



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE FARMACEUTICHE

CICLOXXVI

COORDINATORE Prof. Stefano Manfredini

***BIOTRASFORMAZIONI DI ACIDI BILIARI: VALORIZZAZIONE DEI
PRODOTTI "DI SCARTO" NELLA LAVORAZIONE DI ACIDO
URSODESOSSICOLICO***

Settore Scientifico Disciplinare CHIM/11

Dottorando

Dott. Costa Stefania

Tutore

Prof. Pedrini Paola

Anni 2011/2013

INDICE

Capitolo 1. Introduzione	pag. 3
Capitolo 2. Biotrasformazioni di acidi biliari con <i>Rhodococcus spp.</i>	pag. 36
Capitolo 3. 9,10-secosteroidi da acido iodesossicolico con <i>Rhodococcus spp.</i>	pag. 60
Capitolo 4. 9,10-secosteroidi da acidi biliari con <i>Rhodococcus ruber</i>	pag. 91
Capitolo 5. Attività antibatterica ed antifungina	pag. 124
Capitolo 6. Attività antiossidante	pag. 149
Capitolo 7. Conclusioni	pag. 163
Capitolo 8. Bibliografia	pag. 167

CAPITOLO 1

Introduzione

Gli acidi biliari

La bile è una soluzione elettrolitica a pH 6.8-8 prodotta dalle cellule epatiche e dalle cellule dei canalicoli biliari in una quantità giornaliera che varia da 500 a 1500 ml. La bile sintetizzata dal fegato viene secreta nei piccoli dotti biliari dove, attraversando il dotto epatico comune e il dotto cistico, viene immagazzinata nella colecisti (cistifellea). Nell'uomo la cistifellea è posta sotto il margine anteriore del lobo destro del fegato e la sua funzione è quella di accumulare e concentrare la bile la cui composizione è riportata nella Tabella 1.

Tabella 1. Composizione della bile umana

	Bile Epatica	Bile colecistica
Acqua	97.5 %	82 %
Acidi biliari	1.1 %	3-10 %
Bilirubina	0.2 %	0.6-2 %
Acidi grassi	0.12 %	0.3-1.2 %
Colesterolo	0.1 %	0.3-0.9 %
Lecitina	0.04 %	0.1-0.4 %
Na ⁺	145 mEq/l	130 mEq/l
K ⁺	5 mEq/l	9 mEq/l
Ca ²⁺	5 mEq/l	12 mEq/l
Cl ⁻	100 mEq/l	75 mEq/l
HCO ³⁻	28 mEq/l	10 mEq/l

I componenti più importanti della bile sono gli acidi biliari anche se presenti in quantità ridotte (3-10%).

Gli acidi biliari vengono prodotti dagli epatociti a partire dal colesterolo e successivamente, vengono coniugati a due amminoacidi: taurina e glicina.

Al pH fisiologico (6.8-8) della bile e dell'intestino gli acidi biliari si trovano in forma dissociata ed è anche per questo motivo vengono anche denominati sali biliari. Essendo i prodotti finali del metabolismo epatocitario del colesterolo, essi vengono classificati come steroidi.

Gli acidi biliari sono polioidrossiacidi costituiti da una struttura base a quattro anelli saturi condensati che prende il nome di nucleo ciclopentanperidrofenantrenico.

Nella molecola steroidica i metili in C-10 e C-13, indicati rispettivamente come C-19 e C-18, sono detti angolari e sono perpendicolari al piano medio della molecola.

Per convenzione, negli steroidi i gruppi che si trovano dalla stessa parte dei metili angolari sono indicati come sostituenti β , mentre quelli che stanno dalla parte opposta vengono denominati sostituenti α .

Gli anelli cicloesanicici A, B e C degli steroidi hanno conformazione a sedia e mentre le giunzioni degli anelli B, C e D sono sempre *trans* (in *trans* gli idrogeni in C-8 e C-9 e il metile in C-13 e l'idrogeno in C-14), la giunzione tra gli anelli A e B può essere sia *cis* sia *trans*. L'idrogeno in C-5, nel caso di giunzione *trans* tra gli anelli A e B, è orientato verso il basso: questo tipo di giunzione è identificata con il prefisso 5α (Figura 1).

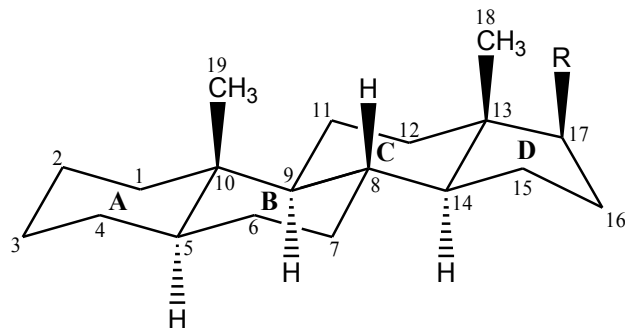


Figura 1. Steroidi della serie 5α

La struttura 5β (Figura 2) invece presenta una saldatura *cis* tra gli anelli A e B e l'idrogeno in C-5 è dalla stessa parte dei metili angolari.

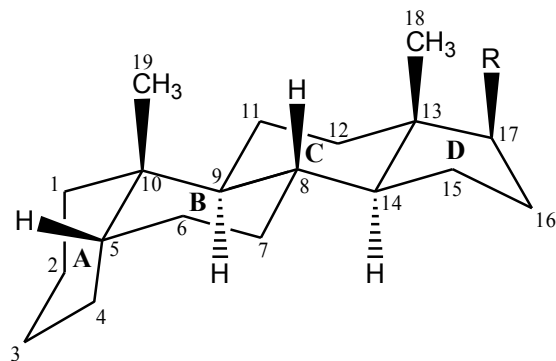


Figura 2. Steroidi della serie 5β

Gli acidi biliari sono steroidi a 24 atomi di carbonio della serie 5β .

Nella bile umana sono presenti due tipi di acidi biliari detti primari:

- Acido colico (acido $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -triidrossicolanico, CA) (Figura 3);

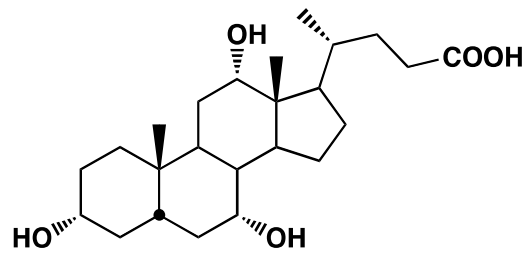


Figura 3. Acido colico (CA)

- Acido chenodesossicolico (acido $3\alpha,7\alpha$ -diidrossicolanico, CDCA) (Figura 4).

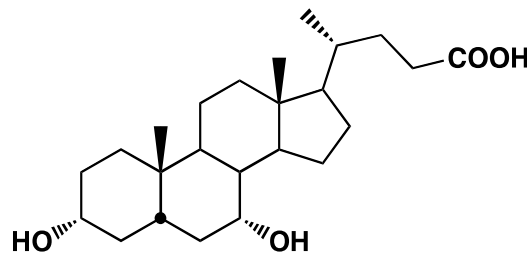


Figura 4. Acido chenodesossicolico (CDCA)

Questi sono presenti in gran parte come coniugati con gli amminoacidi taurina e glicina legati al gruppo carbossilico mediante un legame ammidico.

Il pool degli acidi biliari, oltre a CA e CDCA, comprende anche acidi biliari detti secondari: l'acido desossicolico (DCA) e l'acido litocolico (LCA) (Figura 5), prodotti rispettivamente dagli acidi colico e chenodesossicolico ad opera della flora batterica intestinale mediante una reazione di deidrossillazione in posizione C-7.

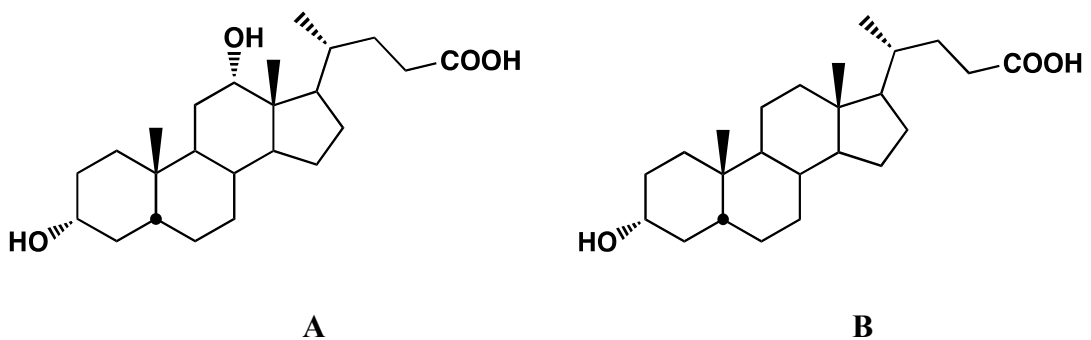
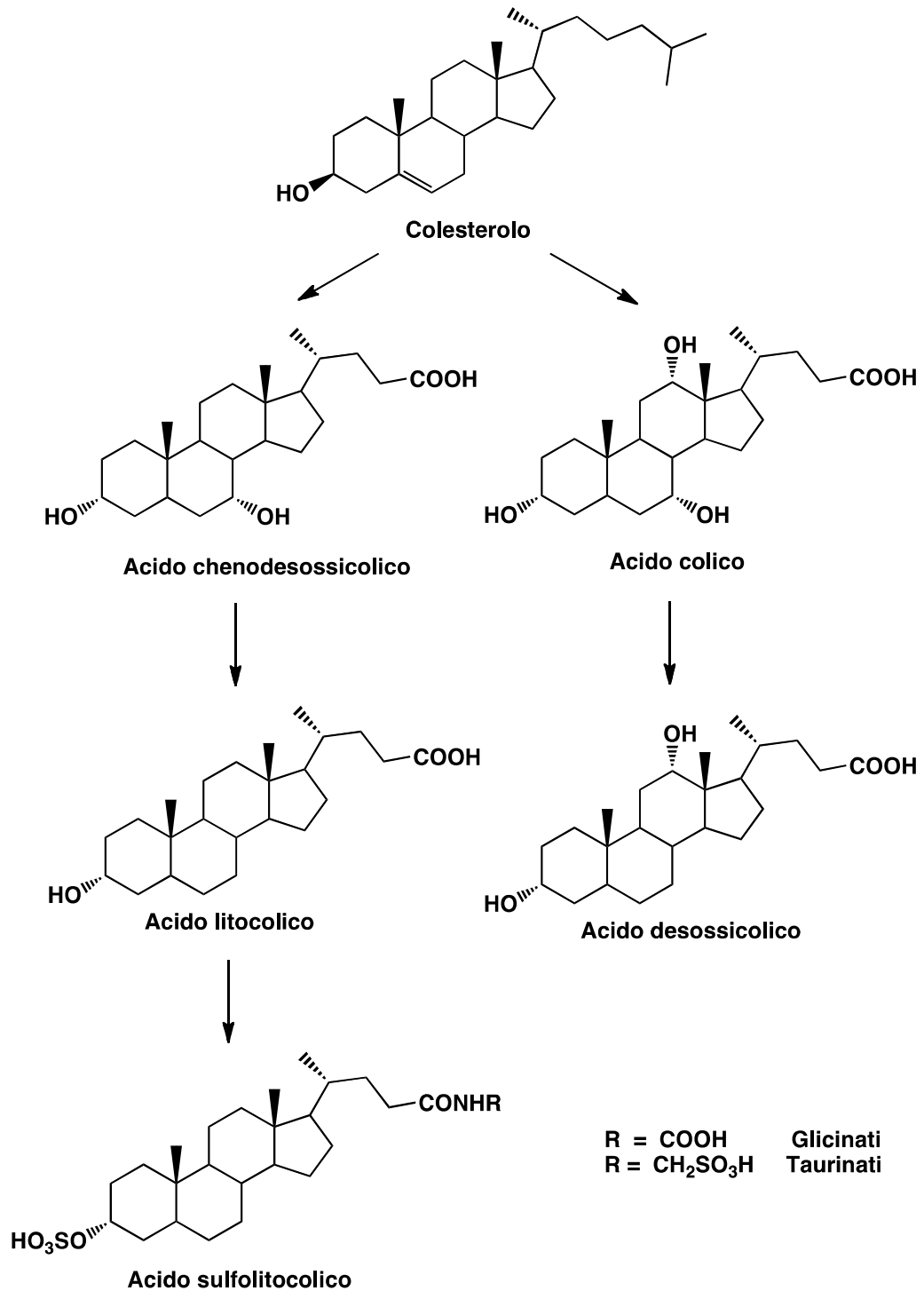


Figura 5. A; acido desossicolico (DCA); B: acido litocolico (LCA)

Questi vengono assorbiti a livello del digiuno prossimale e del colon con un meccanismo di trasporto passivo [1]. Dopo essere stati assorbiti dall'intestino, gli acidi biliari vengono

riconvogliati al fegato dove subiscono diverse trasformazioni che generano gli acidi biliari terziari: ad esempio l'acido litocolico, di cui è nota l'epatotossicità, viene solfatato (diventando così acido sulfolitocolico) per aumentarne l'idrosolubilità e diminuirne così il riassorbimento. Gli acidi biliari così trasformati vengono coniugati nuovamente con taurina e glicina e secreti nella bile (Schema 1).



Schema 1

A livello intestinale avvengono ulteriori reazioni catalizzate dalla flora batterica come l'idrolisi dei coniugati e l'epimerizzazione in posizione C-7 dell'acido chenodesossicolico (il sostituito da α passa a β) con formazione dell'acido ursodesossicolico (UDCA) (Figura 6).

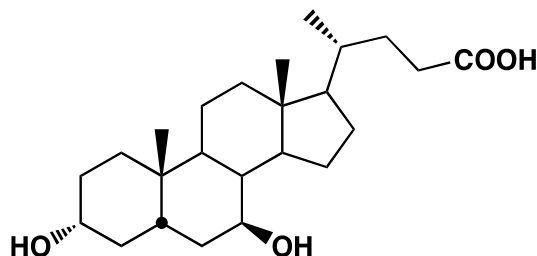


Figura 6. Acido ursodesossicolico (UDCA)

Le varie attività svolte dagli acidi biliari all'interno dell'organismo sono collegate alla particolare struttura che queste molecole possiedono; esiste una stretta relazione tra funzione fisiologica e struttura che viene definita dalle proprietà chimico-fisiche proprie di queste molecole. In particolar modo la loro natura anfipatica ne garantisce la capacità di trasportare molecole lipidiche. La natura anfipatica è data dalla presenza di due regioni:

- Una polare costituita dai gruppi ossidrilici presenti in diverso numero e posizione ed α -orientati;
- Una non polare composta identificabile con i sostituenti metilici β -orientati.

La capacità "detergente" e/o di trasporto lipidico degli acidi biliari si esplica nella formazione di micelle, in cui trovano spazio composti lipofili, ottenute per aggregazione di molti monomeri.

Tale fenomeno avviene in un ben definito ambito di concentrazione, al di sotto del quale sono presenti solo monomeri, mentre al di sopra aumenta la concentrazione degli acidi biliari aggregati in micelle. Questo parametro viene definito "concentrazione micellare critica" (CMC). E' possibile misurare tale valore di CMC tramite metodi chimico-fisici che forniscono un valore di CMC, al di sopra del quale inizia la formazione di aggregati. I metodi più noti sono basati su misurazioni di valori di tensione superficiale, di solubilizzazione di coloranti e su misure di attività mediante elettrodi selettivi per gli acidi biliari.

Le principali funzioni fisiologiche di questo tipo di molecole riguardano la regolazione della secrezione e del trasporto biliare oltre alla capacità di emulsionare lipidi, quali il colesterolo, favorendone la digestione e l'assorbimento intestinale.

A causa di malattie infiammatorie della parete della colecisti, di alterazioni della dinamica dei fluidi nell'albero biliare o di bile completamente satura di colesterolo, nella cistifellea possono verificarsi fenomeni di precipitazione del colesterolo con conseguente necessità di interventi chirurgici per rimuovere i calcoli o, nella peggiore delle ipotesi l'intera colecisti [2]. Il colesterolo, infatti, precipita in piccoli cristalli che, agglomerandosi su un nucleo di sedimentazione, portano alla produzione di calcoli (bile litogena).

Fino agli anni '70 l'unico trattamento terapeutico contro i calcoli biliari era rappresentato dall'intervento chirurgico. Oggi, invece, molti pazienti vengono trattati con terapia a base di acido chenodesossicolico e acido ursodesossicolico poiché alcune ricerche hanno dimostrato come i calcoli biliari vengono solubilizzati utilizzando questi acidi biliari come farmaci [3].

L'acido ursodesossicolico è il 7 β -epimero dell'acido chenodesossicolico e rappresenta una piccola percentuale degli acidi biliari totali presenti fisiologicamente nella bile umana. Nell'uomo l'acido ursodesossicolico è in grado di aumentare la capacità di solubilizzare il colesterolo nella bile trasformandola da bile litogena a bile non litogena.

I meccanismi attraverso cui si manifesta questo effetto farmacologico sono più di uno:

- diminuzione della secrezione di colesterolo nella bile, dovuta alla riduzione della sintesi epatica del colesterolo stesso e del suo assorbimento a livello intestinale;
- aumento della quantità complessiva di acidi biliari che favoriscono la solubilizzazione micellare del colesterolo;
- formazione di una mesofase liquido-cristallina che permette di solubilizzare il colesterolo in modo più efficiente rispetto alla solubilizzazione ottenibile in fase di equilibrio.

L'acido ursodesossicolico viene considerato di maggior importanza farmacologica rispetto all'acido chenodesossicolico nella terapia contro la calcolosi biliare, in quanto possiede elevata efficacia [4] e totale assenza di effetti collaterali [5].

Date queste caratteristiche l'acido ursodesossicolico rappresenta un prodotto di largo interesse industriale a livello mondiale. Si trova in discrete quantità nella bile degli orsi (da cui deriva anche il suo nome) ma l'estrazione dalla bile di questi animali è improponibile

perchè ne causerebbe l'estinzione. Questa pratica è stata abbandonata dai paesi occidentali ma continua ad essere praticata in paesi come la Cina, con metodiche alquanto discutibili. A livello mondiale, oggi, la produzione di UDCA viene fatta partendo dagli acidi biliari presenti nella bile bovina e suina. Questi animali vengono allevati per la loro carne e la bile viene raccolta, essiccata ed è la materia prima per il processo industriale.

La bile come materia prima

Oggi l'acido ursodesossicolico viene sintetizzato per via chimica a partire dall'acido colico e chenodesossicolico di origine bovina e suina attraverso reazioni chimiche costose ed inquinanti.

La materia prima dalla quale si parte per ottenere acido ursodesossicolico è la bile di diversi animali da macello in quanto la cistifellea ed il suo contenuto non vengono utilizzati a scopo alimentare. Fino a qualche anno la fonte principale per ottenere gli acidi biliari era la bile bovina dato che il consumo a livello alimentare di questi animali era particolarmente elevato. Negli ultimi anni è aumentato sensibilmente anche il consumo di carne suina e di pollo. In Tabella 2 vengono riportati i diversi quantitativi di acidi biliari contenuti nella bile dei diversi animali.

