

Isolamento di prodotti marini

Introduzione (1)

Gli oceani coprono oltre il 70% della superficie della terra ed ospitano oltre 200.000 invertebrati e specie d'alghe. Questi organismi vivono in complesse comunità ed in stretta associazione con altri organismi sia macro- (alghe, spugne, ascidie) sia micro- (batteri, funghi, actinomiceti). Alcuni composti possono essere prodotti da microrganismi associati. La chimica di un particolare campione può essere influenzata dall'habitat, così come da fattori geografici o stagionali.

TUNICATI

Vengono anche detti urocordati, perchè nello stadio embrionale è presente la "corda dorsale"

Sembrano sacchetti, eppure pare siano gli organismi più vicini a "noi" vertebrati, molto di più degli invertebrati.

In realtà non hanno uno scheletro rigido.

Sono fatti appunto a forma di sacco; possono essere solitari o coloniali, pelagici o sessili; sono ricoperti da un involucro, detto TUNICA, da cui prendono il nome, che avvolge interamente il corpo, e forma alla base radici che servono per fissarsi al fondo.

Sono presenti poi due SIFONI, due orifizi, uno per l'ingresso dell'acqua (inalante), l'altro esalante.

Una caratteristica dei tunicati è che riescono a resistere anche in caso di alto inquinamento.

Si nutrono filtrando il cibo dall'acqua che inalano.



Si trovano soltanto in mare.

Il subacqueo ricorda sicuramente la Patata di mare per il suo colore rosso vivo e i sifoni ben visibili.

Anche la Clavelina viene incontrata dai subacquei e riconosciuta perchè sembra un "ciuffo" di piccoli sacchi trasparenti.

Classi

Le classi di tunicati sono ASCIDIACEI (le ascidie), TALIACEI (animali pelagici che fanno parte del macroplankton, ad esempio la salpa e altri organismi bioluminescenti), APPENDICOLARIE o LARVACEI (poco conosciuti e interessanti per i sub)



Introduzione (2)

A causa della diversità degli organismi marini e dell'habitat, i prodotti naturali da essi derivati comprendono una vasta gamma di classi chimiche come terpeni, acetogenine, peptidi, alcaloidi. Solo negli ultimi dieci anni, sono stati isolati e caratterizzati oltre 5.000 prodotti marini.

In molti casi, la classe del composto presente nell'organismo può essere dedotta sulla base della classificazione tassonomica, anche se ciò non sempre consente di definire un semplice metodo di purificazione. (schema 1). In questo caso, la conoscenza della tassonomia è stata d'aiuto nell'assegnazione della struttura, ma non nel definire il metodo di purificazione.

Approccio generale (1)

Il procedimento generale include i seguenti stadi:

1. raccolta ed identificazione dell'organismo marino
2. estrazione iniziale
3. saggi biologici sull'estratto
4. ripartizione per confermare ed aumentare la bioattività
5. determinazione della polarità del prodotto naturale
6. selezione di un primo stadio cromatografico basato sulla polarità
7. ulteriori cromatografie
8. sviluppo di un metodo di separazione HPLC, se possibile
9. scale-up della procedura.

