrobustafflavone, that were significantly cytotoxic against a panel of human cancer cell lines. Non-cytotoxic isolates were also obtained, namely, amentoflavone, bilobetin, robustafflavone and 2'',3''-dihydroisocryptomerin, a new dihydrobiflavone. The structure for the new biflavonoid was unambiguously assigned by a combination of spectroscopic methods.

Selezione computerizzata (5)

As part of our ongoing project on the discovery of natural anticancer agents, *Selaginella willdenowii*, a species chosen for study by analysis of the data contained in the NAPRALERT® computer system [12, 13], was subjected to bioactivity-guided fractionation after an ethyl acetate-soluble extract was found to exhibit significant cytotoxic activity for a colon cancer cell line (Col2).



Selezione computerizzata (6)



PERGAMON

Phytochemistry 58 (2001) 865–874

PHYTOCHEMISTRY

www.elsevier.com/locate/phytochem

Ethnopharmacology and bioinformatic combination for leads discovery: application to phospholipase A₂ inhibitors

Philippe Bernard^{a,*}, Thomas Scior^b, Bruno Didier^c, Marcel Hibert^b, Jean-Yves Berthon^c

^a*GREENPHARMA S. A., 1 rue de Chartres, B.P. 6759, 45067 Orléans Cedex 2, France*

^b*Universidad de las Americas Puebla, 72820 Cholula, Puebla, Mexico*

^c*Laboratoire de Pharmacochimie de la Communication Cellulaire, UMR CNRS/ULP 7081 Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, 67400 Illkirch-Graffenstaden, France*

Received 13 November 2000; received in revised form 8 June 2001

Abstract

A program combining ethnopharmacology and bioinformatic approaches has successfully been applied on anti-inflammatory activity. (i) An ethnobotanical study allowed the identification of several plants associated with putative anti-inflammatory properties as potential leads. (ii) On the other hand, it is well known that phospholipase A₂ is a target implicated in the pro-inflammatory process. Thus, (iii) some selected plant extracts were experimentally tested on phospholipase A₂. Finally, (iv) these experimental results combined with bioinformatic tools, such as database exploitation and molecular modeling, allowed to suggest that one compound, betulin and its oxidative form betulinic acid, might be responsible of the anti-PLA₂ activity. This suggestion was confirmed experimentally. © 2001 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Ethnopharmacology; Bioinformatic; Anti-inflammatory; Phospholipase A₂

Selezione computerizzata (7)

2.2. Chemical identification of the anti-PLA₂ activity compound from the selected plant extracts

Different ethnobotanical databases, such as our database (Bernard et al., 1999a), the NAPRALERT database (available from STN International, c/o Chemical Abstracts Service, PO Box 3012, Columbus, OH 43210, USA) and the combined chemical library database (available from CRC Press UK, Pocock House, 235 Southwark Bridge Road, London, SE1 6LY, UK), were used to analyze the known chemical composition of each selected plant. The bibliographic chemical analysis

revealed a variable number of chemicals according to each plant; no chemical components are described for *Leopoldinia* whereas more than 60 chemicals are described for *Morus alba*. Interestingly, although all phytochemicals have not yet been identified, the chemical comparison of these selected plants indicates that only one compound, betulinic acid, was present in four plants among the seven: *Scoparia dulcis*, *Caraipa minor*, *Morus alba* and *Zizyphus joazeiro*. Three 'inactive' plants were also described to possess betulinic acid: *Bowdichia*, *Cassia* and *Vismia*, but in bark and not in leave or seeds. These observations suggest that betulinic acid might be responsible of the activity. Moreover, two arguments could be in agreement with this suggestion. First, triterpens have already been described as anti-inflammatory compounds (Recio et al., 1995). Betulinic acid has also been described for numerous biological activities, such as antitumor, antiviral, antimalarial, antiplasmodial activities (Combined chemical library

database). Second, as mentioned in the experimental section, this compound possesses a carboxylate group as defined by our pharmacophore model of PLA₂.

In order to verify if betulinic acid corresponded to a candidate implicated in the PLA₂ inhibition, this compound was docked into the PLA₂ crystal structure. The docking, presented in Fig. 1, confirms that betulinic acid can be inserted into the PLA₂ binding site with correct energy values. Indeed, the binding energy of betulinic acid into the enzyme binding site is about -90 kcal/mol.