Tabella 2. Contenuto di acidi biliari nelle bili degli animali da macello

BILE BOVINA	BILE SUINA	BILE DI POLLO
Acido colico 45-50%	Acido iodesossicolico 40%	Acido colico 9%
Acido chenodesossicolico 10-15%	Acido chenodesossicolico 25- 30%	Acido chenodesossicolico 85%
Acido desossicolico 20%	Acido iocolico 10%	

Per tale motivo oggi anche la bile suina viene utilizzata come fonte primaria di acidi biliari per la sintesi di acido ursodesossicolico e sono in corso studi di fattibilità per l'utilizzo di quella di pollo, che è interessante perché contiene solamente CA e CDCA. Il limite maggiore dell'utilizzo di questa bile è che la cistifellea del pollo è molto piccola e quindi difficilmente lavorabile.

A livello mondiale il consumo di carne è aumentato sensibilmente negli ultimi anni: i suini da allevamento sono passati dai 547 milioni del 1970 ai 965 milioni del 2010, il consumo di bovini dal 2000 al 2010 è aumentato di oltre il 10% in termini di quantità di tonnellate prodotte (Figura 7).

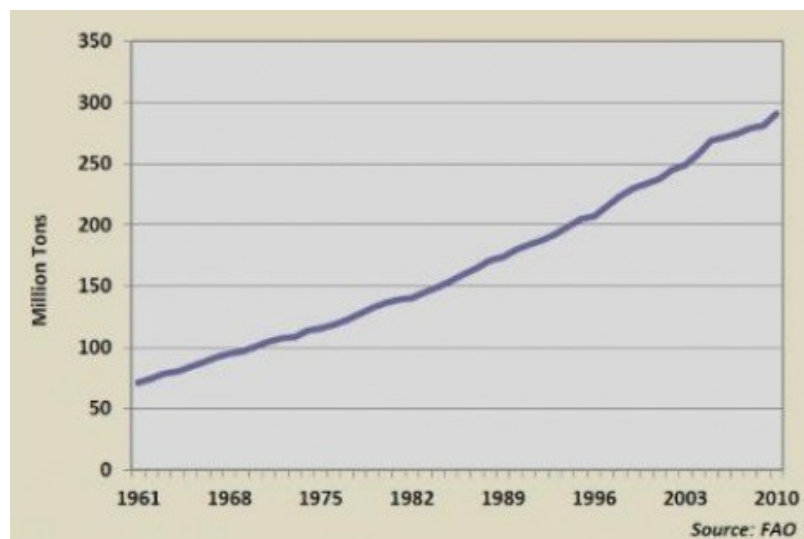


Figura 7. Aumento del consumo di carne a livello mondiale

La domanda di carne è andata significativamente incrementandosi nei paesi in via di sviluppo, particolarmente in quelli di nuova industrializzazione. In questi paesi il consumo pro capite di carne è triplicato tra il 1980 ed il 2005 ed, il maggiore incremento si è avuto nelle zone del sud-est asiatico. L'aumento della richiesta, e conseguentemente dei capi macellati, è direttamente riconducibile all'incremento della produzione di bile e quindi di acidi biliari.

Dati FAO del 2011 [6] riportano le quantità di animali macellati a livello mondiale. Si stima che siano state macellate 66.3 milioni di tonnellate di carne bovina, 110.3 milioni di tonnellate di carne suina e 89.9 milioni di tonnellate di carne di pollo. Molto variabile è il quantitativo delle diverse carni consumate nei vari continenti, per questo motivo in alcuni paesi viene privilegiata la bile bovina come materiale di partenza per la produzione di acidi biliari, mentre in altri vengono utilizzate bile di pollo o di suino.

In Tabella 3 vengono riportati i quantitativi di carne bovina, suina e di pollo prodotti nei vari continenti (dati FAO 2011).

Per la produzione di acido chenodesossicolico, ursodesossicolico ed acido tauroursodesossicolico viene utilizzata nei paesi occidentali prevalentemente la bile bovina.

Tabella 3. Quantitativi di carne prodotti nei vari continenti

	CARNE BOVINA (ton)	CARNE SUINA (ton)	CARNE DI POLLO (ton)
AFRICA	5.773.175	1.282.893	4.644.908
AMERICA	30.174.884	19.184.159	39.780.863
ASIA	16.867.032	61.814.109	29.867.025
EUROPA	10.766.064	27.505.006	14.463.649
OCEANIA	2.752.648	483.998	1.200.270

La cistifellea di un bovino mediamente contiene 150-200 ml di bile liquida. A livello mondiale (dati FAO 2011) vengono macellati circa 320 milioni di capi bovini all'anno. Considerando che il contenuto in acidi biliari della bile bovina è circa il 7-10% e che la quantità teorica di bile bovina prodotta è di circa 48 milioni di litri a livello mondiale, gli acidi biliari prodotti ammontano a 4.8 tonnellate.

Dopo il processo di macellazione la bile del bovino viene conservata con una soluzione di idrossido di sodio diluita oppure con una soluzione di formaldeide per evitare che gli acidi biliari vengano degradati dai batteri presenti nella bile. Tale lavorazione viene effettuata prima del processo di concentrazione della bile stessa effettuata generalmente a pressione ambiente o sottovuoto per eliminare la maggior parte di acqua (il contenuto di acqua della bile liquida è l'85% p/p ca.) ed arrivare ad un contenuto minimo di acido colico del 33% p/p ed un contenuto di acqua minore od uguale al 25%. Una volta concentrata la bile viene stoccata in fusti di ferro o acciaio dal volume di 200 litri ca.

Vi sono macelli che, senza aggiunta di conservanti, concentrano la bile subito dopo il processo di estrazione dalla cistifellea, tale procedimento viene eseguito manualmente.

La bile concentrata, chiamata anche bile pasta o bile ispessita, si presenta come una massa dura, molto viscosa, di colore dal verde scuro al marrone brillante, di consistenza simile al catrame. La bile pasta, se ottenuta da bile conservata in soluzione di soda, contiene i sali sodici degli acidi biliari liberi e non più coniugati con la taurina e la glicina, mentre quella conservata con formaldeide e quella subito concentrata dopo il processo di estrazione dalla cistifellea, contiene prevalentemente gli acidi biliari ancora coniugati con glicina e taurina. Per la produzione di UDCA, è possibile partire anche dalla bile di pollo e di maiale. Nei paesi orientali, Cina in primo luogo, viene estratto l'acido chenodesossicolico principalmente dalla bile di pollo e dalla bile di maiale. In Cina si macellano circa 9

miliardi di polli l'anno. Ogni cistifellea di pollo contiene mediamente 2.5 ml di bile, il contenuto di acidi biliari nella bile di pollo è circa il 10% e quindi da una tonnellata di cistifellee di pollo congelate si possono ottenere 20 kg di acido chenodesossicolico.

Per quanto riguarda i suini vengono macellati circa 1.4 miliardi di capi l'anno dai quali si ricavano 69 milioni di litri di bile (considerando circa 50 ml di bile/maiale). Il contenuto di acidi biliari nella bile suina è del 10% per cui si ottengono 6.9 tonnellate di acidi biliari. Il contenuto di acido chenodesossicolico nella bile suina è del 25% circa ma il suo recupero come prodotto puro dalla miscela di acidi biliari di questa bile risulta essere piuttosto difficoltoso.

Gli acidi biliari utilizzati per sintetizzare chimicamente acido ursodesossicolico sono acido colico e acido chenodesossicolico. Gli altri acidi biliari ad oggi vengono considerati prodotti di scarto o utilizzati solamente come agenti emulsionanti per cui sarebbe molto interessante trovare un modo per poterli reintrodurre nel ciclo produttivo di acido ursodesossicolico.

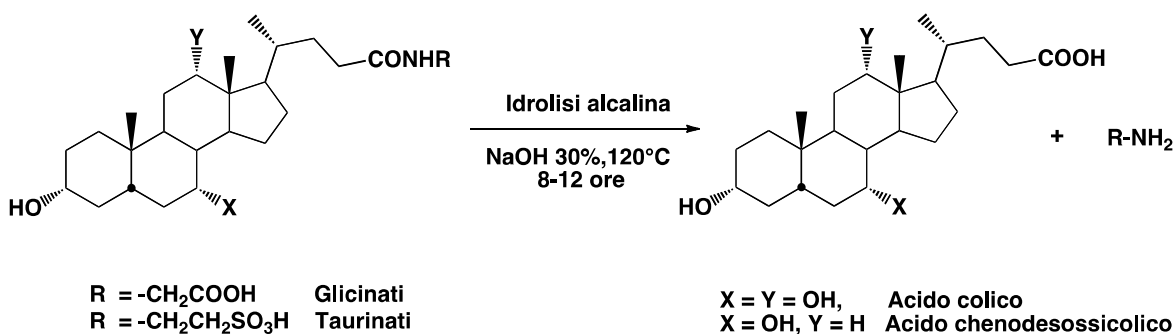
Sintesi chimica di acido ursodesossicolico (UDCA)

UDCA é un principio attivo molto costoso in quanto, a tutt'oggi, si può ottenere mediante due diverse metodologie:

- Estrazione dalla bile dell'orso nella quale è presente per il 38% (pratica ovviamente abbandonata nei paesi civili);
- Sintesi chimica partendo dall'acido colico e chenodesossicolico (CDCA). Tali reazioni sono caratterizzate da alti costi ed elevato impatto ambientale.

Nei paesi occidentali, la necessità di produrre ingenti quantità di acido ursodesossicolico ha portato alla messa a punto di metodologie di sintesi che utilizzano come prodotti di partenza i taurinati e i glicinati dell'acido colico e chenodesossicolico della bile bovina. L'acido colico é il principale costituente della bile bovina (45-50% sul secco) ed è, date le quantità, il principale substrato di partenza per la sintesi del principio attivo di interesse farmacologico.

Il primo stadio della sintesi di UDCA per via chimica è l'idrolisi alcalina della bile per il rilascio degli acidi biliari che fisiologicamente si trovano coniugati a taurina e glicina: questa reazione richiede l'impiego di grosse quantità di NaOH (30%) ed alte temperature (120°C) per tempi lunghi (8-12 ore) (Schema 2).

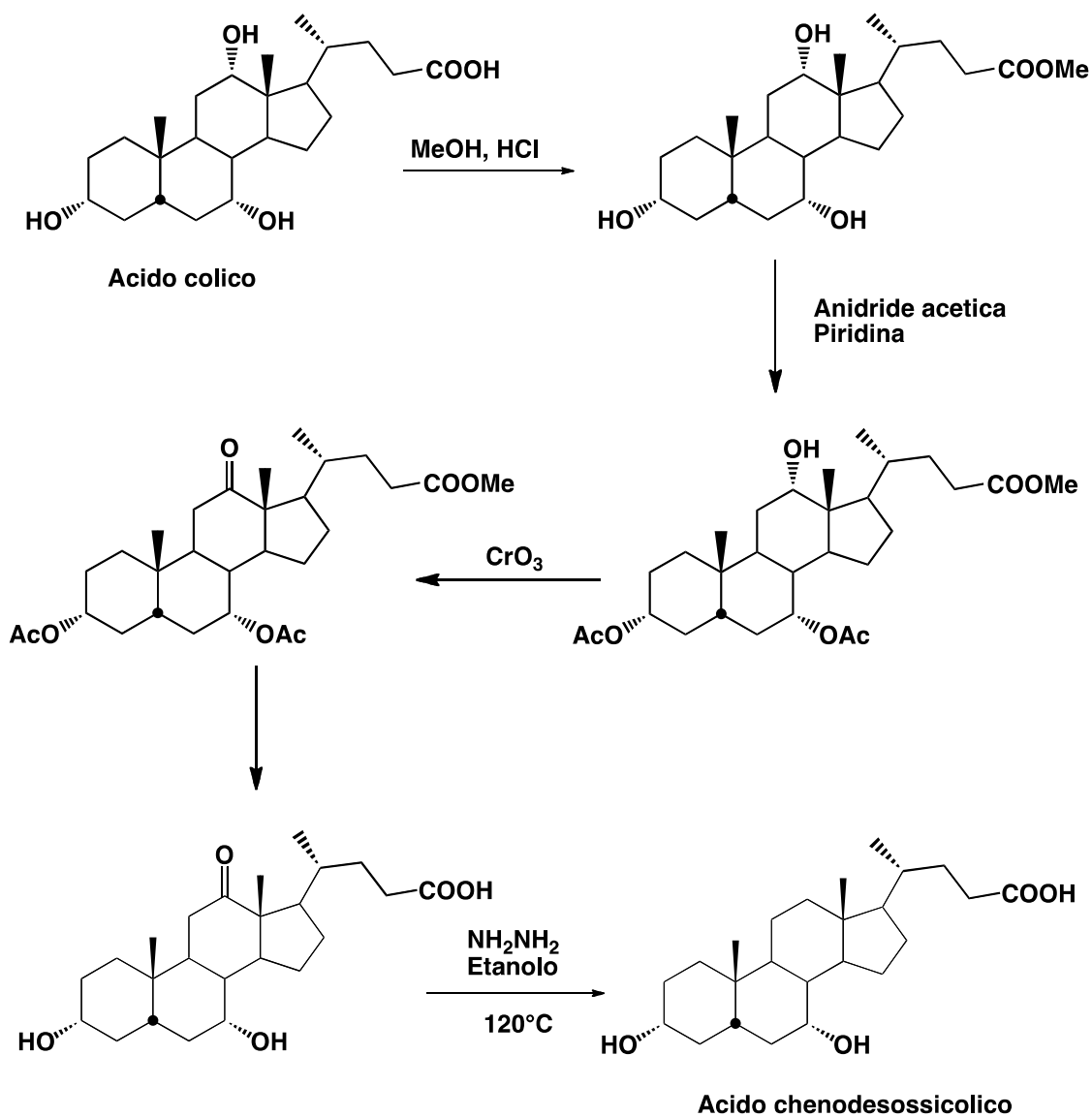


Schema 2

Una volta separato l'acido colico dalla miscela biliare, la sintesi chimica di CDCA e UDCA viene eseguita secondo una metodologia in cinque step messa a punto negli anni '50 da Fieser e Hofman [7] [8] (Schema 3):

1. Esterificazione con metanolo e conseguente formazione di metil colato;

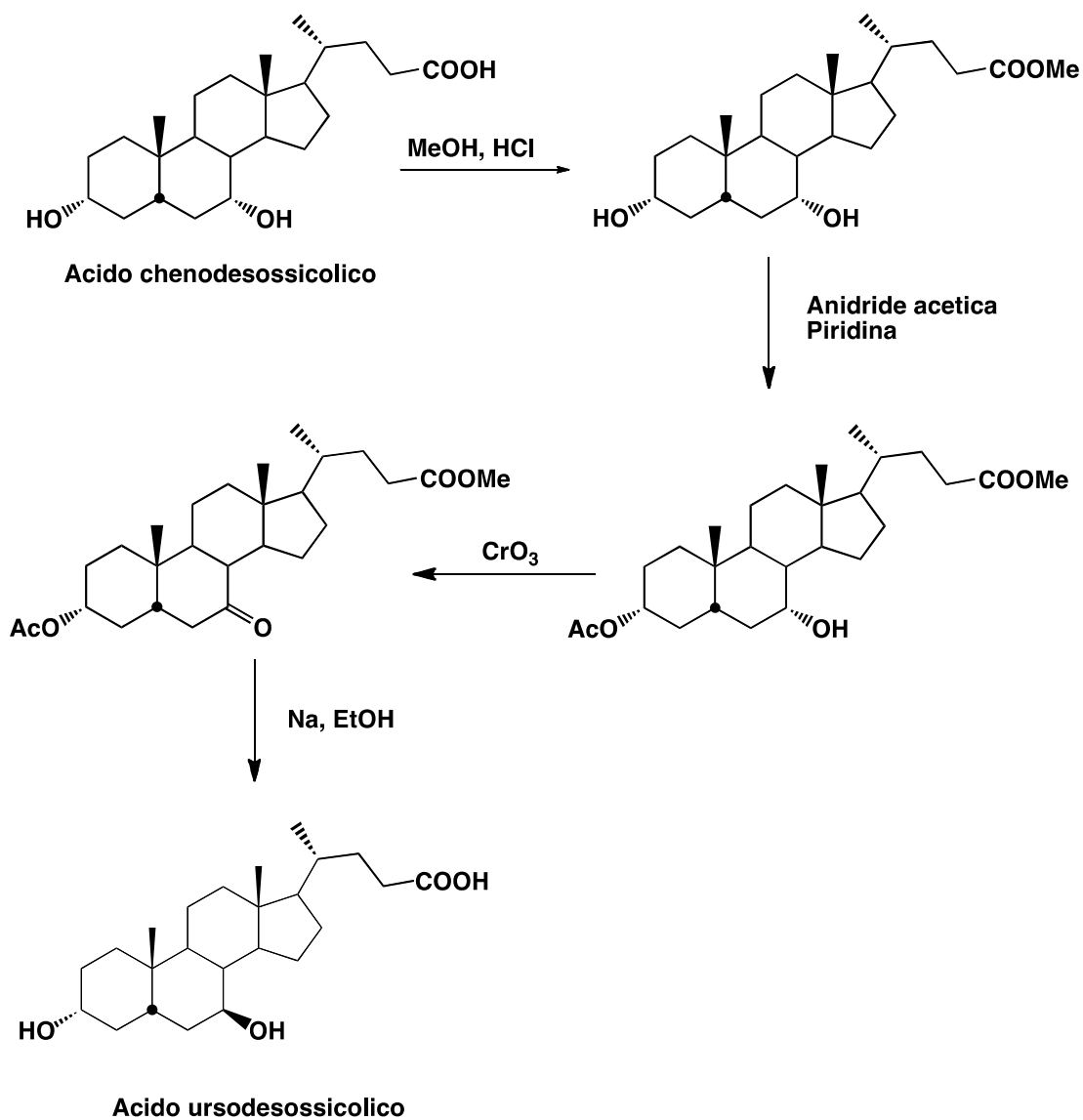
2. Acetilazione regioselettiva con piridina e anidride acetica degli ossidrili in posizione C-3 e C-7 (protezione di gruppi funzionali);
3. Ossidazione in C-12 con CrO_3 ;
4. Idrolisi degli esteri metilico e acetilici;
5. Riduzione di Wolff-Kishner per ottenere CDCA.



Schema 3

Partendo da CDCA si ottiene UDCA mediante un' α/β -inversione selettiva dell'ossidrile in posizione C-7 [9]. (Schema 4). Questa conversione richiede varie reazioni simili alle precedenti:

1. Esterificazione con metanolo e formazione di metil chenossicolato;
2. Acetilazione regioselettiva con piridina e anidride acetica dell'ossidrile in posizione C-3;
3. Ossidazione in C-7 con CrO_3 ;
4. Riduzione stereoselettiva del gruppo chetonico in C-7 con Na.