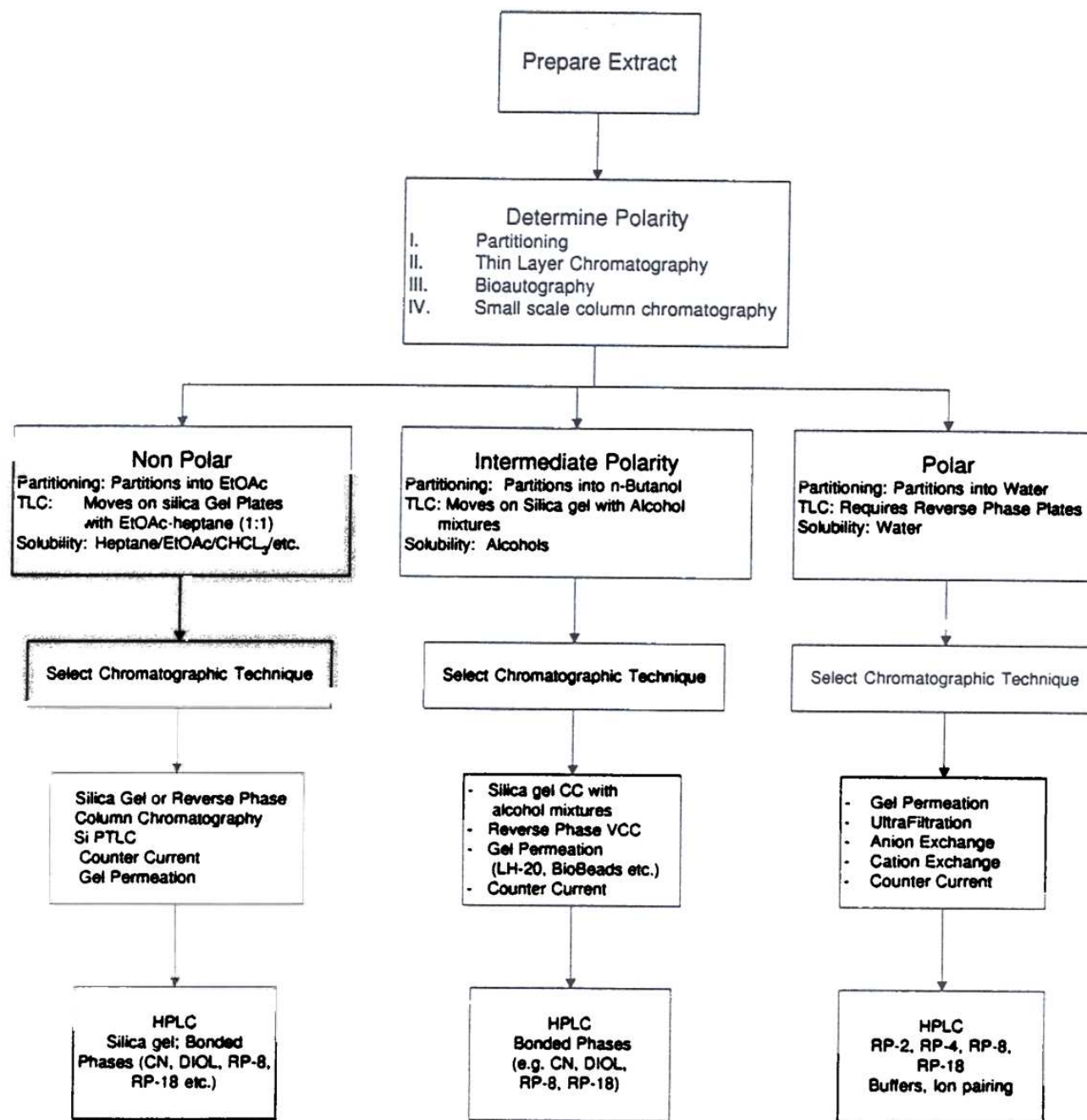
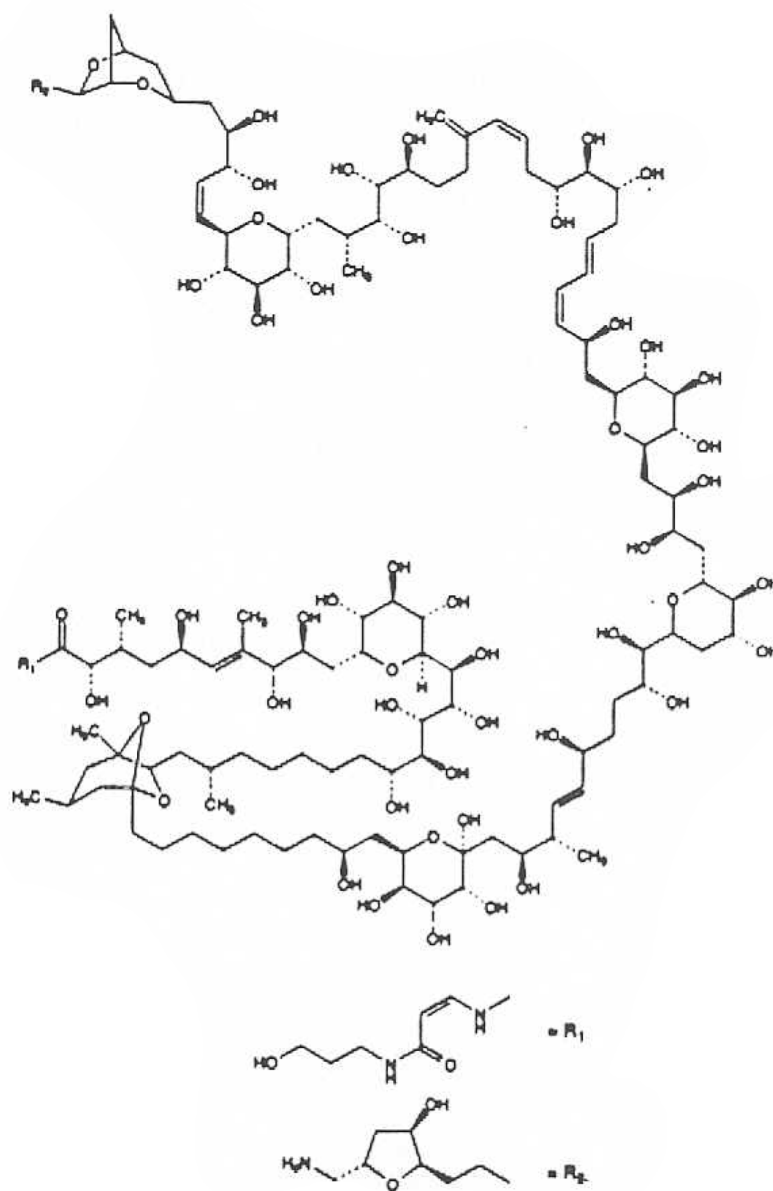


