

Studi preliminari sulla biosintesi delle skitantine (**)

Riassunto: Le skitantine, un nuovo gruppo di alcaloidi isolati dallo *Skytanthus acutus*, un Apocynacea cilena, presentano un particolare interesse per la loro struttura ciclopentano-piperidinica.

Questo risulta il primo esempio di tale struttura ritrovata nelle Apocynaceae, dove fino ad oggi sono stati riscontrati solo alcaloidi indolici o steroidali.

I precursori delle skitantine potrebbero essere l'acido mevalonico, se si suppone che siano monoterpene basici, oppure la fenilalanina, secondo la teoria di WOODWARD o, secondo la teoria di WENKERT e BRINGI, l'acido prefenico.

Date le strette relazioni di strutture tra le skitantine e l'ipotetico precursore a C₁₂ di WOODWARD della parte non triptaminica degli alcaloidi indolici, era interessante poter stabilire se i precursori delle skitantine costituissero anche gli intermedi della biosintesi degli alcaloidi indolici.

Per stabilire la biogenesi delle skitantine è stata studiata l'incorporazione nelle piante di *Skytanthus* di acido mevalonico, fenilalanina e acetato marcati con ¹⁴C.

L'incorporazione dell'acido mevalonico è 80 volte più grande di quella della fenilalanina e dell'acetato e pertanto si può supporre che la via biogenetica più probabile per le skitantine sia quella terpenica.

Résumé: Les skytanthines, un nouveau groupe d'alcaloïdes isolés du *Skytanthus acutus*, une Apocynacée du Chili, présentent un intérêt particulier dû à leur structure cyclopentano-piperidinique.

C'est, en effet, le premier exemple d'une telle structure retrouvée dans les Apocynacées, où l'on avait rencontré jusqu'à présent seulement des alcaloïdes indoliques ou stéroïdiques.

Les précurseurs des skytanthines pourraient être soit l'acide mévalonique, si on suppose qu'il s'agit de monoterpènes basiques, soit la phénylalanine, selon la théorie de WOODWARD, soit encore, selon la théorie de WENKERT et BRINGI, l'acide préphénique.

Étant donné l'étroite relation de structure entre les skytanthines et le précurseur hypothétique à C₁₂ de WOODWARD, de la partie non triptaminique des alcaloïdes indoliques, il était intéressant d'établir si les précurseurs des skytanthines constituaient également les intermédiaires de la biosynthèse des alcaloïdes indoliques.

Pour établir la biogénèse des skytanthines, les auteurs ont étudié l'incorporation dans les plantes de *Skytanthus* de l'acide mévalonique, de la phénylalanine et de l'acétate marqués par ¹⁴C.

L'incorporation de l'acide mévalonique est 80 fois plus grande que celle de la phénylalanine et de l'acétate et, en effet, on suppose que la voie biogénétique la plus probable pour les skytanthines soit la voie terpénique.

Summary: Isolation from *Skytanthus acutus*, a Chilean Apocynaceae, of a group of alkaloids called skytanthines is of some interest because of their cyclopentanopiperidine structure.

(*) Accademico.

(**) Comunicazione presentata in parte al XIX Congresso di Chimica Pura ed Applicata, Londra 10-17 luglio 1963.

This is the first example of such structure encountered in Apocynaceae, where only indole or steroidal alkaloids have been found so far. If skytanthines are considered to be basic monoterpenes, their precursor must be mevalonic acid, otherwise their biogenesis could be supposed to proceed through phenylalanine (according to the hypothesis of WOODWARD) or prephenic acid (according to the hypothesis of WENKERT and BRUNO). Because of the close structural relationship between skytanthines and the hypothetical C_{10} precursor of the non-tryptaminic moiety of the indole alkaloids, postulated by WOODWARD, it was of interest to establish whether skytanthines precursors also constitute the intermediates of the biosynthesis of indole alkaloids. To establish the biogenetic pathway of skytanthines the incorporation of labelled mevalonate, phenylalanine, and acetate was studied in *Skytanthus* plants. Incorporation of mevalonic acid is 80 times greater than of phenylalanine and acetate. Therefore it can be argued that the most probable path of skytanthine biogenesis is via the terpene route.