Schema 4

Queste procedure, comprensive anche del processo di idrolisi della bile bovina, risultano essere estremamente delicate sia sul piano del rischio che del costo e soprattutto dell'impatto ambientale.

In conclusione emerge come la sintesi organica finalizzata all'ottenimento dei substrati di interesse (UDCA e CDCA) da taurinati e glicinati di acido colico sia lunga, complicata ed in qualche misura rischiosa a causa della natura e della tossicità dei reagenti impiegati. L'utilizzo di elevate concentrazioni di NaOH per l'idrolisi della bile è senza dubbio un processo che comporta ingenti spese per lo smaltimento dei prodotti di rifiuto (lo stesso discorso vale anche per i sali di cromo e solventi organici).

Alle successive reazioni di sintesi chimica, che non permettono un facile controllo della stereochimica, si aggiungono inoltre reazioni secondarie con conseguente formazione di sottoprodotti, i quali rendono necessaria la purificazione dei prodotti ottenuti ad ogni step di reazione. Tutto ciò allunga i tempi, diminuisce le rese e contribuisce all'aumento dei costi di produzione.

La necessità di metodologie alternative per l'ottenimento di UDCA e CDCA maggiormente sicure ed economicamente più convenienti ha spinto molti ricercatori a dedicarsi ad un approccio microbiologico ed enzimatico.

Uno degli approcci che sembra promettere grandi risultati è quello, di facile gestione, delle biotrasformazioni con microrganismi non patogeni e/o con i loro enzimi.

Biotrasformazioni degli acidi biliari

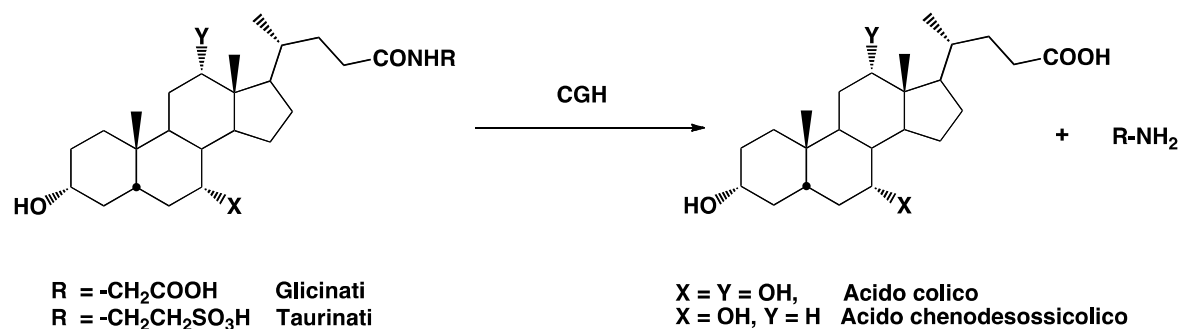
Le biotrasformazioni degli acidi biliari sono state a fondo studiate in quanto i microrganismi e/o gli enzimi in essi presenti sono una valida alternativa alla sintesi chimica. Sfruttando, infatti, la regio- e stereoselettività degli enzimi si ottengono prodotti con rese elevate e non sono necessarie reazioni di protezione/deprotezione dei vari gruppi ossidrilici presenti sull'anello. Per questi motivi le ricerche, mirate ad ottenere un'ampia gamma di enzimi specifici per varie posizioni del nucleo steroideo, sono tuttora in corso.

A tutt'oggi, le biotrasformazioni "target" degli acidi biliari sono le ossido-riduzioni mediate da idrossisteroide deidrogenasi (HSDH), le idrossilazioni/deidrossilazioni mediate da idrossilasi insieme alle reazioni di idrolisi dei vari coniugati. Mentre le ossido-riduzioni e le idrolisi sono da considerarsi una strategia complementare a quella chimica, nel caso particolare delle idrossilazioni queste sono l'unica strada percorribile per introdurre direttamente un atomo di ossigeno sul legame C-H.

Idrolisi

L'idrolisi dei glicinati e taurinati degli acidi biliari per via microbiologica e/o enzimatica è sicuramente una valida alternativa alla idrolisi chimica ottenuta con basi acquose concentrate ed alte temperature. L'idrolisi enzimatica, infatti, diminuisce in maniera significativa l'impatto ambientale dell'approccio chimico.

Sono noti microrganismi che nel loro corredo enzimatico possiedono l'enzima colilglicina idrolasi (CGH) [10] in grado di idrolizzare il legame tra acido biliare ed amminoacido (Schema 5).



Schema 5

Questo enzima, scoperto ed isolato da *Clostridium perfringens*, un ceppo batterico presente nella flora intestinale, mostra una maggiore velocità di idrolisi per i coniugati degli acidi biliari aventi sullo scheletro steroideo gruppi ossidrilici rispetto a quelli aventi gruppi chetonici (i.e. acido deidrocolico). In aggiunta i glicinati sono idrolizzati più velocemente dei taurinati.

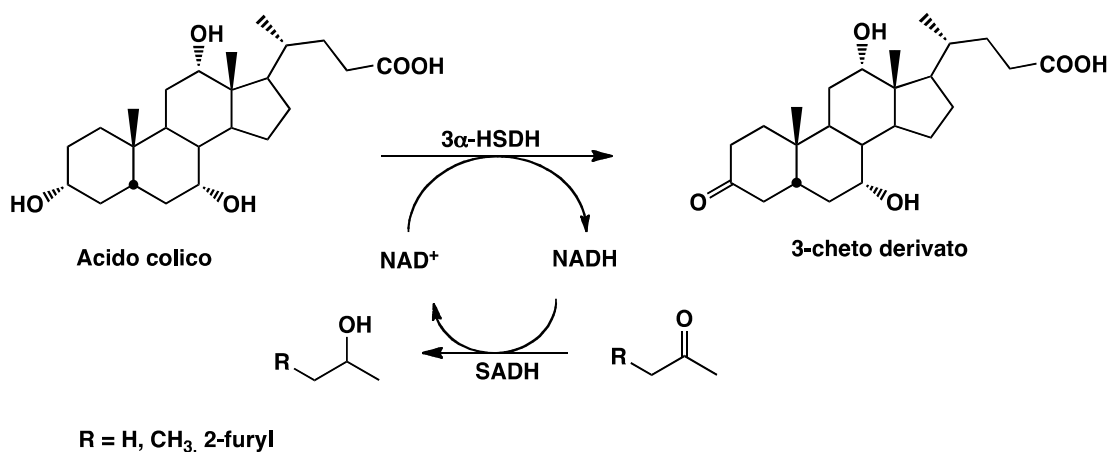
I primi studi su questo enzima risalgono al 1984. Batta *et al.* [11] riportano i risultati dell'enzima CGH saggiato su diversi substrati: in particolare sono stati monitorati gli effetti di modificazioni a livello dello scheletro steroideo, della catena laterale e degli amminoacidi coniugati sulla capacità idrolitica di questo enzima. Un'altra colilglicina idrolasi è stata purificata e caratterizzata da un ceppo di *Xanthomonas maltophilia* isolato in un ambiente particolarmente ricco di acidi biliari [12].

L'idrolisi dei coniugati degli acidi biliari si è ottenuta anche con ceppi di *Lactobacillus*, in particolare *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* [13]. Il gene di CGH di *Lactobacillus plantarum* 80 è stato inoltre clonato ed espresso in *Escherichia coli* MC1061 [14].

Ossidazione

Le reazioni di ossidazione degli acidi biliari sono quelle a carico degli ossidrili presenti in diverse posizioni del nucleo steroideo. Gli enzimi che catalizzano questo tipo di reazioni sono idrossisteroide deidrogenasi (HSDH) [15]. Si tratta di ossidoreduttasi NADH o NADPH dipendenti, una classe di enzimi che catalizzano l'ossidazione reversibile di gruppi idrossilici o chetonici degli steroidi [16].

Nel gruppo di ricerca dove ho svolto il periodo di dottorato l'ossidazione regiospecifica delle funzioni ossidriliche degli acidi biliari è stata oggetto di vari screening [17] [18]. La reazione di ossidazione più frequentemente osservata nel campo delle biotrasformazioni degli acidi biliari è quella a carico dell'ossidrile presente in posizione C-3. Un esempio significativo è l'ossidazione regioselettiva di acido colico con rese eccellenti per incubazione con *Pseudomonas paucimobilis* [19].



Schema 6

La parziale purificazione della 3 α -HSDH da questo ceppo ha rivelato la presenza di una seconda frazione enzimatica caratterizzata come alcool deidrogenasi specifica per alcoli secondari (SADH). Tale enzima, che ha NADH come cofattore e catalizza la riduzione di carbonili a funzioni idrossiliche secondarie, è stato utilizzato come sistema di riciclo nella reazione di ossidazione mediata da 3 α -HSDH.

Per quanto riguarda l'ossidazione del gruppo C₇-OH, ceppi di *Eubacterium lentum* mostrano attività 7 α -OH deidrogenante che viene considerevolmente soppressa in presenza di ossigeno [20]. La deidrogenazione del gruppo 7 α -OH di acido chenodesossicolico e di acido colico è stata osservata sia in ceppi batterici isolati sia in colture microbiche miste provenienti da feci umane [21] [22] a dimostrazione del fatto che questo tipo di attività in *Eubacterium lentum* è fortemente favorita da condizioni anaerobiche.

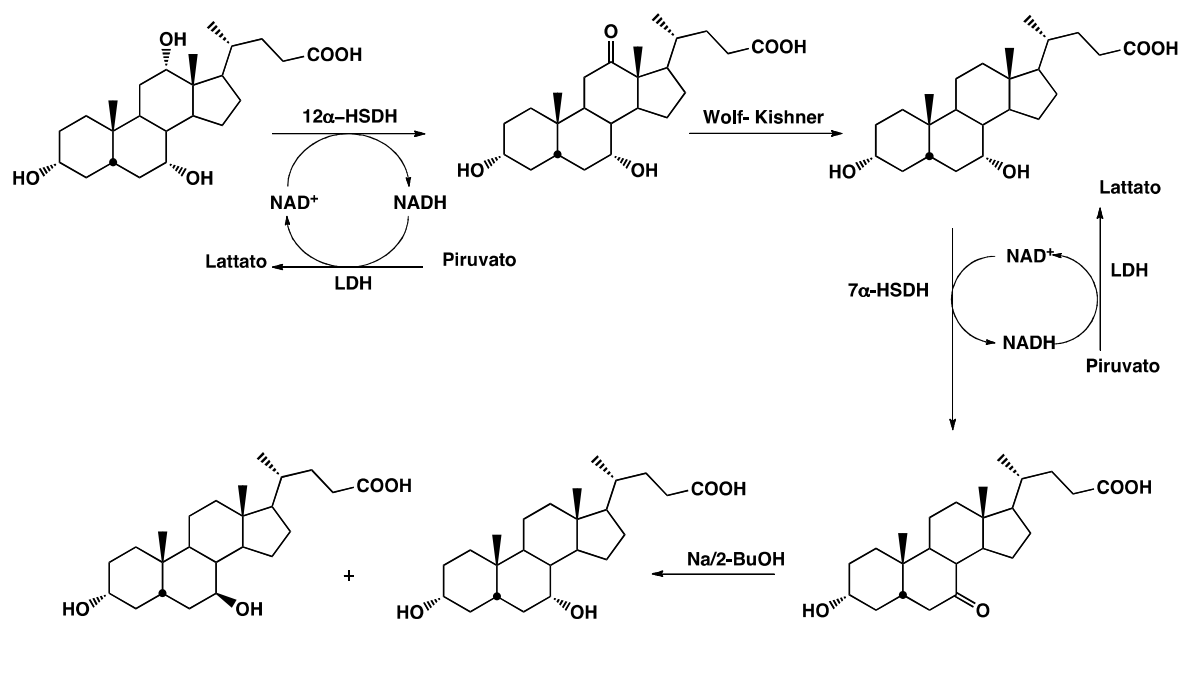
Edenharder *et al.* [23] hanno riportato dati sulle biotrasformazioni di CDCA operate da specie saccarolitiche di *Bacteriodes*. La maggior parte dei ceppi attivi (se coltivati in condizioni anaerobiche) appartengono alle specie *Bacteriodes fragilis* e *Bacteriodes thetaiotaomicron*. In aggiunta *Clostridium bifermentans* F6, isolato dal suolo [24], ossida l'acido colico e l'acido chenodesossicolico ai corrispondenti 7-cheto derivati ma non è in grado di ossidare l'acido ursocolico (UCA) e l'acido ursodesossicolico (UDCA).

Per quanto riguarda l'ossidazione dell'ossidrile presente in C-12 numerosi sono gli esempi in letteratura di microrganismi dotati di 12 α -HSDH tra i quali *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides eggerthii*, *Bacteroides vulgatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius* e *Peptococcus magnus* [20]. L'ossidazione del gruppo C₁₂-OH di acido

desossicolico si ottiene anche con *Arthrobacter simplex* anche se in miscela col 3,12-dicheto derivato [25].

Data l'importanza industriale di questa reazione, in quanto l'ossidazione dell'ossidrile in C-12 è la via per l'eliminazione di questo gruppo funzionale che non è presente nei più comuni farmaci o ormoni steroidei, sono stati depositati numerosi brevetti [26] [27] [28] [29] nei quali il comune denominatore è la produzione di vari prodotti di ossidazione partendo da diversi acidi biliari.

Un esempio di approccio chemo-enzimatico alla sintesi di acido ursodesossicolico partendo da acido colico è riportato in letteratura [30] (Schema 7).



Schema 7

Gli enzimi coinvolti sono 7 α - e 12 α -HSDH purificati da *Acinetobacter calcoaceticus lwoffii*, un ceppo batterico isolato da un campione di terreno proveniente dall'azienda ICE srl di Reggio Emilia. Gli enzimi sono stati parzialmente purificati ed utilizzati in questa nuova metodologia di sintesi chemo-enzimatica.

Gli step di reazione sono i seguenti:

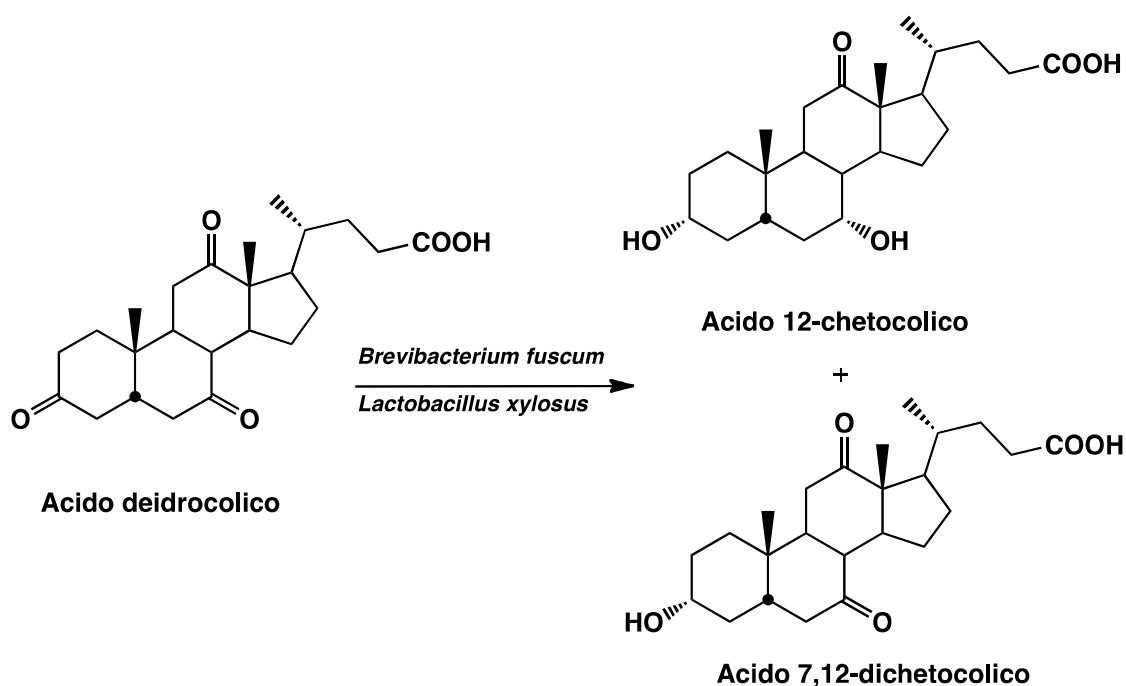
- Ossidazione di acido desossicolico in posizione C-12 catalizzata da 12 α -HSDH;
- Rimozione del gruppo carbonilico attraverso la reazione di Wolf-Kishner, per dare CDCA;

- Ossidazione di CDCA ad acido 7-chetochenodesossicolico con 7 α -HSDH;
- Riduzione a UDCA e UCA con Na e 2-butanolo anidro.

In questo approccio chemo-enzimatico la riduzione del numero di step necessari per la sintesi di UCDA e la sostenibilità in termini di impatto ambientale costituiscono un grande vantaggio rispetto alla sintesi chimica, per cui questa metodologia può costituire un'ottima alternativa alla classica sintesi di UDCA.

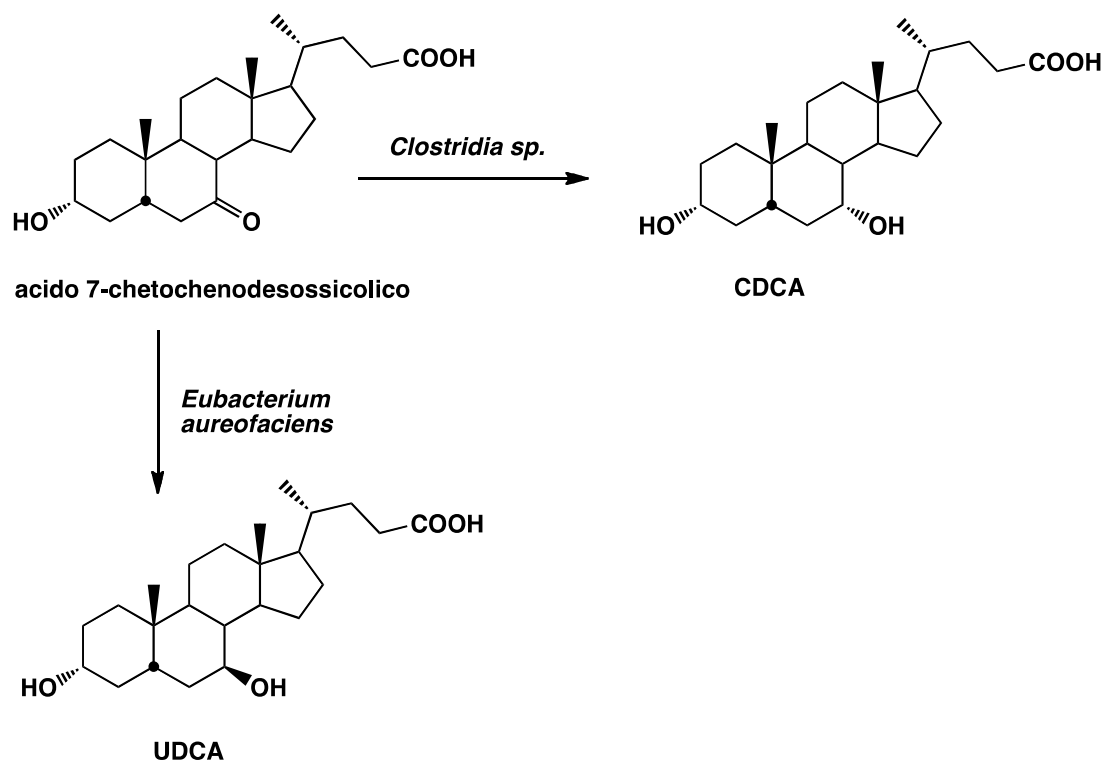
Riduzione

Le reazioni di riduzione più interessanti sono quelle con *Brevibacterium fuscum* e *Lactobacillus xylosus* che permettono di convertire l'acido deidrocolico in acido 12-chetocolico (con rese rispettivamente del 50% e 55%) e in acido 7,12-dichetolitocolico [31] [32] [33] (Schema 8).



