

Relazione scientifica finale di Raffaella Paperi
(Short Term Mobility, periodo 4-26 febbraio 2006)

Diverse migliaia di molecole bioattive naturali, per lo più prodotte da funghi e attinomiceti, sono state da tempo isolate e saggiate per le proprietà antimicrobiche, antitumorali e antivirali. Solo all'inizio degli anni ottanta i cianobatteri, batteri gram negativi fotoautotrofi ossigenici, sono stati identificati come microrganismi tra i più promettenti produttori di molecole ad attività biologica. La pressione dovuta alla competizione con gli altri organismi, infatti, induce alcuni cianobatteri alla sintesi di metaboliti secondari (idrofili o lipofili) estremamente attivi. Tra questi sono stati identificati inibitori enzimatici capaci di inattivare specifici enzimi di organismi eucarioti così come di ostacolare la proliferazione cellulare con la distruzione del citoscheletro (Microcistine, Nodularine ecc.). A tutt'oggi sono state evidenziate, in alcuni ceppi cianobatterici, attività antineoplastica, antivirale ed antifungina e sono stati isolati e caratterizzati chimicamente inibitori molto potenti quali la curacina A, le criptoficine, le cianobatterine ecc. Questi composti possono trovare importanti applicazioni in campo medico e farmacologico.

La possibilità di testare la bioattività di ceppi cianobatterici isolati da regioni remote, come l'Antartide, potrebbe costituire una novità nel campo della ricerca di nuovi principi attivi. L'Antartide, con il suo habitat incontaminato, è un luogo in cui sopravvivono, isolati dal resto del pianeta, microrganismi in grado, da sempre, di sopportare condizioni ambientali estreme, ed è pertanto da considerarsi una potenziale fonte di nuove specie cianobatteriche e di nuovi metaboliti ad esse associati.

Presso i laboratori dell'ISE-CNR di Firenze sono conservati più di 50 ceppi di cianobatteri, isolati da ambiente antartico, sui quali sono in corso, da tempo, studi di bioattività.

L'obiettivo della ricerca presso lo Scripps Institution of Oceanography, sotto la supervisione del Prof. Gerwick, ha riguardato la valutazione dell'attività citotossica di estratti grezzi in metanolo 100% di 22 ceppi di cianobatteri provenienti da ambiente antartico e di 2 ceppi provenienti da zone temperate e tropicali. Gli estratti in diclorometano/metanolo (2:1) di alcuni dei ceppi sopra indicati, dimostratisi più promettenti degli altri a seguito delle prove di inibizione dell'attività enzimatica, svolte precedentemente in altra sede, sono stati frazionati ed è stata valutata l'attività citotossica delle frazioni. In alcuni casi è stata valutata anche l'attività antibiotica ed antifungina. La frazione attiva degli estratti è stata caratterizzata con LCMS, GCMS ed NMR per la determinazione della struttura chimica della molecola bioattiva.

Gli estratti in diclorometano/metanolo (2:1) dei quattro ceppi di cianobatteri antartici e di *Nostochopsis lobata*, scelti a seguito delle prove di inibizione dell'attività enzimatica, svolte precedentemente al periodo in oggetto, sono stati sottoposti a frazionamento, mediante

cromatografia liquida, in colonne impaccate con gel di silice. La fase mobile del sistema era rappresentata da una miscela di esano ed etilacetato le cui percentuali venivano variate in funzione di un aumento della polarità. Si è partiti dal 100% di esano per arrivare, nella settima frazione, al 100% di etilacetato. Le ultime due frazioni sono state separate utilizzando, nel caso della ottava frazione, una miscela di etilacetato/metanolo (3:1) e per l'ultima frazione metanolo al 100%.

Nel caso di *Nostochopsis* l'estrazione in diclorometano/metanolo (2:1) era stata fatta precedere da una estrazione in metanolo 60%. Tale estratto grezzo, infatti, aveva dato ottimi risultati, in precedenza, nelle prove di inibizione dell'attività enzimatica. Anche questo estratto è stato sottoposto ad un parziale frazionamento in metanolo 50% (fraz. 1) e metanolo 100% (fraz. 2).

Gli estratti in metanolo 100% dei 24 ceppi di cianobatteri e in diclorometano/metanolo dei cianobatteri in esame sono stati sottoposti al test di citotossicità con cellule Neuro 2a. Con tale test viene valutata la capacità delle cellule di metabolizzare l'MTT (tiazolo blu di tetrazolio bromide) come indice del numero di cellule vitali. A ciascun estratto, posto all'interno di micro pozzetti a due diverse concentrazioni (100 e 10 µg di estratto/ml), è stata aggiunta la sospensione cellulare e la miscela così costituita è stata incubata a 37°C per 48 ore al termine delle quali è stato aggiunto il dimetil solfossido (DMSO) ad ogni pozzetto. Alla lettura in assorbanza a 570 nm, effettuata dopo 25 min. dall'aggiunta del DMSO, è stata sottratta la lettura alla lunghezza d'onda di 630 nm. La citotossicità degli estratti, saggiati in triplo rispetto al controllo, è stata determinata comparando la media delle loro letture con la media delle letture del controllo.

Sono stati, in seguito, effettuati alcuni test per valutare l'attività antifungina e antibiotica degli estratti grezzi e delle frazioni del solo ceppo di *Nostochopsis lobata*. Per i biosaggi sull'attività antifungina sono stati utilizzati 2 ceppi di *Candida albicans* (il wild type e il ceppo resistente all'anfotericina B) alle cui sospensioni cellulari è stato aggiunto il colorante Alamar blu 100x un indicatore di ossido-riduzione che permette di misurare la proliferazione delle cellule.