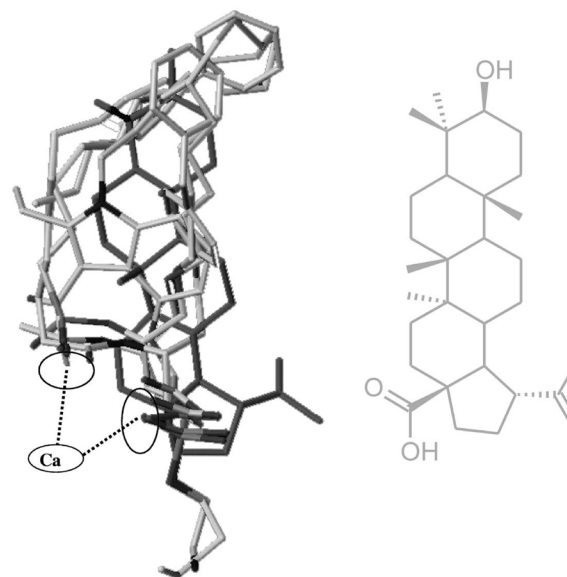
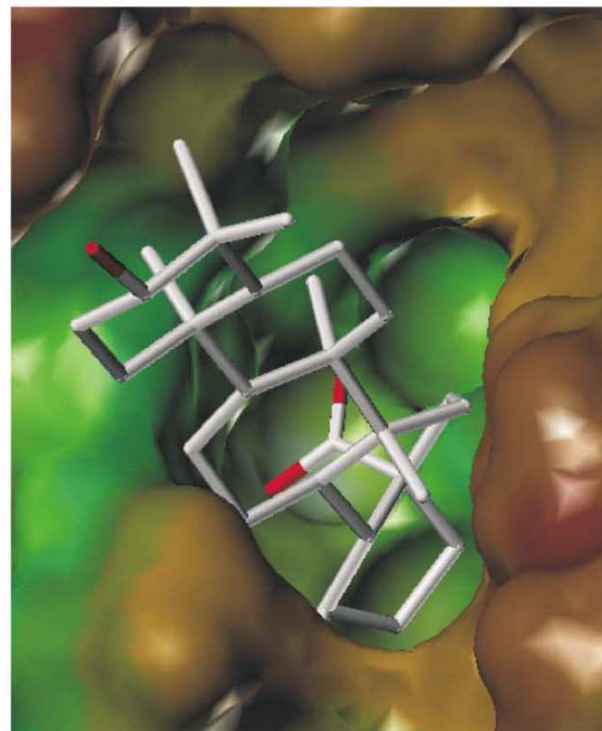
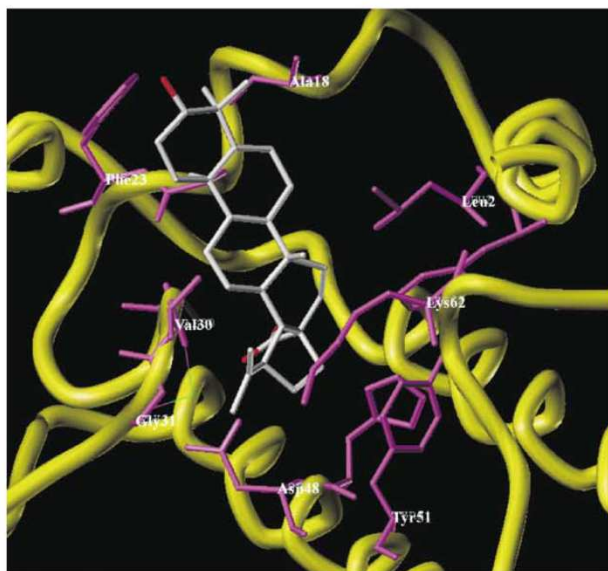


Fig. 2. Protein-based alignment of betulinic acid, in magenta, compared to the other ligands extracted from the crystallographic data. The interactions with the calcium atom are visualized.

Selezione computerizzata (8)



Fasi preliminari

- selezione,
- **raccolta**,
- identificazione
- immagazzinamento

Raccolta (1)

I campioni devono essere rappresentativi dell'intero organismo. Bisogna infatti tenere presente che i diversi organi della pianta sono conosciuti produrre e/o accumulare diversi tipi di metaboliti secondari (ad es. flavonoidi nei fiori e foglie, alcaloidi nelle radici e corteccia, oli essenziali in particolari ghiandole etc.). E' quindi opportuno, negli studi iniziali, utilizzare il materiale biologico nella sua interezza; successivamente l'estrazione riguarderà esclusivamente specifiche parti

Raccolta (2)

La raccolta deve essere accuratamente documentata; ad esempio, nel caso di piante, variazioni quali: luogo della raccolta (altitudine clima, tipo di terreno) possono influenzare non solo quantitativamente ma anche qualitativamente il contenuto di metaboliti secondari ed è quindi necessario che questi dati siano registrati; analogamente per gli organismi marini, è necessario documentare: latitudine, longitudine, profondità, correnti, moto ondoso, temperatura dell'acqua, salinità, data della raccolta.