Schema 8

Altra biotrasformazione interessante è quella che, partendo dall'acido 7-chetochenodesossicolico, permette di ottenere CDCA con *Clostridia* lecitinasi-lipasi negativi, [34] mentre con *Eubacterium aureofaciens*, si ottiene UDCA [35] (Schema 9).



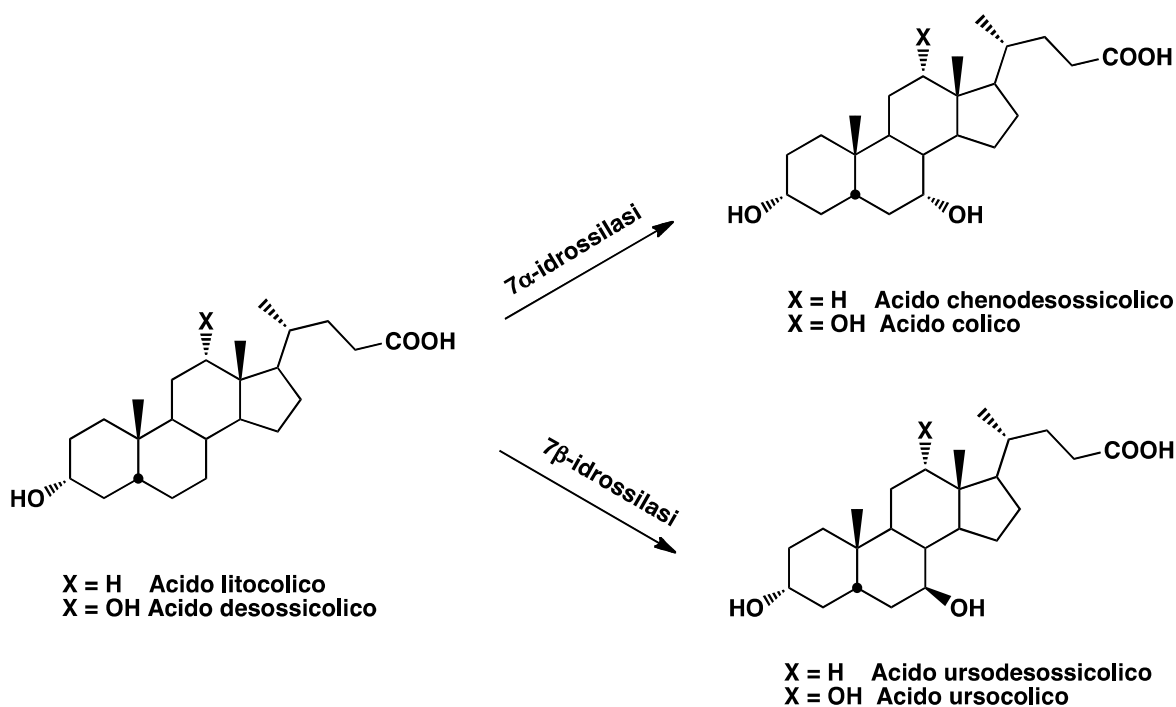
Schema 9

Per quanto riguarda la riduzione di 3-cheto derivati degli acidi biliari esistono molti microrganismi ed enzimi commerciali in grado di effettuare questa reazione e numerosi sono gli esempi riportati in letteratura [20] [36]. Uno dei primi lavori a tal proposito risale agli anni ottanta. Edenharder e Mielek infatti dimostrarono che le biotrasformazioni condotte con *Eubacterium lentum* sui 3-cheto derivati degli acidi biliari fornivano i corrispondenti 3 α - e 3 β -idrossi derivati [20].

Idrossilazione

Le reazioni di idrossilazione sono tra le più ricercate nell'ambito della biocatalisi in quanto non sono ottenibili direttamente mediante sintesi chimica. Un esempio molto importante è costituito dalla possibilità di idrossilare in posizione C-7 l'acido litocolico e l'acido desossicolico, ad oggi considerati prodotti di scarto della lavorazione della bile. In particolare l'idrossilazione di acido litocolico porta a CDCA (7 α -idrossilazione) o a UDCA (7 β -idrossilazione). Per quanto riguarda l'acido desossicolico una 7 α -idrossilasi permette di ottenere acido colico mentre una 7 β -idrossilasi fornisce acido ursocolico. Queste

reazioni hanno grande importanza perché permettono di utilizzare questi prodotti di bassissimo valore commerciale per la sintesi di UDCA (Schema 10).



Schema 10

La reazione di idrossilazione da acido litocolico ad UDCA si ottiene in un unico stadio con *Fusarium equiseti* M41, un fungo isolato dal suolo [37]. Sono state ottimizzate le condizioni di reazione: cellule già cresciute di *Fusarium equiseti* M41 mostrano il massimo di conversione a 28°C e pH 8 con una quantità di ossigeno superiore al 60% della tensione normale e in presenza di cationi monovalenti come Na⁺, K⁺ e Rb⁺ che ne migliorano la conversione.

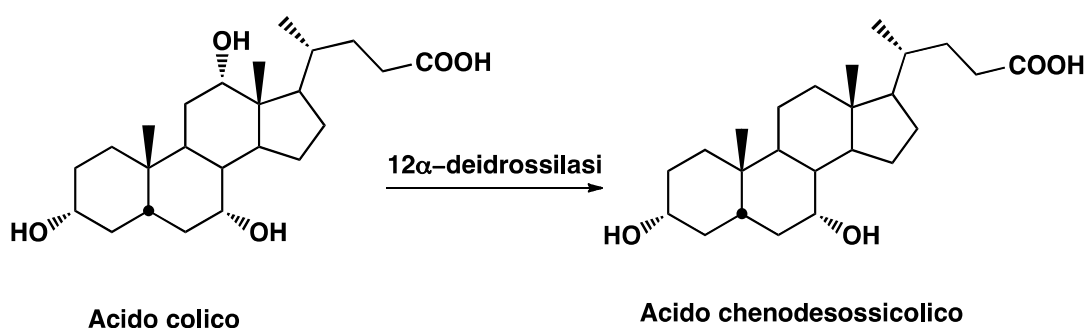
Anche *Absidia cerulea* e *Rhizoctonia solani* sono in grado di idrossilare l'acido litocolico in C-7: in questo caso si ottengono anche prodotti di idrossilazione in C-1 ed in C-6 [38].

Altro risultato è quello ottenuto con e *Gibberella zae* VKM F-2600, fungo filamentoso recentemente testato sull'acido litocolico, che ha dimostrato avere attività β-idrossilasica in posizione C-7. Tale biotrasformazione, effettuata utilizzando cellule intere, genera oltre ad UDCA anche altri prodotti di ossidazione dello stesso UDCA come il 3-cheto derivato [39].

Molti brevetti sono stati depositati riguardo la reazione di idrossilazione in C-7 in quanto direttamente collegata alla sintesi di questo principio attivo [40] [41] [42].

Deidrossilazione

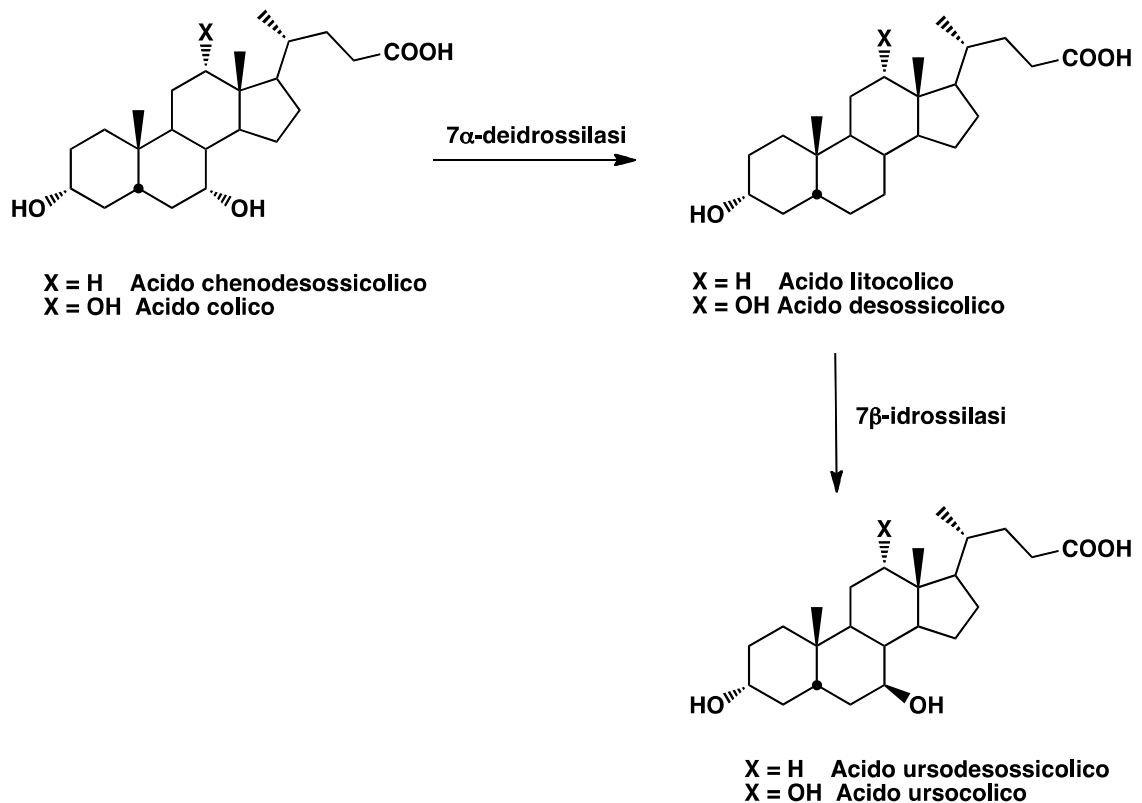
Altra reazione interessante è la deidrossilazione dei gruppi ossidrilici presenti sugli acidi biliari allo scopo di convertirli in “building blocks” per la sintesi di altri steroidi. Un esempio è rappresentato dalla C₁₂-deidrossilazione. Colture isolate di batteri fecali umani, tra questi numerosi ceppi saccarolitici di *Bacteroides*, sono stati impiegati nella deidrossilazione della posizione C-12 dell'acido colico [43] (Schema 11).



Schema 11

Data l'importanza di questa biotrasformazione vi sono diversi brevetti riguardanti questo argomento [44] [45].

Anche la 7 α -deidrossilazione degli acidi biliari primari (CA e CDCA), per produrre i corrispondenti acidi biliari secondari (acido desossicolico e acido litocolico), è considerata utile ad ottenere composti di partenza per la sintesi di altri steroidi. L'importanza di questa reazione è data dalla possibilità di ridurre il numero di passaggi nella sintesi di UCDA se viene accoppiata alla successiva 7 β -idrossilazione (Schema 12).

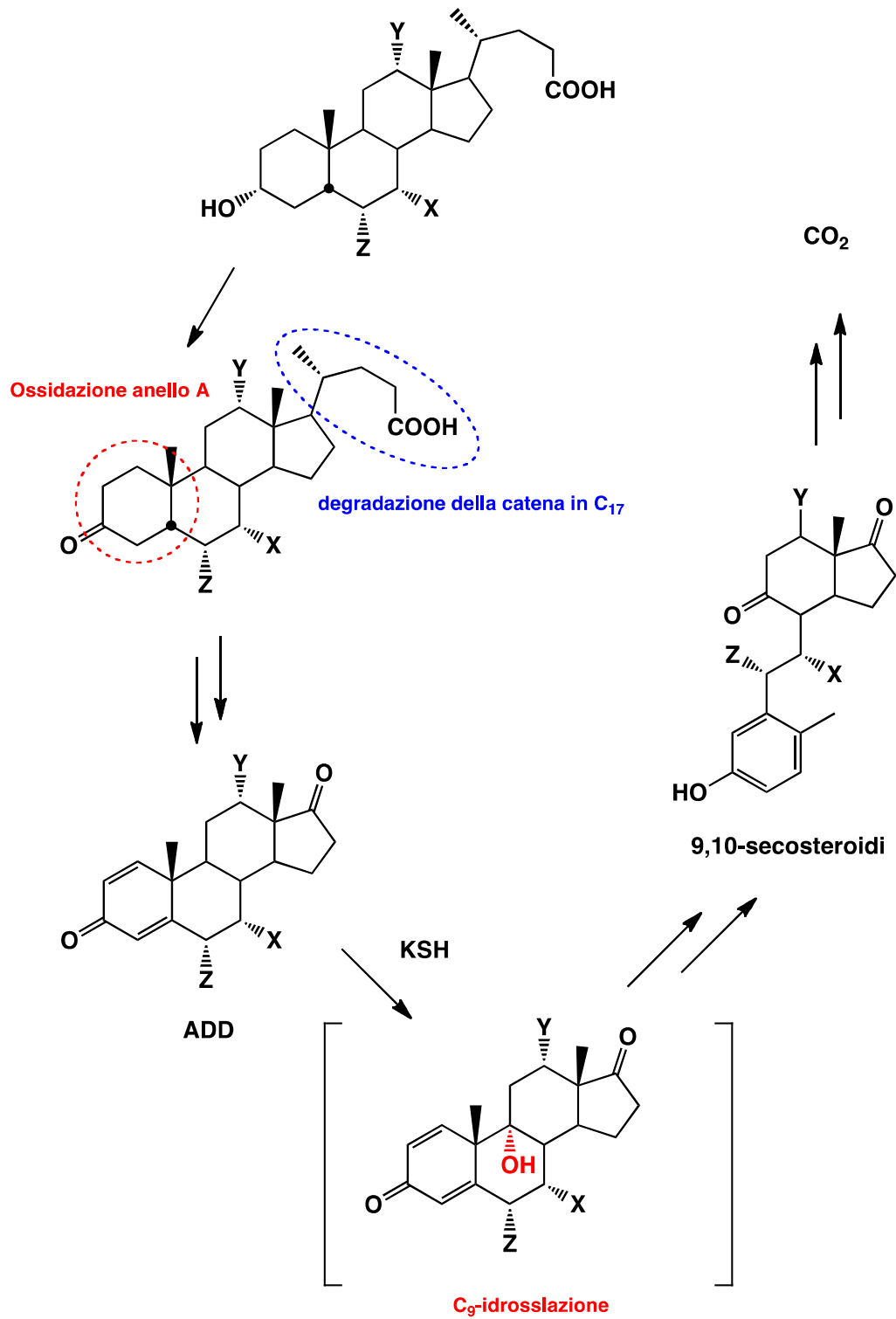


Schema 12

Screening riguardanti la capacità di rimuovere la funzione ossidrilica in C-7 dell'acido colico sono stati effettuati con colture pure di batteri isolati dalla flora intestinale dell'uomo. Solo pochi ceppi sono in grado di deidrossilare l'acido colico in C-7. Questa attività è stata osservata in particolare nei generi *Bacteroides*, *Veilonella*, *Clostridium* e in molti ceppi di *Streptococcus fecalis* e *Staphylococcus* [46].

Degradazione di acidi biliari

La degradazione aerobica degli acidi biliari è stata a fondo studiata negli anni '70 e '80. Questi studi sono mirati all'identificazione degli intermedi della degradazione steroidea estratti dalle colture batteriche cresciute in presenza di acidi biliari come fonte di carbonio. Sulla base delle strutture degli intermedi è stato proposto uno schema di degradazione [47] (Schema 13).



X = Y = OH; Z = H, acido colico
 X = Z = H; Y = OH, acido deossicolico
 X = OH; Y = Z = H, acido chenodesossicolico
 X = Y = H; Z = OH, acido idesosossicolico

Schema 13

Lo step iniziale di degradazione degli acidi biliari consiste nell'ossidazione del gruppo ossidrilico in posizione C-3. Questa reazione è catalizzata da 3 α -HSDH, enzima NAD(P) dipendente. Il passaggio successivo è la deidrogenazione dell'anello A ad opera di Δ -3-chetosteroidi deidrogenasi che porta a 3-cheto-1,4-diene derivati. Contemporaneamente o successivamente all'ossidazione dell'anello A, la catena laterale dallo scheletro steroideo viene rimossa mediante β -ossidazione. Questa reazione, a fondo studiata, causa il rilascio di gruppi acetilici e propionilici. Un prerequisito per la β -ossidazione della catena laterale è l'attivazione con coenzima A.

Gli analoghi dell'1,4-androstadiene-3,17-dione (ADD) vengono poi idrossilati in C₉ da 3-chetosteroidi-9 α -idrossilasi (KSH) e questo provoca la rottura del legame tra C₉-C₁₀, con conseguente apertura dell'anello B attraverso un riarrangiamento spontaneo retro-aldolico e aromatizzazione dell'anello A. I 9,10-secosteroidi, derivanti dall'apertura dell'anello, vengono degradati infine attraverso diversi steps a CO₂.