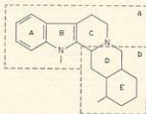
L'isolamento da un'Apocynacea cilena, lo *Skytanthus acutus* Meyen, di un gruppo di alcaloidi, le skitantine (¹⁻¹²), ha aperto interessanti prospettive nell'ambito della biogenesi degli alcaloidi. Le skitantine sono infatti dei composti diastereoisomeri il cui scheletro, a dieci atomi di carbonio, contiene il sistema della ciclo-pentano-piperidina, e si possono rappresentare con la formula I:



Da un punto di vista speculativo, la presenza, in un'Apocynacea, di alcaloidi a struttura così differente da quelle che di norma si trovano, e cioè indoliche o steroideiche (¹³), pone l'interrogativo circa il meccanismo della loro formazione in natura.

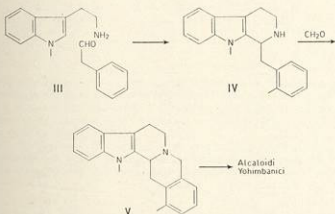
A prima vista il sistema presente nelle skitantine appare completamente differente da quello degli alcaloidi indolici, largamente rappresentati, come si è già detto, nelle Apocynacee.

Tuttavia se si considera lo scheletro di questi ultimi si osserva che è costituito da due parti fondamentali; nel caso degli alcaloidi del gruppo dello Yoimbano (formula II) le due parti sono indicate con a e b.



La parte *a* è chiaramente riferibile allo scheletro della triptammina, dato che è stato preso in considerazione già nei primi schemi biogenetici riguardanti questi alcaloidi (14,15) e confermato successivamente dai recenti risultati sperimentali di E. LEETE (16,17) con l'impiego di precursori marcati.

SCHEMA I.



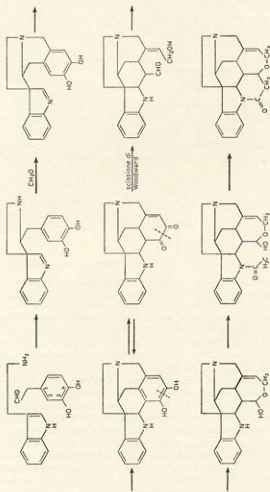
Per quanto riguarda la parte *b* (porzione non triptamminica), gli schemi surriferiti postulavano un'origine da sostanze biogeneticamente riferibili alla fenilalanina, che per condensazione con la triptammina (III) ed opportune successive trasformazioni (IV) ed intervento di un ipotetico frammento ad un atomo di carbonio (aldeide formica o il suo equivalente biogenetico) renderebbe ragione della formazione degli anelli C, D ed E (v).

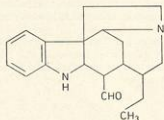
Tale ipotesi è stata successivamente modificata soprattutto per spiegare la presenza in natura di altri alcaloidi indolici, quali ad esempio quelli del gruppo della stricnina. R. B. WOODWARD (18) suggerì che la triptammina si condensasse, in beta al nucleo indolico, con un precursore avente il sistema della 3-4-diossi-fenilalanina: la scissione tra gli atomi di carbonio 3 e 4 di tale precursore, ed una successiva condensazione con un sistema a due atomi di carbonio (forse un gruppo N-acetile) renderebbero ragione della origine dei derivati stricnici (vedi schema II).

Tale schema ha avuto una indiretta conferma sperimentale dalla sintesi di E. E. van TAMELEN e collaboratori (19) del prodotto (VI) la cui parentela con gli alcaloidi delle Strychnos è evidente (*).