Raccolta (3)

I campioni devono essere in buona salute, poiché eventuali infezioni ne possono modificare i metaboliti prodotti. A volte i prodotti più interessanti derivano proprio dagli organismi infestanti: la *Claviceps purpurea* (segale cornuta) ne è un esempio molto noto; anche nel caso degli organismi marini, quelli che costituiscono le incrostazioni nelle spugne o ascidie sono spesso ricchi di metaboliti secondari e si ritiene che questi vengano prodotti proprio allo scopo di facilitare la colonizzazione.



Fasi preliminari

- selezione,
- raccolta,
- **identificazione**
- immagazzinamento

Identificazione

è opportuno sottolineare che si tratta di uno stadio essenziale, in quanto un'omessa o imperfetta classificazione vanificherebbe tutto il lavoro nell'ipotesi della scoperta di un p.a. interessante per l'impossibilità di riprodurre il lavoro. Bisogna quindi descrivere accuratamente l'organismo (colore, morfologia, consistenza, presenza di muco, odore, stato riproduttivo, eventuale presenza di organismi ad esso associati, etc.), anche mediante fotografie. L'identificazione del campione deve essere fatta da un esperto tassonomista. Deve comunque essere conservato un campione per la completa identificazione (e per documentare un eventuale brevetto).

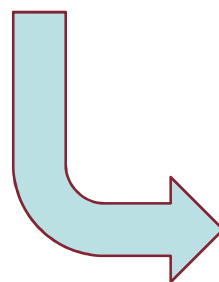
Identificazione



Identificazione



Identificazione



Achillea Ageratum

Fasi preliminari

- selezione,
- raccolta,
- identificazione
- **immagazzinamento**

Conservazione del campione biologico

Onde evitare che nel tempo vadano persi alcuni principi attivi per l'avvenire di reazioni degradative di tipo ossidativi, idrolitico, enzimatico o di polimerizzazione il campione deve essere opportunamente trattato

Essiccamento (1)

In molti casi, il materiale da estrarre viene essiccato dopo la raccolta e prima di sottoporlo ad estrazione. L'essiccamento è particolarmente importante nel caso di costituenti bioattivi labili. Può essere effettuato all'aria a temperatura ambiente o in forno a non più di 30°C; bisogna evitare l'esposizione alla luce del sole diretta, poiché i raggi UV potrebbero dar luogo a reazioni con formazione d'artefatti.

E' opportuno conservare i campioni in luoghi ventilati, per evitare infestazioni fungine o l'eventuale fermentazione del materiale.

Essiccamento (2)

Poiché alcuni costituenti possono comunque deteriorarsi dopo qualche tempo, è sempre opportuno estrarre immediatamente una piccola porzione del materiale fresco e conservare un cromatogramma dell'estratto (TLC) per un confronto futuro.

Quando si richiede, per particolari studi, materiale fresco è invece necessario procedere subito all'estrazione, onde evitare che, nel tempo, vadano persi alcuni principi attivi per volatilizzazione (ad esempio oli essenziali). Le reazioni enzimatiche possono a volte essere prevenute denaturando gli enzimi responsabili, ad esempio impregnando la pianta con metanolo od etanolo e/o controllando il pH con soluzioni tampone.

Frantumazione

La frantumazione facilita la penetrazione del solvente all'interno delle strutture cellulari, aiuta la dissoluzione dei metaboliti secondari aumentando la resa dell'estrazione. Generalmente si nota che più fine è la frantumazione, maggiore è la resa.

Per la frantumazione del campione possono essere utilizzati i più vari sistemi (dai mulini, ai frullatori, alle forbici). Se il p.a. è termolabile o volatile, deve essere evitata la molinatura, a causa della temperatura elevata che produce. Si può anche congelare l'organismo (specie se si tratta di materiale fresco) in aria liquida e quindi passare alla triturazione in mortaio, con l'eventuale aiuto di sabbia.

Estrazione iniziale: scelta del solvente (1)

In genere, i metaboliti secondari hanno carattere lipofilo con diversi gradi di polarità, più raramente sono idrofili e quindi solubili in acqua. La scelta del solvente deve essere effettuata con cura. Esso dovrebbe:

- solubilizzare il p. a.,
- essere facilmente rimovibile,
- essere inerte,
- non essere tossico,
- non essere facilmente infiammabile.

Cloroformio, cloruro di metilene e metanolo sono in genere i solventi di scelta nell'estrazione preliminare dalle piante. Prima del loro utilizzo i solventi dovrebbero inoltre essere distillati per eliminare le impurezze contenute. Ad esempio nel metanolo e nel CHCl_3 si può trovare dioctilftalato che può essere scambiato per un principio attivo.