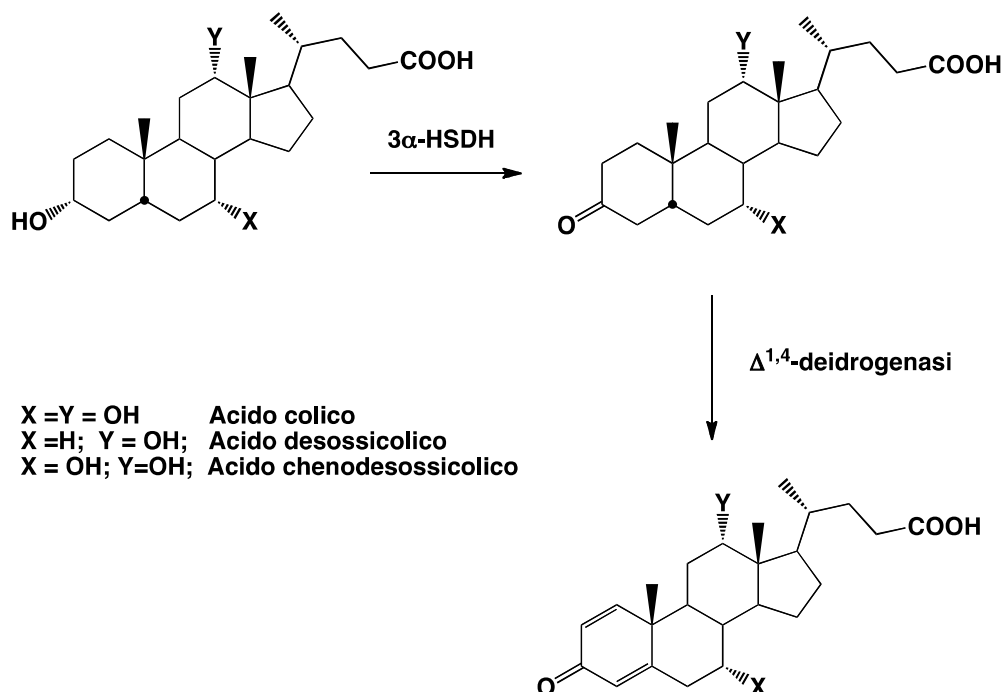
È stata riportata la completa degradazione aerobica di acidi biliari da varie classi di batteri inclusi *Actinobacteria*, *Betaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria*. Tra gli *Actinobacteria* sono noti operare questa reazione *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Streptomyces* [48]. Mentre per quanto riguarda i *Betaproteobacteria*, la degradazione degli steroidi è stata studiata intensivamente con diversi ceppi di *Comamonas testosteroni*. È nota anche la degradazione dei colati con *Pseudomonas haloplanktis*, battere psicrofilo marino [49]. Tra i *Gammaproteobacteria* vi sono numerosi report sulla degradazione di sali biliari ad opera di diverse specie di *Pseudomonas* [50] [51].

Nell'ambito della ricerca di microrganismi in grado di degradare gli acidi biliari e gli steroidi in genere, si identificano alcuni passaggi chiave quali la degradazione della catena laterale, le Δ ^{1,4}-deidrogenazioni e l'idrossilazione in C-9. Gli enzimi che catalizzano queste reazioni possono essere sfruttati per la sintesi di altri composti potenzialmente attivi.

Δ ^{1,4}-Deidrogenazioni

Molti degli studi sulle reazioni di ossidazione dell'anello A degli steroidi sono stati effettuati utilizzando il testosterone come substrato ma vi sono evidenze in letteratura che dimostrano che tale attività viene riscontrata anche sugli acidi biliari [52]. L'ossidazione

dell'ossidril in posizione C-3 è considerato il passaggio fondamentale per permettere poi le successive deidrogenazioni dei legami C₁-C₂ e C₃-C₄. Le deidrogenazioni a carico dell'anello A sono reazioni che vengono catalizzate da Δ -3-chetosteroidi deidrogenasi (Schema 14).



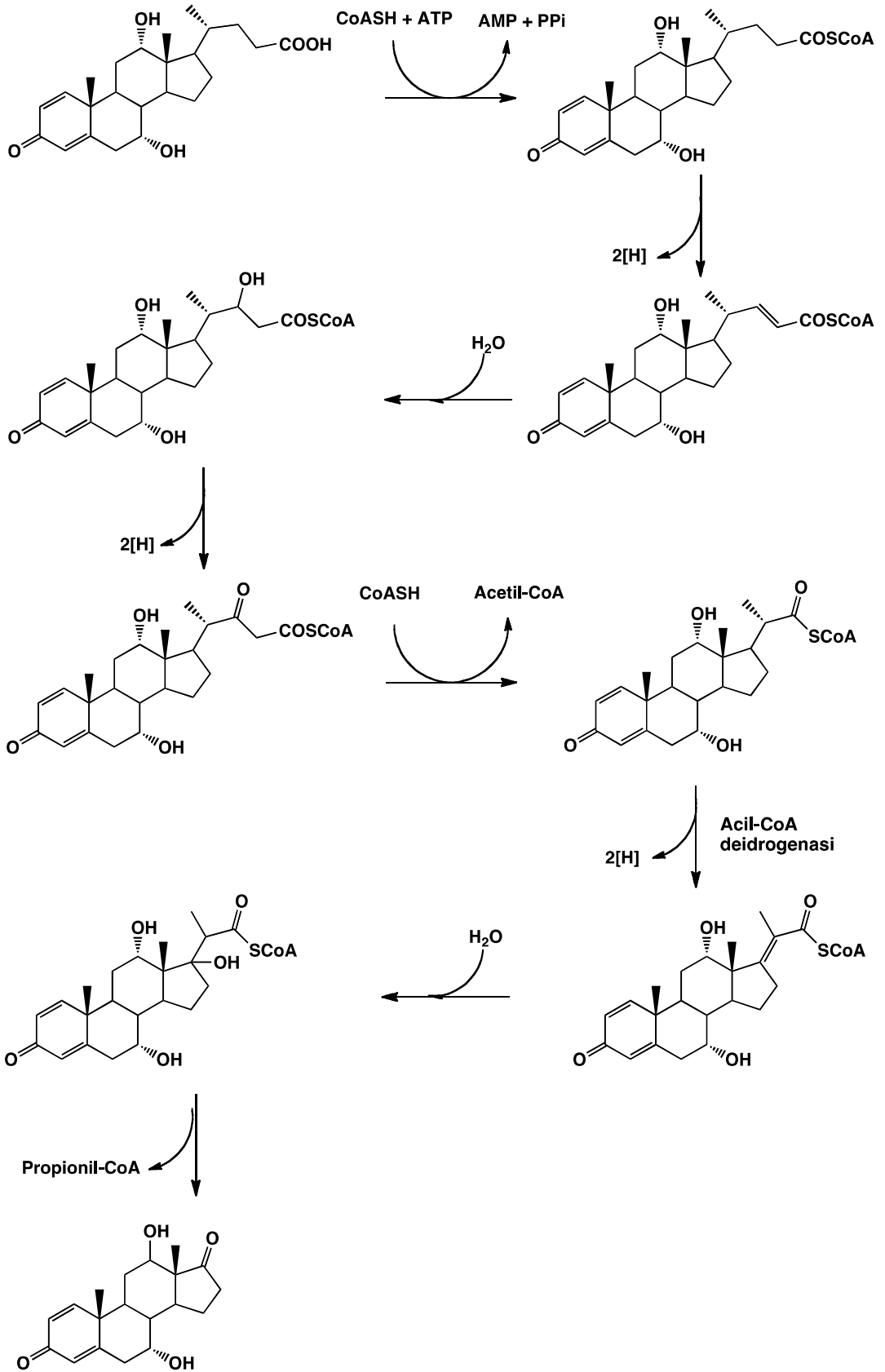
Schema 14

Questi enzimi sono stati isolati da *Rhodococcus erythropolis* SQ1, *Comamonas testosteroni* e *Rhodococcus rhodochrous* e sono stati caratterizzati come flavoproteine [53] [54].

I prodotti derivanti da queste biotrasformazioni sono la base di partenza per gli steroidi della serie 5 α per cui queste trasformazioni batteriche offrono un'ottima alternativa alla sintesi chimica per la produzione di farmaci steroidei.

Degradazione della catena laterale

La degradazione batterica della catena laterale steroidica è uno dei passaggi chiave nella via metabolica descritta in precedenza. Gli step del processo di degradazione della catena laterale degli acidi biliari passano attraverso una β -ossidazione che causa il rilascio di gruppi acetilici e propionilici. Nello Schema 15 viene riportato il meccanismo di degradazione della catena laterale proposto da B. Philipp per acido colico [52].



Schema 15

Un prerequisito per la β -ossidazione della catena laterale è l'attivazione del 3-cheto-1,4-diene derivato dell'acido colico con coenzima A [52]. Il colil-CoA, così formato, viene deidrogenato in C₂₂-C₂₃, il doppio legame viene idrolizzato con formazione del C₂₂-idrossi derivato e successivamente ossidato a chetone (β -ossidazione). Questo passaggio permette l'uscita del gruppo acetilico come acetil-CoA, portando ad una prima parziale degradazione della catena. La successiva C₁₇-C₁₈-deidrogenazione e l'aggiunta di acqua al doppio legame porta all'uscita di propionil-CoA con formazione del carbonile in C₁₇ ottenendo così 1,4-diene-3,17-dione derivato (analogo dell'androstadienedione ADD).

La formazione di colil-CoA oltre ad a CoA-esteri di cheto colato e $\Delta^{1,4}$ -3-chetocolato, è stata riscontrata in estratti di cellule di *Pseudomonas sp.* (ceppo Cho11). Tuttavia non è ancora chiaro se l'ossidazione dell'anello A preceda l'attivazione con CoA o se i CoA-esteri siano i substrati per le deidrogenazioni a carico dell'anello A.

In studi con diverse *Pseudomonas sp.* sulla degradazione di acido colico [55] sono stati isolati composti steroidici la cui struttura concorda con la degradazione della catena laterale acilica tramite β -ossidazione.

C₉-Idrossilazione

Nella via degradativa degli acidi biliari, gli analoghi di ADD sono soggetti a C₉-idrossilazione a livello dell'anello B. Tale reazione è catalizzata da 3-chetosteroido-9 α -idrossilasi. Questo enzima, isolato da *Mycobacterium tuberculosis* e *Rhodococcus rhodochrous*, è un'ossigenasi di tipo Rieske formata da due componenti [56] [57]. La componente reduttasica KshB sembra interagire con altre ossigenasi ed è inoltre coinvolta in vari processi cellulari. KshA invece è la componente ossigenasica specifica per ADD ed i suoi analoghi [58]. Ceppi di *Comamonas testosteroni* TA441 epimerizzano da α a β il gruppo idrossilico presente in posizione C-12 di acido colico [59] così come *Pseudomonas sp.* [55]. In questi ceppi l'epimerizzazione sembra facilitare la C₉-idrossilazione. Dato che non è noto se questa epimerizzazione avvenga in tutti i batteri che degradano gli acidi biliari, non viene riportata la stereochimica dell'ossidrile in posizione C-12 nello schema 14.

9,10-Secosteroidi

I 9,10-secosteroidi, così denominati in quanto derivanti dall'apertura in posizione 9,10 dell'anello B, sono molecole che, in molti casi, presentano attività biologica. La molecola più rappresentativa di questa classe di composti è la vitamina D, la cui funzione principale è quella di facilitare il deposito di calcio a livello osseo, oltre a regolare il metabolismo dello stesso ione calcio e del fosforo.

In letteratura vengono riportati lavori riguardanti l'attività biologica di 9,10-secosteroidi di origine marina. Queste molecole sono state isolate da gorgonie appartenenti ai generi *Astrogorgia*, *Calicogorgia* e *Muricella*. L'astrogorgiadiolo, (Figura 8), isolato da una gorgonia raccolta nell'isola di Okino-shima e appartenente al genere *Astrogorgia*, rappresenta il primo esempio di 9,10-secosteroidi ottenuto da un organismo marino.

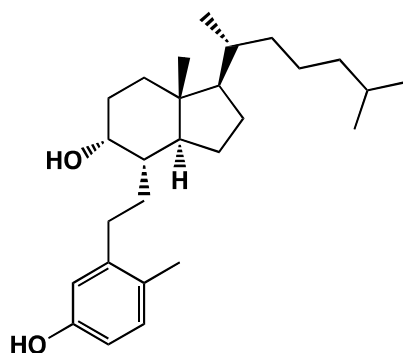


Figura 8. Astrogorgiadiolo

Astrogorgiadiolo è un analogo strutturale della vitamina D ed è stato dimostrato che è in grado di inibire la divisione cellulare di uova fertilizzate di stelle marine (*Asterina pectinifera*) alla concentrazione di 50 µg/ml [60].

Calicoferolo A e calicoferolo B (Figura 9) sono 9,10-secosteroidi molto simili ad astrogorgiadiolo e sono stati isolati da gorgonie appartenenti al genere *Calicogorgia*.

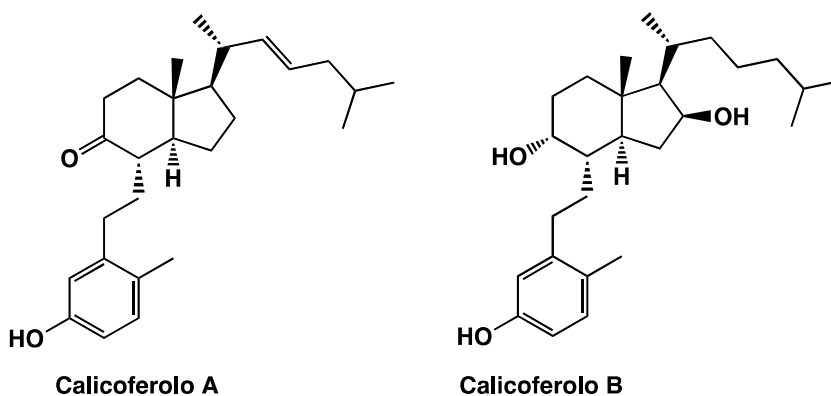


Figura 9

Queste molecole hanno una potente attività letale nei confronti di larve di gamberetti di acqua salata [61].

Un gruppo di altri sette secosteroidi (calicoferoli C-I) (Figura 10), isolati da gorgonie del genere *Muricella*, mostrano diverse attività biologiche. In particolare calicoferolo D presenta attività antivirale nei confronti di HSV I e II (EC_{50} 1.2 $\mu\text{g/ml}$) e polio virus (EC_{50} 0.4 $\mu\text{g/ml}$) [62].

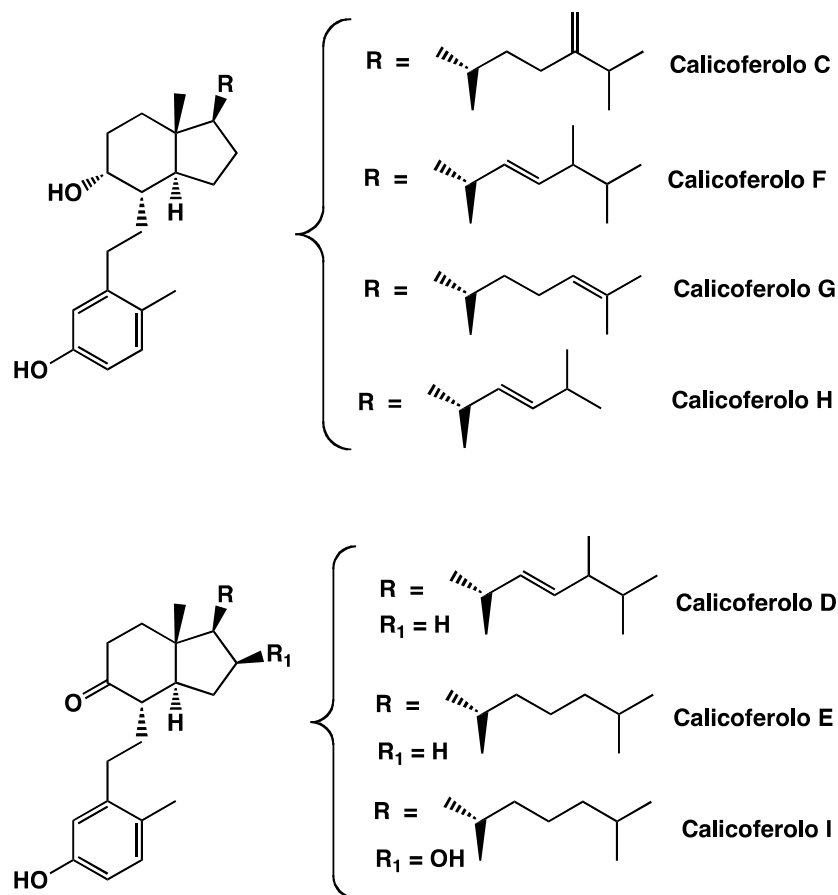


Figura 10

I calicoferoli F-I (Figura 10) mostrano attività citotossica contro la linea cellulare leucemica umana K-562 [63].

Alcuni di questi secosteroidi come ad esempio astrogorgiadiolo, presentano attività inibitoria nei confronti di diverse protein-chinasi [64].

La presenza del chetone in posizione C-9 aumenta drasticamente l'attività inibitoria rispetto al suo analogo avente un idrossile in tale posizione.

L'inibizione si esplica contro le seguenti proteine:

- ALK (anaplastic lymphoma kinase);
- AXL;
- FAK (focal adhesion kinase);
- IGF-1R (insulin-like growth factor receptor-1);
- VEGF-R2 (vascular endothelial growth factor- receptor-2);
- Famiglia delle chinasi SRC.

E' stata inoltre testata l'attività antivirale di estratti microbici di campioni marini. In tali estratti è stato dimostrato che sono presenti vari secosteroidi tra i quali anche 9,10-secosteroidi [65].

In particolare sono state valutate l'attività citotossica di estratti marini in cellule Vero (linea cellulare continua ottenuta da reni di *Cercopithecus aethiops*), l'attività antivirale contro HSV-1, vesicular stomatitis virus (VSV), vaccinia virus e polio virus-1, la capacità di combattere l'infezione virale (per inattivazione del virus o per inibizione dell'entrata del virus nella cellula) ed infine l'inibizione della replicazione virale.

Il gruppo di ricerca col quale ho lavorato durante i tre anni di dottorato è impegnato da molti anni nello studio delle biotrasformazioni di acidi biliari, con lo scopo di valorizzare i sottoprodotti industriali provenienti dalla lavorazione della bile.

Essendo gli acidi biliari ed i loro derivati considerati delle molecole assai interessanti, i lavori svolti dal gruppo di ricerca si sono incentrati sullo studio di microorganismi che, grazie al loro pool enzimatico, siano in grado di biotrasformare in modo selettivo le varie funzioni ossidriliche degli acidi biliari sfruttando la regio- ed enantioselettività degli enzimi. Tale interesse è anche dovuto al contratto di collaborazione tuttora esistente con l'azienda ICE di Reggio Emilia che lavora acidi biliari ed è il maggior produttore mondiale di UDCA.

Il lavoro oggetto di questa tesi, finanziato dall'azienda ICE, s'inserisce in questo progetto di ricerca e ha come target l'individuazione di batteri in grado di biotrasformare gli acidi biliari con lo scopo di inserirli nel ciclo produttivo di acido ursodesossicolico o di valorizzarli come building-blocks per la sintesi di altre molecole steroidiche.

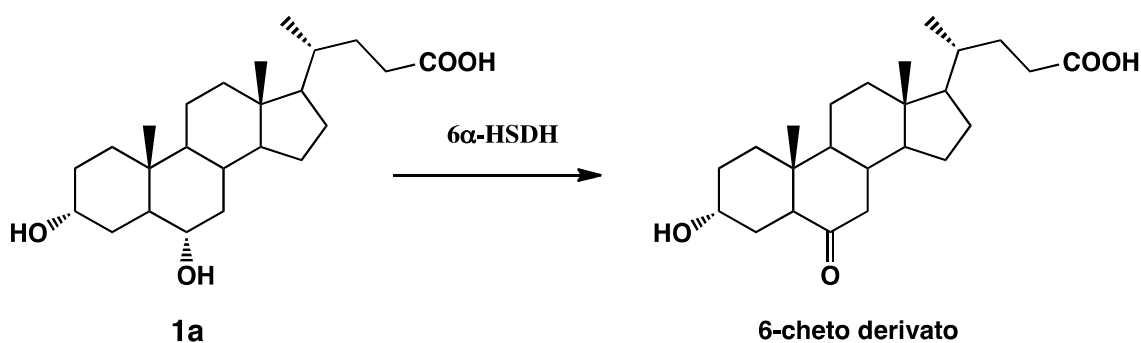
CAPITOLO 2

Biotrasformazioni di acidi biliari con *Rhodococcus* spp.