Fig. . General isolation approach used at HBOI.

Precauzioni nella manipolazione di organismi marini (1)

Dagli organismi marini sono stati estratti migliaia di composti naturali. Alcuni di essi hanno mostrato una eccezionale tossicità nei confronti dei mammiferi. La **Palitoxina**, originariamente isolata dalla *Palythoa toxica*, è uno dei composti non proteici più tossici in assoluto; le zone di mare in cui cresce questo organismo sono ritenute, da leggende locali, avvelenate e gli studiosi che lavorano con questo organismo manifestano una sindrome di tipo influenzale.

Precauzioni nella manipolazione di organismi marini (2)



Precauzioni nella manipolazione di organismi marini (3)

Altri composti, come la **micalamide** e la **aplisiatossina** sono dei forti irritanti. L'aplisiatossina è inoltre un potente carcinogeno.

Altri campioni biologici possono causare pruriti e *rash* cutanei

In generale, quando si lavora con un nuovo organismo, bisogna sempre tenere a mente che c'è la possibilità di maneggiare composti dalle caratteristiche tossicologiche ignote, e quindi è necessario usare la massima prudenza.

E' bene indossare mezzi di protezione quali abiti appropriati, guanti, occhiali protettivi (per l'eventuale improvvisa espulsione di acqua marina dall'organismo), lavorare sotto cappa e ripulire immediatamente qualsiasi fuoriuscita di materiale biologico

Conservazione ed immagazzinamento di campioni marini

Le ascidie ed altri organismi mollicci sono più difficili da conservare. Essi vengono conservati in formalina al 10% (3.7% di formalina in acqua), mentre altri invertebrati vengono conservati in alcool al 70%. Molti gruppi congelano immediatamente il campione a -20°C, altri lo immergono in metanolo, etanolo o isopropanolo e lo conservano a temperatura ambiente o in congelatore. Le alghe possono essere seccate all'aria e quindi conservate a temperatura ambiente o in congelatore. Se ci sono le attrezzature, è opportuno liofilizzare il campione subito dopo la raccolta.

Raccolta degli organismi marini (1)

Esistono diverse filosofie che guidano la raccolta del materiale biologico.

1. 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.
2. Altri lavorano su uno specifico gruppo **tassonomico**, noto per essere particolarmente ricco di composti naturali.
3. Altri basano la loro scelta su ragioni **ecologiche**. 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.

Raccolta degli organismi marini (2)

La raccolta degli organismi deve essere accuratamente documentata: si devono registrare: latitudine, longitudine, profondità, correnti, moto ondoso, temperatura dell'acqua, salinità, data della raccolta. Inoltre deve essere descritto l'habitat in cui si trova il campione raccolto, ed eventualmente il suo comportamento con l'ambiente circostante.

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 e filmati.

Deve comunque essere conservato un campione per la completa identificazione (e per documentare un eventuale brevetto).

I campioni devono essere rappresentativi dell'intero organismo.

Le ascidie ed altri organismi mollicci sono più difficili da conservare. Essi vengono conservati in formalina al 10% (3.7% di formalina in acqua), mentre altri invertebrati vengono conservati in alcool al 70%.

Conservazione degli organismi marini

Poiché la raccolta dei campioni avviene in luoghi, lontani dal laboratorio, privi di grandi attrezzature, bisogna evitare che gli organismi, molti dei quali muoiono rapidamente quando esposti all'aria, perdano parte dei loro principi attivi attraverso reazioni degradative di tipo ossidativo, enzimatico o reazioni di polimerizzazione. E' quindi necessario procedere immediatamente al congelamento o essiccamento del campione, quando non alla immediata estrazione.

Molti gruppi congelano immediatamente il campione a -20°C , a ltri lo immergono in metanolo, etanolo o isopropanolo e lo conservano a temperatura ambiente o in congelatore. Le alghe possono essere seccate all'aria e quindi conservate a temperatura ambiente o in congelatore. Se ci sono le attrezzature, è opportuno liofilizzare il campione subito dopo la raccolta.