(*) Cfr. J. B. HENDRICKSON e R. A. SILVA, J. Am. Chem. Soc., 84, 643 (1962).

SCHEMA II.



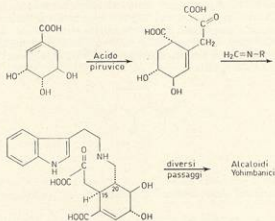


VI

Pur nella loro razionalità gli schemi riportati lasciano oscuri taluni punti, quali ad esempio la origine del carbonio del gruppo carbossilico negli alcaloidi dello Yoimbano e la natura prevalentemente idroaromatica della parte non triptamminica, associata ad una costante configurazione al carbonio corrispondente al C₁₃ nel sistema dello Yoimbano.

Per tale ragione E. WENKERT e N. V. BILINGI (24) proposero uno schema di biosintesi che non utilizza la fenilalanina, ma i suoi immediati precursori biogenetici, l'acido scichimico e l'acido pterfenico, secondo lo Schema III.

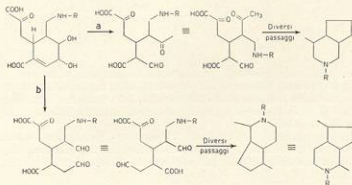
SCHEMA III.



Questo schema spiega la costanza della configurazione del centro di asimmetria in C_{10} in quanto la migrazione della catena laterale piruvica avverrebbe mantenendo la configurazione.

Se si suppone che il sistema delle skitantine derivi dallo stesso precursore della parte non triptamminica degli alcaloidi indolici, in base alle ipotesi sopra discusse, la loro biosintesi potrebbe essere rappresentata dallo Schema IV.

SCHEMA IV.



Questo schema permetterebbe di prevedere, almeno teoricamente, la formazione di isomeri strutturali delle skitantine, che si formerebbero secondo la via *b*: tuttavia, isomeri di tale tipo non sono finora stati riscontrati nello *Skytanthus*.

A parte la verosimiglianza di una biogenesi comune alle skitantine ed agli alcaloidi generalmente riscontrabili nelle Apocynacee, esiste sempre la possibilità che le skitantine siano dei terpeni basici, derivanti dalla concatenazione, testa a coda, di due unità a C_5 in armonia alla regola isoprenica di L. Ruzicka (21) come risulta evidente dalla formula:

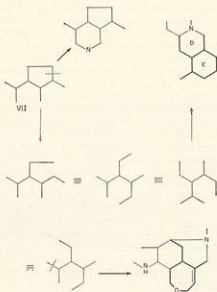


In tal caso il precursore delle skitantine dovrebbe essere l'acido mevalonico, ben noto precursore delle strutture terpeniche, ed in particolare dei monoterpene (22).

In definitiva si verrebbe ad ammettere per le skitantine una particolare biogenesi, differente da quella di tutti gli alcaloidi isolabili dalle Apocynacee.

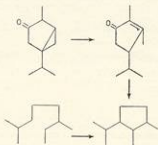
Recentemente R. THOMAS (23) ha proposto una ingegnosa teoria che unificherebbe le ipotesi biogenetiche per tutti gli alcaloidi indolici e per le skitantine. Secondo questo Autore il frammento (VII) costituirebbe il precursore delle skitantine come pure di buona parte degli alcaloidi indolici (Schema v):

SCHEMA V.



tale frammento potrebbe a sua volta derivare da un monoterpene ciclopentanico facente parte di strutture cicliche già note, oppure direttamente da un monoterpene aciclico, dotato di opportuni gruppi funzionali, per semplice ciclizzazione:

SCHEMA VI.



Analogamente si può spiegare la formazione di numerose sostanze ossigenate quali, ad esempio, la genipina, l'aucubina e la genzianina, nelle quali si ritrova lo scheletro delle skitantine.

Ispirate a quest'ultima ipotesi sono le sintesi degli irridolattoni^(24,25) e quella del fotocitrale⁽²⁶⁾.