Questo lavoro di tesi è stato finanziato dalla ditta ICE srl di Reggio Emilia, azienda leader nella produzione di acido ursodesossicolico (UDCA), principio attivo per la calcolosi biliare, da acido colico e acido chenodesossicolico presenti, rispettivamente, nella bile bovina e suina.

In questo lavoro di tesi lo scopo principale, che ha orientato la ricerca in questi anni, è stato testare ceppi microbici di varia provenienza in grado di effettuare, grazie al loro pool enzimatico, reazioni a carico di acidi biliari che portino al recupero di prodotti di scarto della lavorazione della bile.

Un primo prodotto di “scarto” è l’acido iodesossicolico **1a**, il principale componente (40% in peso) della bile suina. Lo scopo della ricerca è quello di utilizzare anche questa molecola per la sintesi di UDCA. Per fare questo uno dei passaggi fondamentali è l’ossidazione selettiva dell’ossidrile in posizione C-6 (Schema 1) e quindi sono stati testati vari ceppi microbici alla ricerca di 6 α -idrossisteroide deidrogenasi (6 α -HSDH).

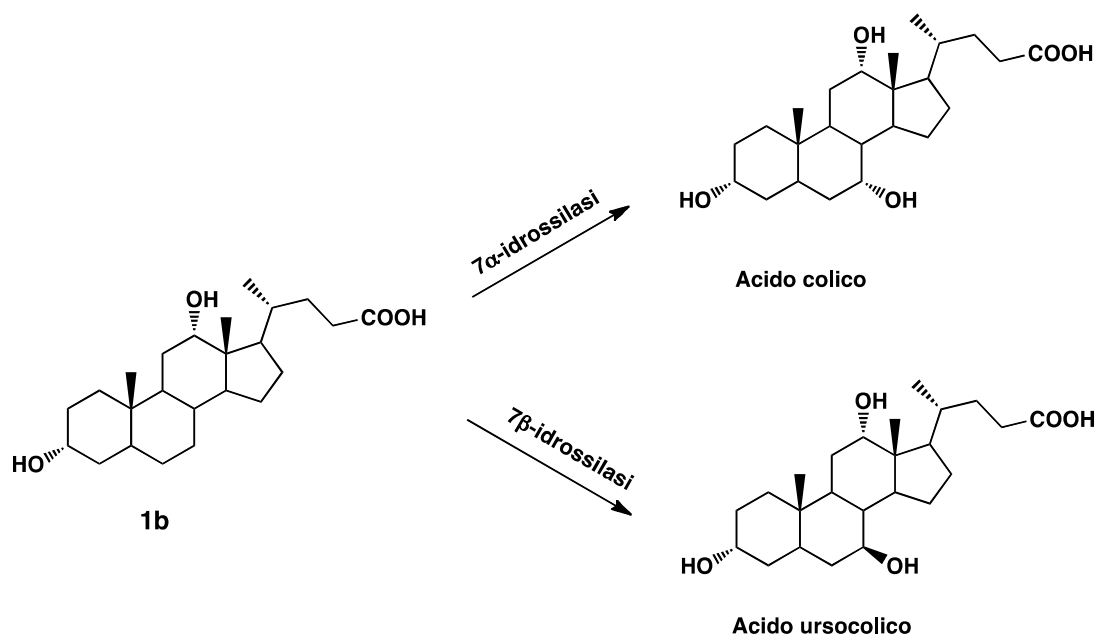


Schema 1

Il secondo substrato che è stato oggetto di ricerca in questo screening microbico è l’acido desossicolico **1b**, prodotto di “scarto” (20% in peso) della lavorazione della bile bovina. Anche in questo caso si è cercato di introdurre questo acido biliare nel ciclo produttivo di UDCA ricercando microrganismi in grado di idrossilare la posizione C-7 di tale molecola (Schema 2).

Avere microrganismi in grado di effettuare queste reazioni (C-7 idrossilazione e C-6 ossidazione) permetterebbe di utilizzare questi substrati nel ciclo produttivo ottenendo rese più alte in principio attivo partendo dalla stessa quantità di bile essiccata con conseguente abbattimento dell’impatto ambientale. Oltre a questo obiettivo primario, l’utilizzo di queste

molecole come substrati di biotrasformazioni potrebbe portare a prodotti diversi potenzialmente utilizzabili in altri campi commerciali.



Schema 2

Inizialmente il mio lavoro ha riguardato la scelta dei microrganismi da testare sulla base delle diverse caratteristiche tassonomiche e procedere allo screening. Sono state fatte biotrasformazioni preliminari su scala analitica su una vasta gamma di batteri presenti in collezione o selezionati in luoghi opportuni e da tale lavoro è emerso che alcuni ceppi appartenenti al genere *Rhodococcus* sono particolarmente attivi nei confronti di acidi biliari e di steroidi in genere come anche dimostrato nei numerosi articoli riportati in letteratura [66] [67].

Il genere *Rhodococcus*, appartenente alla famiglia degli Actinomiceti, [68] è formato da 15 specie. I Rhodococchi sono batteri gram-positivi, aerobi obbligati, non mobili e non sporulanti che si trovano solitamente nel suolo e in ambienti acquatici e sono considerati molto importanti in quanto utilizzabili a livello industriale. Diversi studi hanno dimostrato come i ceppi appartenenti a questo genere siano in grado di crescere sia in condizioni mesofile [69] sia in condizioni psicrofile [70].

Sono in grado di degradare un gran numero di composti organici, incluse molecole altamente tossiche e difficili da smaltire. La versatilità del genere *Rhodococcus* nella

degradazione di un ampio numero di molecole è dovuta alla capacità di acquisire una gamma diversificata di geni catabolici e alla fisiologia cellulare.

Rhodococcus sembra aver adottato una strategia di ipericombinazione [71] associata al suo vasto genoma. In particolare, i ceppi di *Rhodococcus* ospitano grandi plasmidi lineari che contribuiscono alla loro diversità catabolica agendo come “mass storage” per un gran numero di geni catabolici. In letteratura sono sempre di più i lavori che dimostrano la presenza di percorsi multipli e geni omologhi i quali aumentano ulteriormente la versatilità catabolica e l'efficienza di *Rhodococcus* [72].

I ceppi di *Rhodococcus* sono dotati di enzimi che catalizzano reazioni biologicamente rilevanti quali la biodesulfurizzazione di combustibili fossili, [73] la degradazione di policlorobifenili (PCB) [74] e l'utilizzo di una grande varietà di altri composti organici come fonti di energia [69]. Sono in grado di degradare idrocarburi alogenati, [75] a catena lunga o corta, inoltre metabolizzano numerosi composti aromatici ed eteroaromatici alogenati e diversamente sostituiti. [71].

Rhodococcus, viene molto utilizzato a livello commerciale come biocatalizzatore per la degradazione di combustibili fossili, [76] di steroidi bioattivi [72] e di acrilamide [77]. La produzione di diossigenasi da *Rhodococcus* per la degradazione dei PCBs [78] è diventata sempre più importante per i ricercatori in quanto step iniziale della degradazione di composti biologicamente tossici. La versatilità del genere *Rhodococcus* inoltre, può essere sfruttata in bioremediation in quanto potenziali decontaminanti di terreni inquinati e corsi d'acqua.

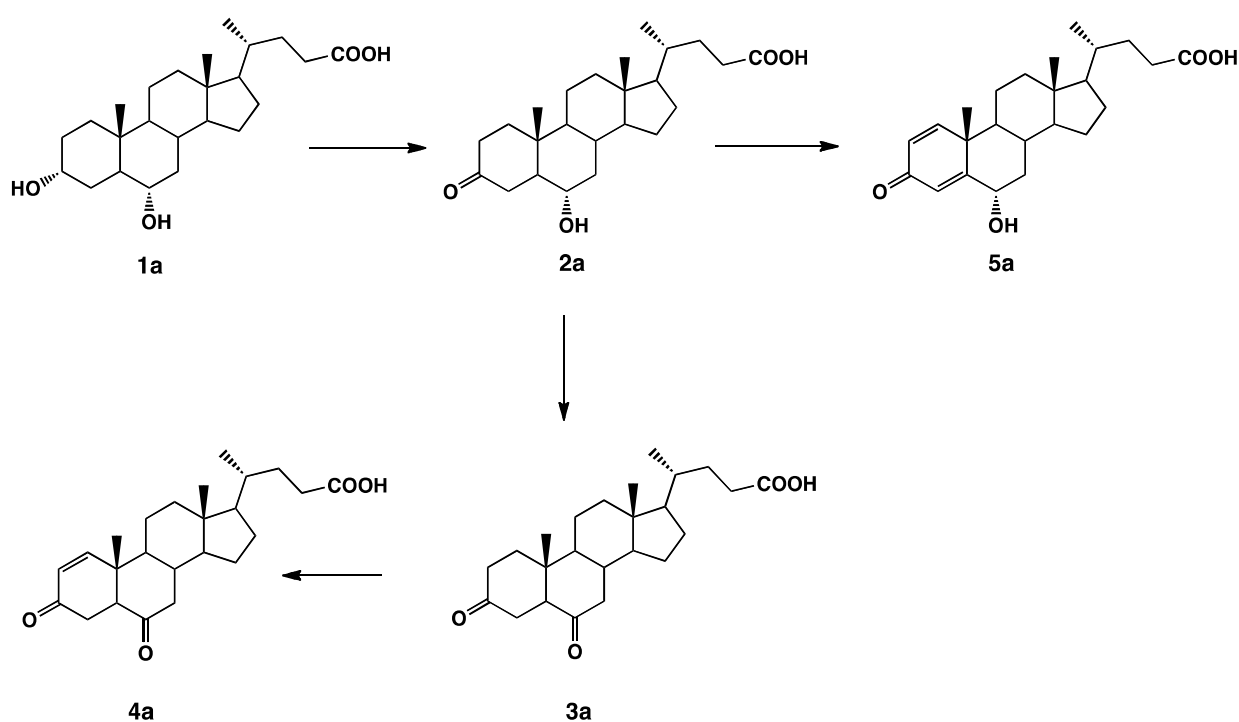
In questo lavoro di tesi sono stati utilizzati alcuni ceppi appartenenti a questo genere (*i.e.* *R. zopfii*, *R. baikonurensis*, *R. globerulus*, *R. atherovorans*, *R. coprophilus*, *R. sp.*, *R. sp. R312*, *R. ruber*, *R. rhodnii*, *R. rodochrous*, *R. equi*, *R. erythropolis*, *R. fasciens*, *R. opacus*, *R. rhodococcus*) e sono stati sottoposti ad uno screening iniziale per verificare la loro capacità biotrasformativa nei confronti di acido iodesossicolico **1a** e acido desossicolico **1b**.

La procedura utilizzata per le biotrasformazioni su scala analitica prevede l'inoculo dei batteri in 10 ml di terreno liquido PCB. Le colture vengono tenute in agitazione a temperatura controllata (30 °C) per 48 ore per permetterne la crescita e successivamente viene addizionato il substrato come sale sodico sciolto in acqua in concentrazione di 1 g/l. L'incubazione continua nelle stesse condizioni e le biotrasformazioni vengono monitorate

per TLC. Le biotrasformazioni risultate positive vengono ripetute su scala preparativa, i prodotti di reazione vengono poi estratti, purificati mediante cromatografia su colonna e caratterizzati mediante spettroscopia $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{CNMR}$ ed in alcuni casi con spettrometria di massa (ESI-MS).

In questo capitolo vengono riportate le biotrasformazioni che hanno dato prodotti noti in letteratura mentre le biotrasformazioni che hanno fornito molecole nuove verranno discusse nei capitoli successivi.

I prodotti ottenuti per biotrasformazione dell'acido iodesossicolico **1a** possono essere riassunti nello Schema 3 e le rese relative sono riportate in Tabella 1.



Schema 3

Tabella 1. Biotrasformazioni dell'acido iodesossicolico **1a**

Microrganismi	Tempo (h)	Prodotti			
		2a	3a	4a	5a
<i>Rhodococcus globerulus</i>	48	33%	34%		28%
<i>Rhodococcus sp. R312</i>	120			40%	36%
<i>Rhodococcus sp.</i>	48				20%

<i>Rhodococcus baikonurensis</i>		degradazione
<i>Rhodococcus rodochrous</i>		degradazione

Rh. globerulus produce il 3-cheto derivato **2a** (33%) per ossidazione dell'ossidrilico in C-3. Insieme a questo prodotto si ottiene il 3,6-dicheto derivato **3a** (34%) per ossidazione in C-6 e il 3-cheto-1,4-diene derivato **5a** (28%) per deidrogenazione in posizione C₁-C₂ e C₄-C₅. Con *Rhodococcus sp.* R 312 invece sono stati isolati, con rese molto simili, il 3,6-dicheto-1-ene derivato **4a** (40%) e il 3-cheto,1,4-diene derivato **5a** (36%) con un percorso analogo a *Rh. globerulus*. Unico prodotto di biotrasformazione con *Rhodococcus sp.* è infine il prodotto **5a** con resa del 20%. In nessun caso i prodotti ottenuti mostrano degradazione della catena laterale presente in posizione C-17.

Rh. baikonurensis e *Rh. rodochrous* degradano completamente il substrato senza fornire prodotti di biotrasformazione

Rh. erythropolis ha fornito in 24 h di biotrasformazione un prodotto, non riportato nella tabella precedente, in quanto si tratta di un nuovo metabolita (acido 3,4,9 β -triidrossi-6 β ,9 α -epossi-9,10-seco-23,24-dinorcolan-1,3,5(10)-triene-22-oico, resa 20%, descritto nel Capitolo 3) la cui caratterizzazione viene riportata nel Capitolo 3 dove verranno discussi i risultati delle biotrasformazioni condotte con *Rh. zopfii*, *Rh. aetherovorans* e *Rh. ruber*.

Infine i ceppi *Rh. coprophilus*, *Rh. rhodnii*, *Rh. equi*, *Rh. opacus*, *Rh. fasciens* e *Rh. rhodococcus* non sono stati in grado di biotrasformare, anche dopo 144 h, l'acido iodesossicolico **1a** che totalmente viene recuperato.

Nello Schema 4 e in Tabella 2 vengono riportati i prodotti ottenuti per biotrasformazione con i ceppi di *Rhodococcus* dell'acido desossicolico **1b**.

Analogamente a quanto descritto per **1a**, le biotrasformazioni dell'acido desossicolico **1b** con *Rhodococcus globerulus* danno prodotti derivanti da ossidazioni selettive di diverse posizioni del nucleo steroideo. In particolare si ottengono il 12-cheto derivato **6b** (16%) e il 3,12-dicheto derivato **7b** (64%) (Schema 4). Seguendo una via analoga alla precedente, *Rhodococcus coprophilus* e *Rhodococcus sp.* forniscono il 3-cheto-4-ene derivato **8b** con rese rispettivamente del 72% e 45%. Il composto **8b** deriva dal prodotto ossidato in C-3 che non è presente nella miscela di reazione.

Anche in questo caso alcuni ceppi (i.e. *Rh. rhodococcus*, *Rh. zopfii*, *Rh. erythropolis* e *Rh. Rhodochrous*) degradano completamente il substrato senza fornire prodotti di biotrasformazione quantificabili.

Schema 4

Tabella 2. Biotrasformazioni dell'acido desossicolico **1b**

Microrganismi	Tempo (h)	Prodotti		
		6b	7b	8b
<i>Rhodococcus globerulus</i>	48	16%	64%	
<i>Rhodococcus coprophilus</i>	72			72%
<i>Rhodococcus sp.</i>	144			45%
<i>Rhodococcus rhodococcus</i>	24	degradazione		
<i>Rhodococcus zopfii</i>	24	degradazione		
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	24	degradazione		
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	24	degradazione		

Il ceppo *Rh. ruber* genera un nuovo prodotto (acido 3,12 α -diidrossi-9-cheto-9,10-seco-23,24-dinorcolan-1,3,5(10)-triene-22-oico) che verrà discusso nel dettaglio nel capitolo 4, lo stesso prodotto viene generato anche nelle biotrasformazioni con *Rh aetherovorans* (40%) *Rh. baikonurensis* (56%).

Infine i ceppi *Rh. sp.*, *Rh sp. R312*, *Rh. equi*, *Rh. fasciens* e *Rh. opacus* non hanno dato nessun prodotto di biotrasformazione.

Parte sperimentale

Biotrasformazioni di **1a** e **1b** su scala analitica.

Procedura generale

I batteri del genere *Rhodococcus*, conservati a 4°C in slant su Plate Count Agar (PCA), composto da triptone (5 g/l), estratto di lievito (2.5 g/l), glucosio (1 g/l) ed agar (15 g/l), sono stati trasferiti sotto cappa a flusso laminare in beute da 50 ml contenenti 10 ml di Plate Count Broth (PCB), composto da triptone (5 g/l), estratto di lievito (2.5 g/l), glucosio (1 g/l), sterilizzato in autoclave a 121°C per 15 minuti. Le colture liquide vengono incubate a 30 °C per 48h, sotto agitazione a 110 rpm. Dopo 48 h di crescita, si aggiunge il substrato come sale sodico alla concentrazione di 1g/l (0.2 ml di una soluzione preparata sciogliendo 50 mg in un ml di acqua distillata). Le biotrasformazioni mantenute a 30°C, vengono seguite per TLC a 24 e 48 ore; si prelevano 0.4 ml di miscela di reazione, si acidifica con 0.4 ml di HCl 1M e si estrae con 0.4 ml di etile acetato. Per l'acido iodesossicolico **1a** si utilizza come eluente una miscela di etile acetato ed acido acetico (50:1), mentre per l'acido desossicolico **1b** una miscela di etile acetato, cicloesano ed acido acetico (70:30:2). Per rivelare gli acidi biliari e i loro prodotti viene utilizzata una soluzione nebulizzata costituita da acido fosfomolibdico (H₃Mo₁₂O₄₀P), acido solforico ed acetico in proporzioni 2.5:2.5:5 e le piastrine vengono riscaldate (circa 120°C) allo scopo di rendere visibili i prodotti.

Nella Figura 1 vengono riportati esempi di lastre cromatografiche relative ad alcune biotrasformazioni condotte rispettivamente con acido iodesossicolico **1a** e desossicolico **1b**.

Figura 1.

I risultati dello screening vengono riportati in Tabella 3.