A ciascuna sospensione cellulare, all'interno di micro pozzetti, sono stati aggiunti gli estratti a diluizione crescente, testati in doppio, e la miscela è stata incubata a 37°C per 12-15 ore. Per il controllo positivo è stata aggiunta l'anfotericina B, mentre per quello negativo è stato usato il DMSO per entrambi i ceppi di *C. albicans*. Il cambio di colore che consente la concentrazione minima inibente (MIC) è stato stimato a vista.

Riguardo all'attività antibiotica sono stati usati lo *Stafilococcus aureus*, resistente alla meticillina e l'*Enterococcus faecium* resistente alla vancomicina. Le colture di entrambi i batteri, diluite alla DO di 0.04-0.06 ed ulteriormente diluite 10 volte sono state aggiunte ai micropozzetti insieme al campione da analizzare, a due diverse concentrazioni, e la miscela è stata incubata a 37°C per 16-18 ore. Per il controllo positivo è stata aggiunta la vancomicina (1 mg/ml) e la penicillina G (1 mg/ml),

mentre per quello negativo è stato usato il DMSO. La densità ottica veniva misurata a 600 nm con un microplate reader. La MIC per la vancomicina è 0.195-0.391 µg/ml, mentre per la penicillina G è 6.25-12.25 µg/ml.

Gli estratti grezzi sottoposti a frazionamento sono stati anche caratterizzati mediante cromatografia su strato sottile (TLC) e le miscele di solventi utilizzate nella fase mobile sono state: nella prima fase etilacetato (90%) e metanolo e nella seconda fase etilacetato (80%), metanolo (15%) ed ammonio idrossido concentrato (5%). Sulle frazioni risultate attive sono state condotte indagini utilizzando la cromatografia liquida e gassosa e spettrometria di massa (LCMS, GCMS) e Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) ad alto campo.

Gli estratti in metanolo 100% di tutti i 24 ceppi saggiati non hanno mostrato alcuna attività citotossica (saggio MTT), mentre tra tutti gli estratti in diclorometano/metanolo (2:1), solo la frazione B dell'estratto di *N. lobata* alla concentrazione di 100 µg di estratto/ml presentava un'attività citotossica pari al 75% (25% di cellule vitali). L'indagine con NMR di tale frazione ha evidenziato la presenza di sole sostanze lipidiche ed è stata confermata dall'analisi con GCMS nella quale si è riscontrata, in più di un esempio, la presenza di differenze m/z (massa/carica) tipiche delle catene degli alcani, normalmente riscontrabili nei lipidi.

Per quanto concerne l'analisi LCMS dell'estratto grezzo in metanolo 60% di *N. lobata*, il cromatogramma ha evidenziato la presenza di 4 picchi principali uno dei quali presentava una massa che poteva coincidere con quella di una neurotossina (la sassitossina) già presente in altri generi di cianobatteri. La successiva analisi all'HPLC delle due frazioni dell'estratto, con colonna preparativa, ha evidenziato la presenza, nella prima frazione, di un solo picco, mentre nella seconda frazione di una serie di picchi (6 o 7) piuttosto difficili da separare, in condizioni isocratiche, con una miscela eluente metanolo/acqua che variava tra il 95% ed il 75% di metanolo.

Per quanto riguarda tale separazione è auspicabile, in un prossimo futuro, l'impiego di frazioni più pure dell'estratto e l'utilizzo di colonne dal diametro inferiore che consentano di poter effettuare un gradiente di concentrazione dell'eluente.

Infine, i risultati dei saggi di attività antifungina ed antibiotica sugli estratti grezzi e loro frazioni del ceppo di *N. lobata*, svolti gli ultimi giorni del soggiorno, hanno evidenziato una debole attività della frazione 2 dell'estratto MeOH 60% di *N. lobata*, pari ad una concentrazione minima inibente, MIC, di 31,3 µg ml⁻¹ per entrambi i saggi. E' da notare, però, che la frazione 2 si può considerare solo parzialmente purificata e che probabilmente un'ulteriore purificazione potrebbe influenzare in senso positivo l'attività della molecola isolata. La conferma di questo viene dal risultato ottenuto con l'estratto grezzo che ha mostrato una MIC pari a circa 250 µg ml⁻¹, valore otto volte maggiore rispetto a quello ottenuto con la frazione 2. Un'attività interessante, pari a 3,9 e 7,8 µg ml⁻¹ con *S.*

aureus e *E. faecium*, rispettivamente e a $15,6 \mu\text{g ml}^{-1}$ con *C. albicans*, è stata invece notata per la frazione H dell'estratto in diclorometano/metanolo 2:1 di *N. lobata*. In questo caso lo stesso estratto grezzo non aveva dato alcuna attività in nessuno dei saggi fin qui descritti.

L'esperienza maturata presso i laboratori dello Scripps institution of Oceanography, sebbene di breve durata, è stata senz'altro positiva e mi ha permesso di sviluppare un approccio scientifico alla materia in oggetto diverso da quello da me sin qui adottato. Durante tale soggiorno, infatti, ho avuto l'opportunità di lavorare con strumenti scientifici mai utilizzati finora, grazie anche alla preziosa collaborazione con i membri del gruppo del Prof. Gerwick.

In particolare, le preziose indicazioni ricevute dallo stesso Prof. Gerwick mi saranno utili per proseguire, sulla stessa linea, gli studi sui ceppi già analizzati e sugli altri ceppi ancora da analizzare.

Il Prof. William Gerwick ha espresso il suo interesse nel prolungare questa collaborazione e si è impegnato a ricambiare la visita in un prossimo futuro per comparare i risultati sulle colture e sulla chimica dei cianobatteri presi in esame.