I dati sperimentali per avvalorare una o l'altra delle ipotesi sopra riportate sono scarsi e non sempre concordanti: E. LEETE⁽²⁷⁾ ha dimostrato che l'acido malonico viene incorporato nell'ajmalina, ma questo fatto non è stato confermato da successive esperienze di altri Autori^(28,29).

Dato l'interesse di chiarire questi aspetti della biogenesi e della facilità con cui lo *Skytanthus acutus* sintetizza gli alcaloidi, abbiamo effettuato una serie di ricerche con l'impiego di precursori marcati.

A tale scopo è stata studiata l'incorporazione di acido mevalonico, fenilalanina e acido acetico, marcati con ¹⁴C nelle piante di *Skytanthus acutus* Meyen.

I risultati preliminari ottenuti sembrano poter essere interpretati in favore dell'ipotesi terpenica, in quanto, contro una scarsa incorporazione di acetato e di fenilalanina, si ha una relativamente buona incorporazione di acido mevalonico.

Questa risulta, tuttavia, in senso assoluto piuttosto bassa e ciò potrebbe solo fare supporre che il meccanismo che porta dall'acido mevalonico alla skitantina sia piuttosto complesso come, per esempio, E. J. HERBERT e G. W. KIRBY hanno dimostrato per la delfelina⁽³²⁾ (*).

Seppure questi risultati richiedano ulteriori conferme sperimentali, sono di un certo interesse anche alla luce del recente ritrovamento del sistema della Skitantina in altre piante: la presenza nelle Bignonacee di alcaloidi come la tecomanina, la tecomina, le tecostanina e la tecostidina⁽³³⁻³⁶⁾ dimostra come il sistema delle skitantine sia più diffuso in natura di quanto si potesse supporre, e che esso possa rappresentare, nel quadro più generale della biogenesi degli alcaloidi, un termine abbastanza importante.

PARTE SPERIMENTALE

Il materiale vegetale sul quale è stata provata l'incorporazione, è stato ottenuto per germinazione di semi di *Skytanthus acutus* su vermiculite imbevuta della seguente soluzione nutritiva:

Nitrato di calcio	0,6 mg
Solfato di magnesio	0,9 mg
Fosfato bipotassico	0,9 mg
Cloruro di sodio	7,5 mg
Acqua	100 ml (pH 8 per NaOH)

(*) BAYTERBY⁽³²⁾ e BARTON⁽³³⁾ hanno dimostrato che nella berberina l'atomo di carbonio in 8 viene fornito dall'N-metile previa ossidazione ad immina e ciò farebbe pensare per analogia alla possibilità di un identico meccanismo anche nella serie degli alcaloidi indolici.

in vasi per germinazione. La temperatura della serra era di 33° C. La composizione della soluzione nutritiva rispecchiava in prima approssimazione la composizione in sali del suolo dove lo *Skytanthus acutus* cresce spontaneamente. Dette esperienze di incorporazione sono state rese difficoltose per la bassa germinabilità dei semi di *Skytanthus* e per la loro lenta velocità di crescita e per il loro lento metabolismo.

Piantine di quattro mesi, aventi un'altezza media di 8-9 cm. (Fig. 1), venivano utilizzate per l'assorbimento di composti radioattivi da studiare secondo la seguente metodica:

Le piantine erano prelevate, lavate accuratamente con acqua e poste in piccoli vasetti, in gruppi di 15-20 piantine del peso sensibilmente uguale, contenenti la stessa soluzione nutritiva alla quale era stato aggiunto il composto marcato.



Fig. 1. — Piantina di *Skytanthus acutus* di 4 mesi.

Il vasetto di terracotta porosa era parzialmente immerso in un beker contenente acqua distillata che manteneva umida la vermiculite contenuta nel vasetto, allo scopo di limitare gli effetti della rapida evaporazione, dovuta alla temperatura della serra.