Tabella 3. Screening biotrasformativo di ceppi di *Rhodococcus* con YDCA **1a** e DCA **1b**

ceppo	1a	1b
-------	----	----

<i>Rh. zopfii</i>	si	degradazione
<i>Rh. baikonurensis</i>	degradazione	si
<i>Rh. globerulus</i>	si	si
<i>Rh. aetherovorans</i>	si	si
<i>Rh. coprophilus</i>	no	si
<i>Rh. sp.</i>	si	si
<i>Rh. sp. R312</i>	si	no
<i>Rh. ruber</i>	si	si
<i>Rh. rhodnii</i>	no	no
<i>Rh. rhodochrous</i>	degradazione	degradazione
<i>Rh. equi</i>	no	no
<i>Rh. erythropolis</i>	si	degradazione
<i>Rh. fasciens</i>	no	no
<i>Rh. opacus</i>	no	no
<i>Rh. rhodococcus</i>	no	degradazione

Biotrasformazioni di 1a e 1b su scala preparativa.

Procedura generale

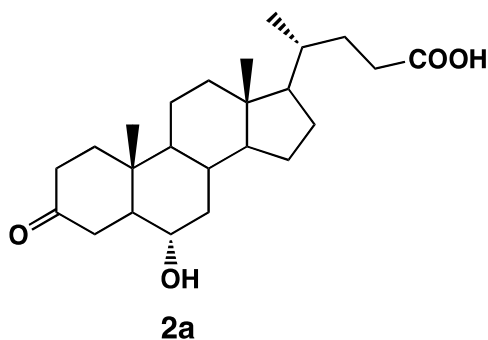
In una beuta da 50 ml contenente 10 ml di terreno fresco PCB viene inoculato il ceppo di *Rhodococcus* selezionato e fatto crescere per 24 h a 30°C sotto agitazione a 110 rpm. Questo pre-inoculo viene aggiunto in una beuta da 500 ml contenente 200 ml di terreno PCB fresco. Dopo 72 h di crescita si aggiunge il sale sodico dell'acido biliare (200 mg). L'andamento della biotrasformazione è stato seguito per TLC con prelievi giornalieri. A fine biotrasformazione le colture sono state centrifugate per eliminare le cellule. Il surnatante è stato acidificato con HCl 37% fino a pH 2-3 ed estratto con etile acetato (3 x 200 ml). Le fasi organiche riunite sono state anidificate con l'aggiunta di sodio solfato anidro, successivamente rimosso per filtrazione.

Dopo evaporazione del solvente, i prodotti sono stati cromatografati su colonna di gel di silice per purificare i prodotti di reazione (gli eluenti vengono riportati nelle singole preparative).

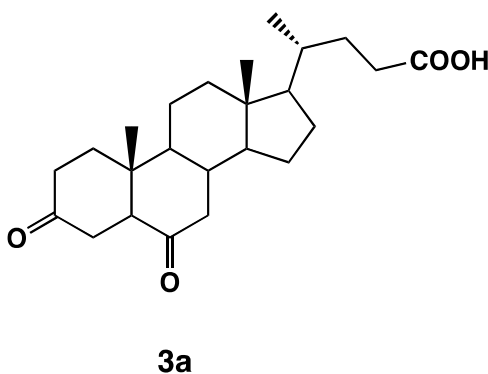
Biotrasformazione di acido iodesossicolico **1a** con *Rhodococcus globerulus*

Si lavora come da procedura generale partendo da 200 mg di acido iodesossicolico **1a**. Dopo 48 h, la cromatografia della miscela di reazione su colonna di gel di silice (eluente *n*-esano/etile acetato/acido acetico 50:50:2) ha fornito il 3-cheto derivato **2a** (65 mg, 33%), il 3,6-dicheto derivato **3a** (67 mg, 34%) e il 3-cheto-1,4-diene derivato **5a** (55 mg, 28%).

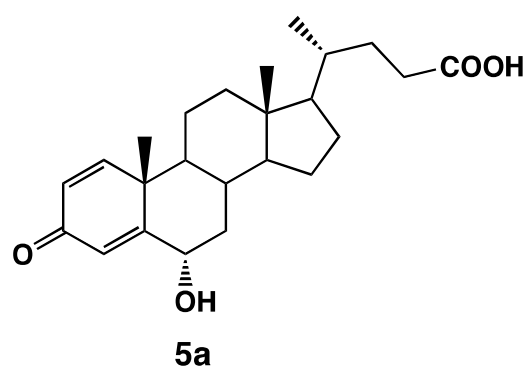
L'acido 3-cheto-6 α -idrossi-5 β -colan-24-oico **2a** mostra le seguenti caratteristiche spettroscopiche: ¹H-NMR (CDCl₃) segnali selezionati: δ 0.7 (s, 3H CH₃-18), 0.9 (d, 3H, J = 7Hz CH₃-21), 1.0 (s, 3H CH₃-19), 4.2 (m, 1H, H-6). [30]

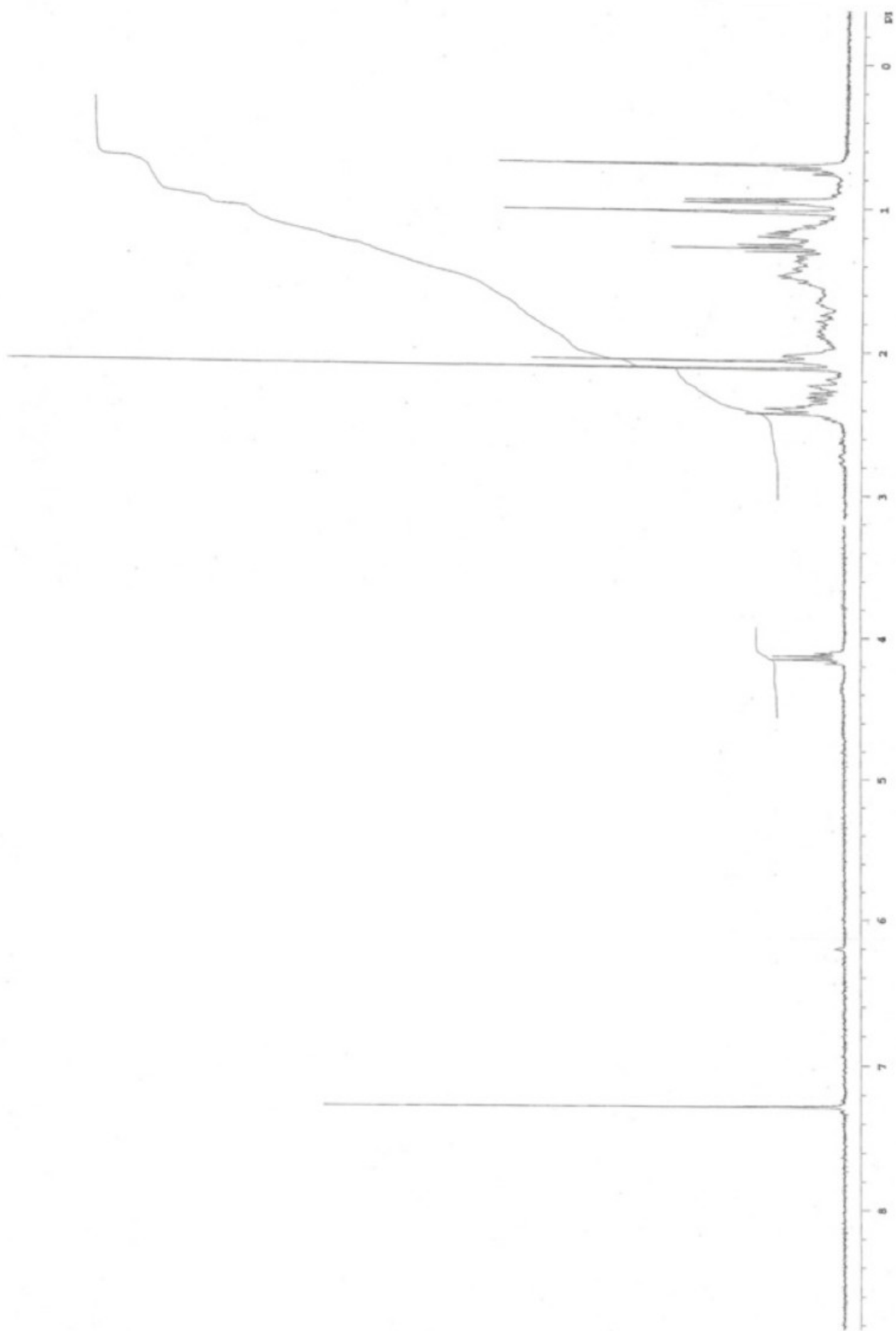


L'acido 3,6-dicheto-5 β -colan-24-oico **3a** mostra le seguenti caratteristiche spettroscopiche: ¹H-NMR (CDCl₃) segnali selezionati: δ 0.7 (s, 3H CH₃-18), 1.0 (s, 3H CH₃-19) (d, 3H CH₃-21). [79]

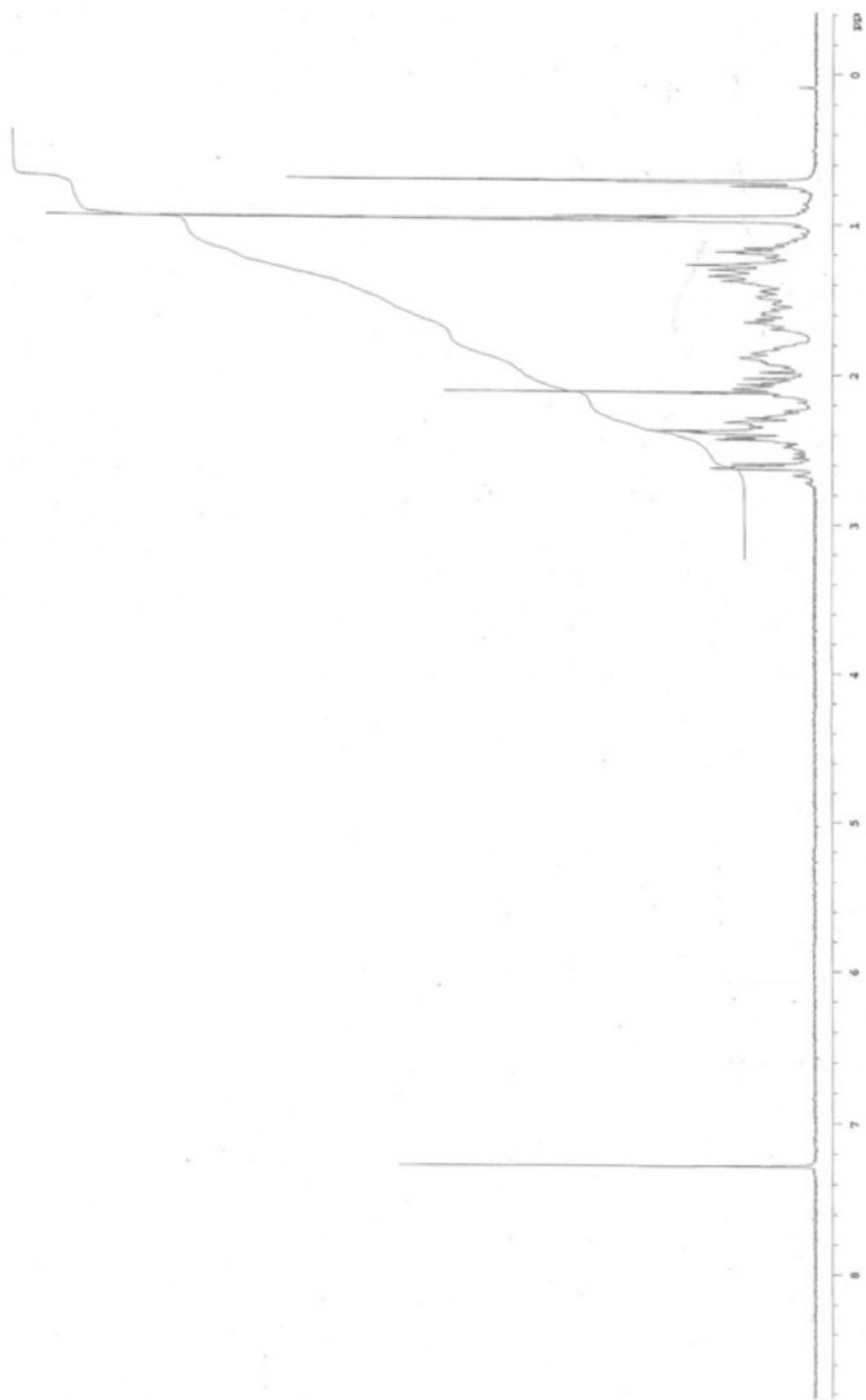


L'acido 6 α -idrossi-3-osso-colan-1,4-dien-24-oico **5a** mostra le seguenti caratteristiche spettroscopiche: ¹H-NMR (CDCl₃) segnali selezionati: δ 0.8 (s, 3H CH₃-18), 1.2 (d, 3H, J = 7Hz CH₃-21), 1.3 (s, 3H CH₃-19), 4.5 (ddd, 1H, J = 10.7 e 1Hz, H-6), 6.2 (dd, 1H, J = 10 e 1 Hz, H-2), 6.4 (s, 1H, H-4), 7.2 (d, 1H, J = 10Hz, H-1). [80]

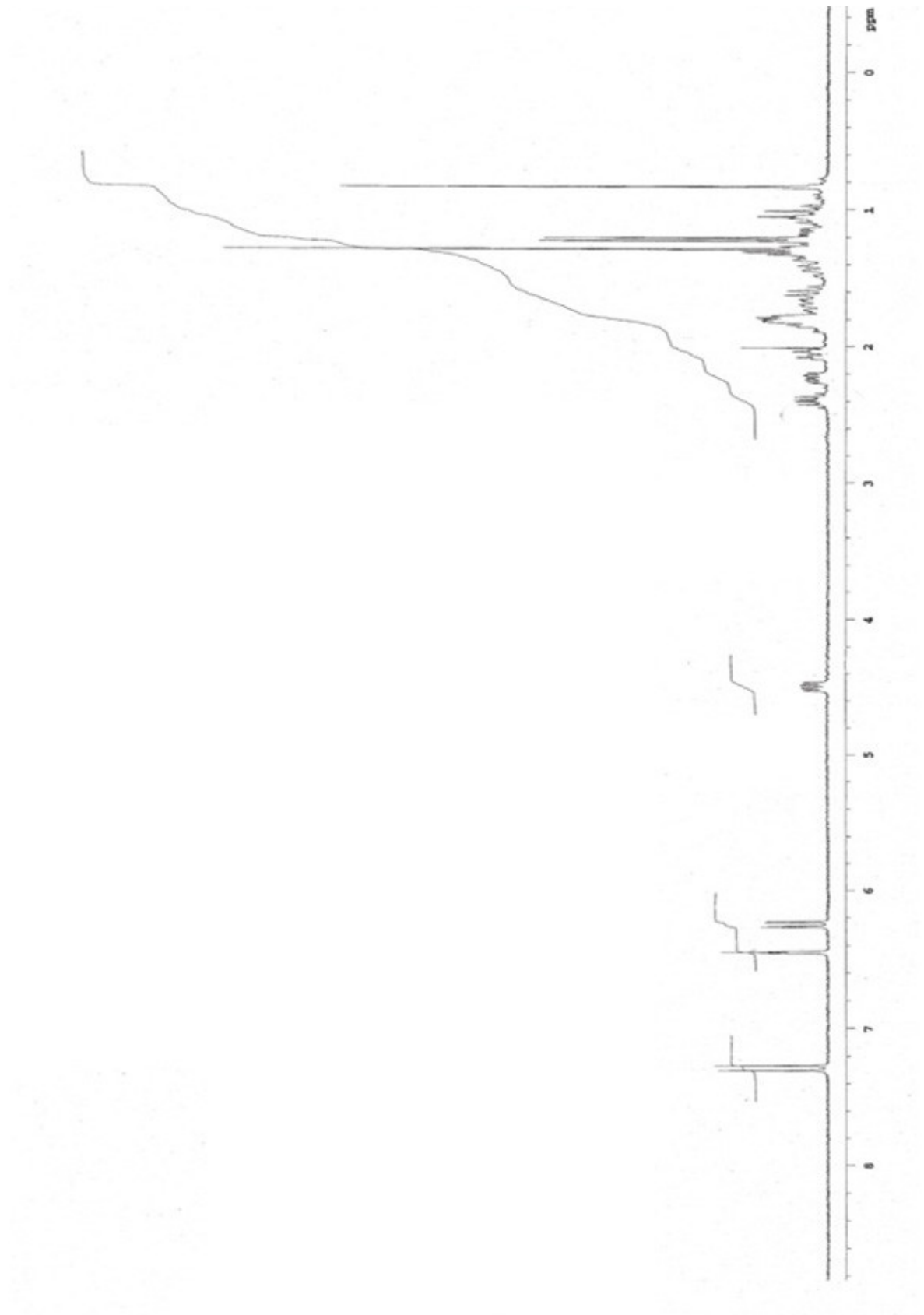




^1H NMR di acido 3-cheto-6 α -idrossi-5 β -colan-24-oico **2a**



^1H NMR di acido 3,6-dicheto-5 β -colan-24-oico **3a**

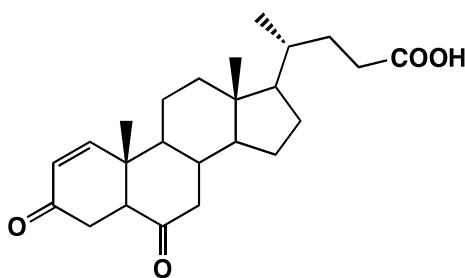


^1H NMR di acido 6α -idrossi-3-osso-colan-1,4-dien-24-oico **5a**

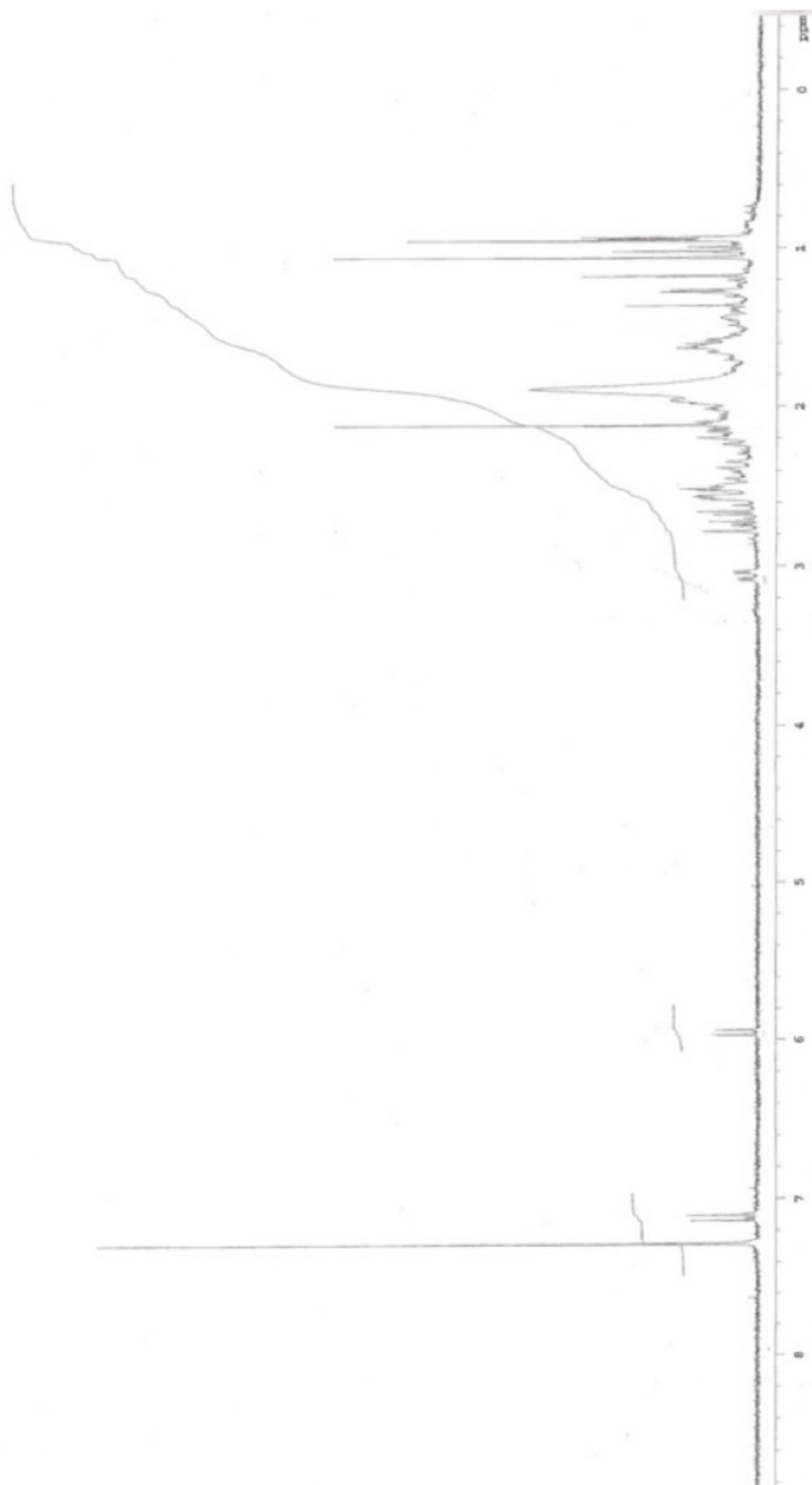
Biotrasformazione di acido iodesossicolico **1a** con *Rhodococcus* sp. R312

Si lavora come da procedura generale partendo da 200 mg di acido iodesossicolico **1a**. Dopo 120 h, la cromatografia della miscela di reazione su colonna di gel di silice (eluente *n*-esano/etile acetato/acido acetico 50:50:2), ha fornito il 3-cheto-1,4-diene **5a** (71 mg, 36%) e il 3,6-dicheto-1-ene **4a** (79 mg, 40%).