Estrazione iniziale: scelta del solvente (2)

Il metanolo è più polare dei solventi clorurati. Si ritiene che i solventi alcolici siano in grado di penetrare efficacemente nella membrana cellulare, permettendo una migliore estrazione dei componenti endocellulari. Il cloroformio invece, a causa della sua immiscibilità con l'acqua, sembra in grado di estrarre principalmente metaboliti extracellulari. Anche miscele idroalcoliche si dimostrano molto efficaci (ad esempio etanolo al 80%). L'etere etilico è usato raramente, soprattutto a causa della sua elevata volatilità e per il pericolo d'esplosioni (perossidi). Anche l'acetone non trova un largo impiego poiché è dotato di una certa reattività, potendo formare ad esempio acetonidi da 1,2-dioli.

Estrazione iniziale: scelta del solvente (3)

Sebbene la distillazione in corrente di vapore sia utilizzata ampiamente per l'estrazione di oli volatili, (a volte si osserva una caduta del pH fino a 2 per la rottura dei vacuoli), l'acqua è usata raramente anche quando si tratta di estrarre prodotti idrosolubili. In linea con il principio secondo cui "il simile scioglie il simile", si potrebbe pensare infatti che il solvente più adatto per tale estrazione sia l'acqua. In realtà, la semplice macerazione del materiale biologico in acqua o con tamponi acquosi, spesso non è soddisfacente poiché i p.a. sono immagazzinati in forma protetta. Il meccanismo di tale protezione è vario: legame con le membrane, compartimentalizzazione, protezione con materiale lipidico e così via. Metodi per distruggere la compartimentalizzazione sono la sonicazione, congelamento-scongelamento, digestione enzimatica che possono essere usati da soli o in combinazione.

Estrazione iniziale: scelta del solvente (4)

Per tali ragioni, anche nel caso di prodotti idrosolubili, si preferiscono, se possibile, solventi organici polari come il metanolo e l'etanolo, anche se non sono i solventi migliori per sciogliere le molecole desiderate. Tra l'altro, tali solventi:

- sono più facilmente evaporabili rispetto all'acqua.
- l'uso di solventi organici previene inoltre la crescita microbiologica, uno dei problemi più seri associati con i prodotti idrosolubili.
- un altro problema associato con sistemi acquosi è l'attivazione di enzimi come le peptidasi, glicosidasi, solfatasi, ossidasi.

Un esempio ben noto è quello dei glicosidi digitalici. La deattivazione o denaturazione degli enzimi può essere effettuata mediante un riscaldamento veloce, trattamento con alcoli, anche se esso non sempre è efficace. Il metodo migliore è l'ultrafiltrazione o la gel-filtrazione.

Estrazione iniziale: scelta del solvente (5)

L'uso dell'acqua come solvente estraente pone anche un problema riguardo la desalatura: si tratta di separare i sali inorganici da quantità spesso infinitesime di principio attivo. In questo caso non è evidentemente possibile utilizzare la ripartizione tra solventi, come è usuale nel caso di prodotti liposolubili.

Estrazione iniziale: scelta del solvente (5)

Condizioni acide o basiche possono essere sfruttate per l'isolamento di particolari composti come ad esempio gli alcaloidi. Bisogna tuttavia sottolineare come condizioni acide o basiche, e più in generale condizioni drastiche (ad esempio di temperatura) possano portare ad artefatti, a causa di riarrangiamenti, epimerizzazioni, decomposizioni ed idrolisi di glicosidi.

E' possibile utilizzare nelle estrazioni più solventi a diversa polarità così da ottenere una separazione preliminare dei componenti (in genere si parte da solventi a bassa polarità e si va verso quelli ad alta polarità) [esano, CHCl_3 , EtOH, MeOH, H_2O]

Dopo l'estrazione, il solvente deve essere eliminato all'evaporatore rotante a non più di 30-40°C, onde evitare la degradazione di sostanze termo labili.

Desalatura

Se il p.a. ha una certa liposolubilità, il metodo standard di desalatura prevede l'uso di una colonna in fase inversa come la silice C18 o vari altri polimeri come la XAD-2, -4 e -7. Usualmente, la soluzione acquosa è passata attraverso la colonna ed i sali sono lavati via con acqua. Successivamente si eluisce con una miscela solvente contenente solventi organici. Tale metodo tuttavia non può essere utilizzato con composti fortemente polari o ionizzati, come amminoacidi o zuccheri.

Un altro metodo molto usato prevede l'uso di colonne ad esclusione come la Sephadex G-10 e Bio-Gel-P-2. I sali inorganici, presuntivamente più piccoli, saranno eluiti successivamente. Questo tuttavia non è sempre vero, poiché ci possono essere delle interazioni impreviste tra i composti e la fase solida, così che si può avere una inversione del previsto ordine d'eluizione.