Dopo 14 giorni di incorporazione, le piantine erano prelevate, lavate a lungo e accuratamente con acqua per allontanare qualsiasi residuo di composto marcato nelle radici, asciugate con acqua bibula e successivamente seccate a 100° C: una parte di essa era portata direttamente all'analisi per la radioattività e il rimanente era alcalinizzato e distillato in corrente di vapore.

L'attività era determinata anche sugli estratti eteri dei distillati.

La misura della radioattività è stata attuata con camere a ionizzazione ed elettrometro Cary sulla CO₂ attiva ottenuta dalla combustione dei campioni, secondo il metodo di VAN SLYKE.

I risultati delle analisi sono riportati nella tabella I.

I semi di *Skytanthus acutus*, provenienti dalla regione di La Serena in Cile, ci sono stati forniti dal Prof. E. BIANCHI e dal Prof. F. DIAZ dell'Università Cattolica del Cile.

I prodotti marcati sono stati i seguenti:

Acido acetico (marcato nel metile)	1 µC/mg
Fenilalanina (marcata in β)	1 µC/mg
Acido mevalonico (marcato in α)	5 µC/mg

TABELLA I.

RADIOATTIVITA' MISURATA

	Composto marcato		
	Fenilalanina	Acido acetico	Acido mevalonico
Attività fornita = a	25 µC	25 µC	25 µC
Attività totale incorporata = b	224.20 mµC	400.00 mµC	6.30 mµC
Attività totale prodotti di distillazione = c	0.14 mµC	0.33 mµC	0.33 mµC
Rapporto: $\frac{c}{b}$	0.062	0.082	5.2

Da detti risultati è evidente che l'acido acetico viene prontamente incorporato dalla pianta. La fenilalanina lo è meno, mentre l'acido mevalonico soltanto molto lentamente entra nel ciclo metabolico dello *Skytanthus acutus*, come è stato già osservato.

Se si suppone che i prodotti di distillazione siano prevalentemente costituiti da skitantine, è da ritenere che l'acido mevalonico sia, in modo più specifico degli altri precursori, utilizzato nella sintesi degli alcaloidi.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità, Laboratori di Chimica Biologica.
 Centro Nazionale Radiobiologica del C.N.R. presso l'Istituto di Chimica Farmaceutica
 e Tossicologica dell'Università - 15 luglio 1964.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) C. G. CASINOVÌ, JUAN A. GARRARINO e G. B. MARINI-BETTÒLO, *Chem. & Ind.* 253 (1961).
- (²) C. DIERHANS, J. P. KUTNSKY, M. SHAMMA, J. N. SHOGLERY e L. P. JOHNSON, *Chem. Ind.*, 210 (1961).
- (³) H. H. APPEL e B. MÜLLER, *Scientia*, 115, 3 (1961).
- (⁴) C. DIERHANS, J. P. KUTNSKY e M. SHAMMA, *Tetrahedron Letters*, 18, 183 (1962).
- (⁵) C. G. CASINOVÌ, F. DELLE MONACHE, G. B. MARINI-BETTÒLO, E. BIANCHI e H. H. APPEL, *Chem. & Ind.* 934 (1963).
- (⁶) C. G. CASINOVÌ, F. DELLE MONACHE, G. B. MARINI-BETTÒLO, E. BIANCHI e J. A. GARRARINO, *Gazz. chim. Ital.*, 92, 479 (1962).
- (⁷) C. G. CASINOVÌ e G. B. MARINI-BETTÒLO. Nota presentata al Simposio di Bruxelles, giugno 1962.
- (⁸) E. J. EISENBRUNN, A. BRIGHT e H. H. APPEL, *Chem. Ind.* 1242, 3 (1962).
- (⁹) G. B. MARINI-BETTÒLO, C. G. CASINOVÌ e F. DELLE MONACHE, *Sci. Rep. Ist. Sup. Sanità*, 2, 195 (1962).
- (¹⁰) C. G. CASINOVÌ, F. DELLE MONACHE, G. B. MARINI-BETTÒLO, E. BIANCHI e J. A. GARRARINO, *Rend. Ist. Sup. Sanità*, 25, 487 (1962).
- (¹¹) G. B. MARINI-BETTÒLO, C. G. CASINOVÌ e F. DELLE MONACHE, *Gazz. chim. Ital.* 93, 1367 (1963).
- (¹²) C. G. CASINOVÌ, F. DELLE MONACHE, G. GRANDOLINI, G. B. MARINI-BETTÒLO e H. H. APPEL, *Chem. Ind.* 934 (1963).
- (¹³) R. F. RAFFAUF e M. B. FLAGLER, *Economic Botany*, 14, 1, 37 (1960).
- (¹⁴) G. BARBER e C. SCHOLZ, *Helv. Chim. Acta*, 16, 1343 (1933).
- (¹⁵) G. HAHN e H. WEINER, *Ann.*, 520, 123 (1953).
- (¹⁶) E. LEEYE, *Chem. & Ind.* 692 (1960).
- (¹⁷) E. LEEYE, *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 6338 (1960).
- (¹⁸) *Nature*, 162, 524 (1948).
- (¹⁹) E. E. VAN TAMELEN, L. D. DOLBY e R. G. LAWTON, *Tetrahedron Letters*, 19, 30 (1960).
- (²⁰) *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 1474 (1959).
- (²¹) *Experientia*, 9, 357 (1953).
- (²²) H. J. NICHOLAS, *J. Biol. Chem.*, 247, 1485 (1962).
- (²³) *Tetrahedron Letters*, 16, 544 (1961).
- (²⁴) K. J. CLARK, G. I. FRAY, R. H. JARVIS e B. ROBINSON, *Tetrahedron Letters*, 6, 217 (1959).
- (²⁵) S. A. ACIMAD e G. W. K. CAVILL, *Proceedings of the Chem. Soc.*, June 1963, pag. 166.
- (²⁶) R. C. COOKSON, J. HUEDE, S. A. KNIGHT e B. WHITEAR, *Tetrahedron Letters*, 2, 79 (1962).
- (²⁷) E. LEEYE e S. GHOSAL, *Tetrahedron Letters*, 25, 1179 (1962).
- (²⁸) A. R. BATTERSEY, R. BINKS, W. LAWRIE, G. V. PARRY e B. R. WERTER, *Proceedings of the Chem. Soc.*, December 1963, pag. 369.
- (²⁹) A. R. BATTERSEY e G. V. PARRY, *Tetrahedron Letters*, 14, 787 (1964).
- (³⁰) A. R. BATTERSEY, R. J. FRANCIS, M. HIRST e J. STAUNTON, *Proceedings of the Chem. Soc.*, September 1963, pag. 268.
- (³¹) D. H. R. BARTON, R. H. HESSE e G. W. KIRBY, *Proceedings of the Chem. Soc.*, September 1963, pag. 267.
- (³²) E. J. HERBERT e G. W. KIRBY, *Tetrahedron Letters*, 23, 1505 (1963).
- (³³) G. JONES, H. M. FALES e W. C. WILDMAN, *Tetrahedron Letters*, 6, 397 (1963).
- (³⁴) Y. HAMMOUDA e M. M. MOTAWI, *Proc. pharm. Soc. Egypt*, 16, 73 (1959).
- (³⁵) M. PLAT, M. KOCH, A. BOUQUET, J. LE JEN e M. M. JANOT, *Bull. Soc. Chim.*, pag. 1302 (1963).
- (³⁶) Y. HAMMOUDA, M. PLAT e J. LE MEN, *Bull. Soc. Chim.*, 2802 (1963).
- (³⁷) Y. HAMMOUDA e J. LE MEN, *Bull. Soc. Chim.*, 2901 (1963).