L'acido 3,6-dicheto-colan-1-ene-24-oico **4a** mostra le seguenti caratteristiche spettroscopiche: ¹H-NMR (CDCl₃) segnali selezionati, δ , 1.0 (s, 3H, CH₃-19) (d, 3H, CH₃-21), 1.1 (s, 3H, CH₃-18), 6.0 (dd, 1H, J = 10 e 1Hz, H-2), 7.1 (d, 1H, J = 10Hz, H-1).



4a



^1H NMR di acido 3,6-dicheto-colan-1-ene-24-oico **4a**

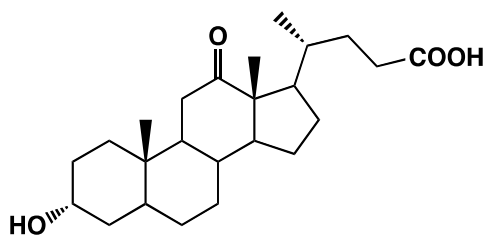
Biotrasformazione di acido iodesossicolico **1a con *Rhodococcus* sp.**

Si lavora come da procedura generale partendo da 200 mg di acido iodesossicolico **1a**. Dopo 48 h, la cromatografia della miscela di reazione su colonna di gel di silice, utilizzando come eluente *n*-esano/etile acetato/acido acetico 50:50:2, ha fornito come unico prodotto di reazione il 3-cheto-1,4-diene **5a** (40 mg, 20%).

Biotrasformazione di acido desossicolico **1b** con *Rhodococcus globerulus*

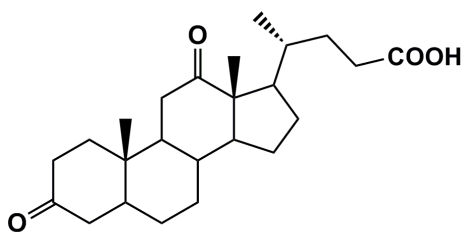
Si lavora come da procedura generale partendo da 200 mg di acido desossicolico **1b**. Dopo 24 h, la cromatografia della miscela di reazione su colonna di gel di silice (eluente *n*-esano/etile acetato/acido acetico 60:40:1) ha fornito il 12-cheto derivato **6b** (32 mg, 16%) e il 3,12-dicheto derivato **7b** (126 mg, 64%).

L'acido 3-idrossi-12-dicheto-5 β -colan-24-oico **6b** mostra le seguenti caratteristiche spettroscopiche: ¹H-NMR (CDCl₃) picchi selezionati: δ 0.8 (d, 3H, CH₃-21), 1.0 (s, 3H, CH₃-18) (s, 3H, CH₃-19), 3.6 (m, 1H, H-3). [81]

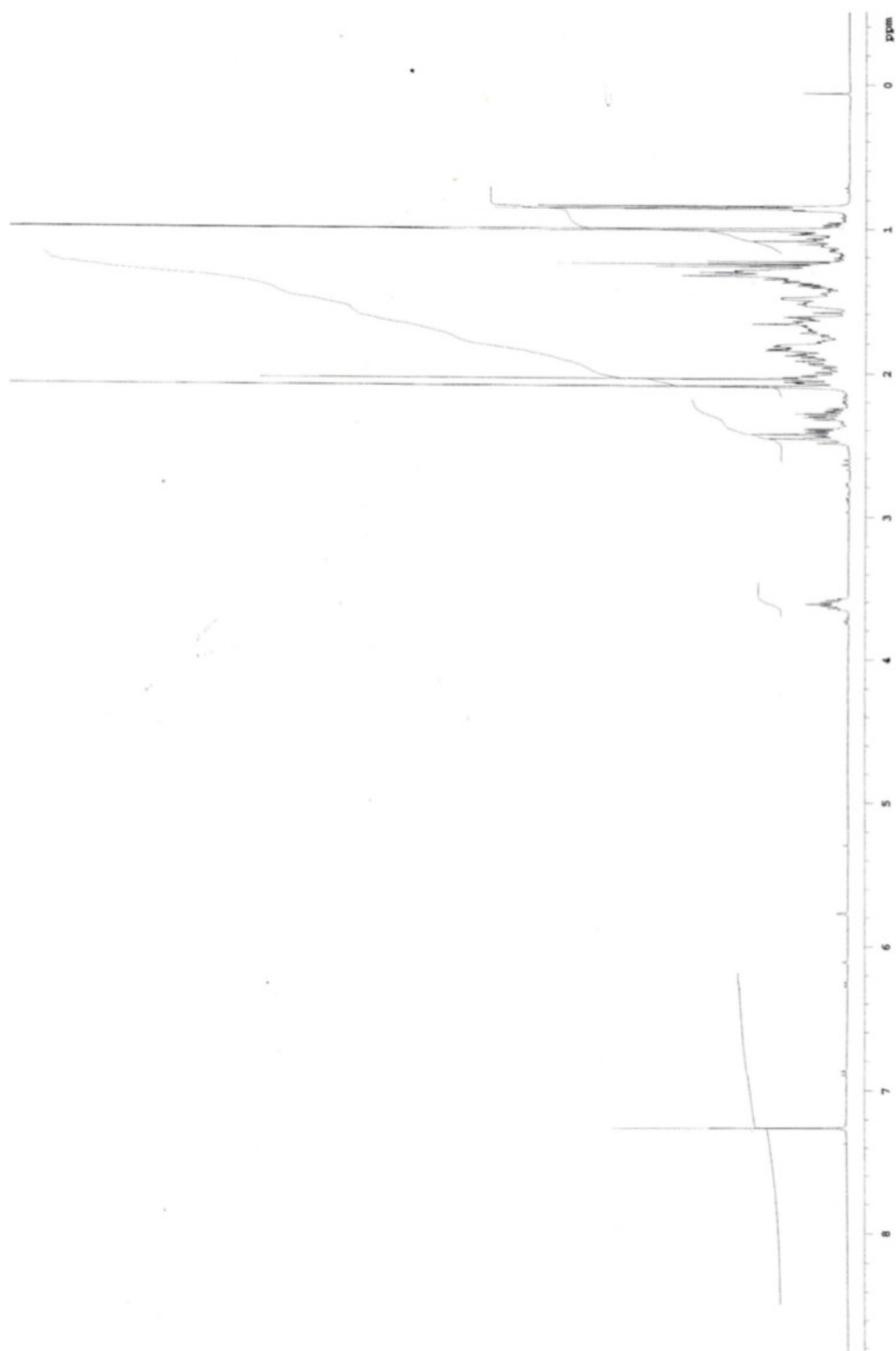


6b

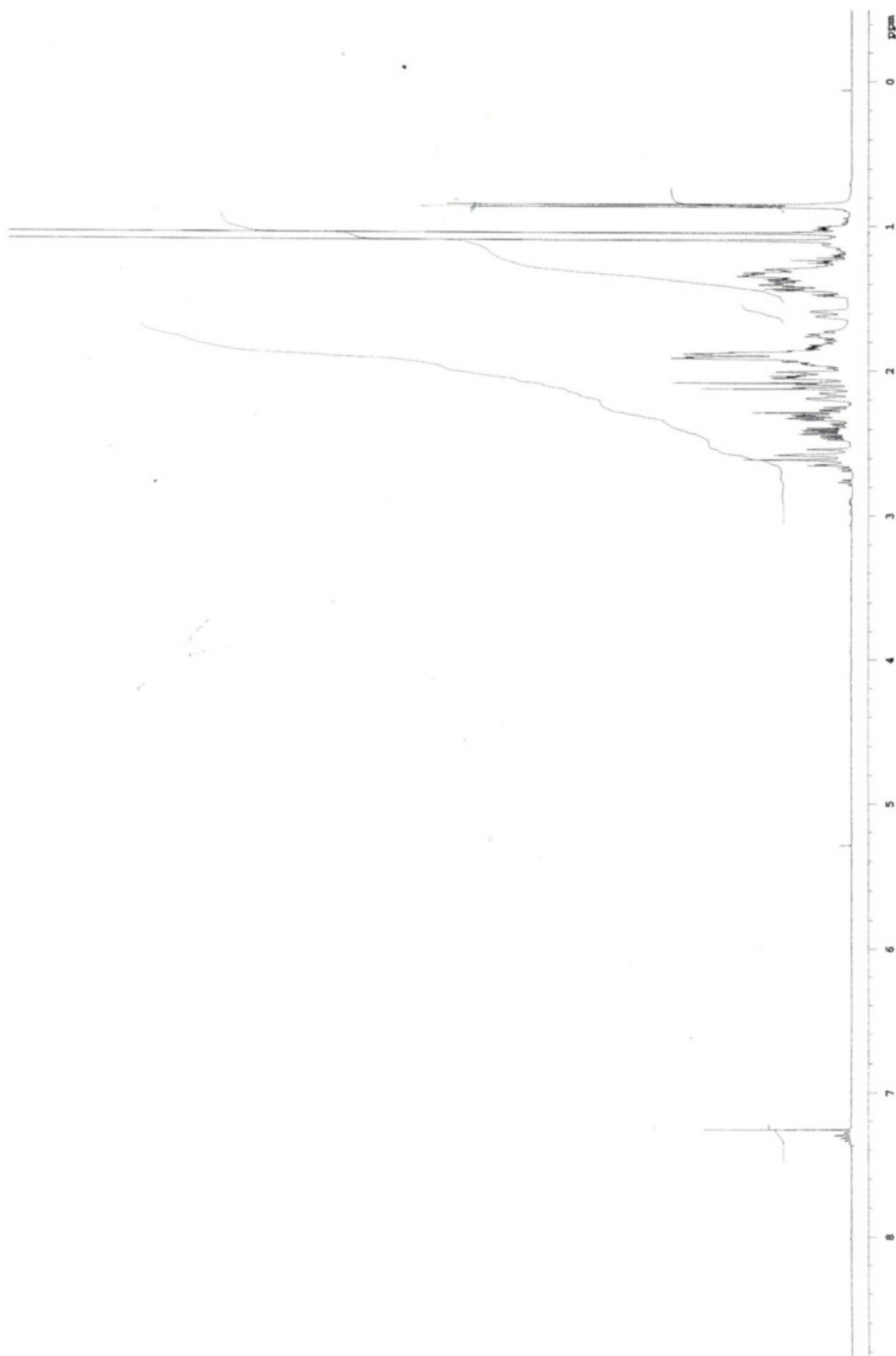
L'acido 3,12-dicheto-5 β -colan-24-oico **7b** mostra le seguenti caratteristiche spettroscopiche: ¹H-NMR (CDCl₃) picchi selezionati: δ 0.8 (d, 3H, CH₃-21) 1.05 (s, 3H, CH₃-19), 1.1 (s, 3H, CH₃-18). [81]



7b



^1H NMR di acido 3-idrossi-12-dicheto-5 β -colan-24-oico **6b**



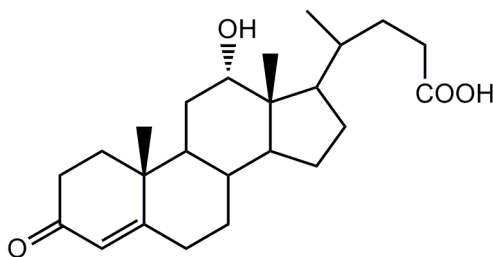
¹H NMR di acido 3,12-dicheto-5 β -colan-24-oico **7b**

Biotrasformazione di acido desossicolico **1b con *Rhodococcus coprophilus* e
*Rhodococcus sp.***

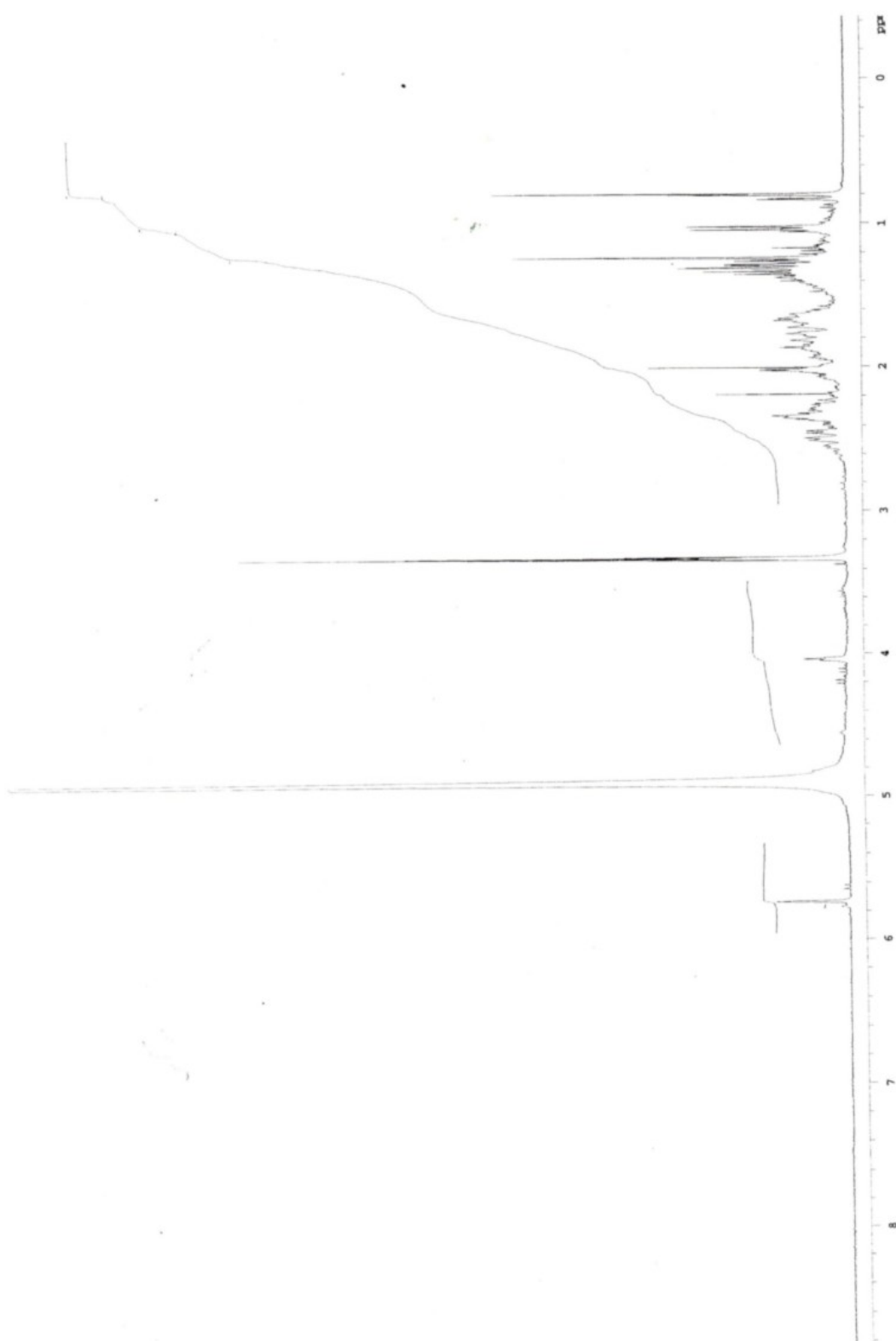
Si lavora come da procedura generale partendo da 200 mg di acido desossicolico **1b**. Per quanto riguarda *Rhodococcus coprophilus* dopo 48 h, la cromatografia della miscela di reazione su colonna di gel di silice (eluente *n*-esano/etile acetato/acido acetico 60 : 40 : 1) ha fornito l'acido 3-cheto-12-idrossi-colan-4-ene-24-oico **8b** (142 mg, 72%).

Nel caso di *Rhodococcus sp.* dopo 144 h, la cromatografia della miscela di reazione su colonna di gel di silice (eluente *n*-esano/etile acetato/acido acetico 60 : 40 : 1) ha fornito il prodotto **8b** (89 mg, 45%).

L'acido 3-cheto-12-idrossi-colan-4-ene-24-oico **8b** mostra le seguenti caratteristiche spettroscopiche: ¹H-NMR (CD₃OD) picchi selezionati: δ 0.8 (s, 3H, CH₃-18), 1.0 (d, 3H, J= 6 Hz, CH₃-21), 1.1 (s, 3H, CH₃-19), 4.05 (s, 1H, H-12) 5.7 (s, 1H, H4). [82]



8b



^1H NMR di acido 3-cheto-12-idrossi-colan-4-ene-24-oico **8b**

CAPITOLO 3

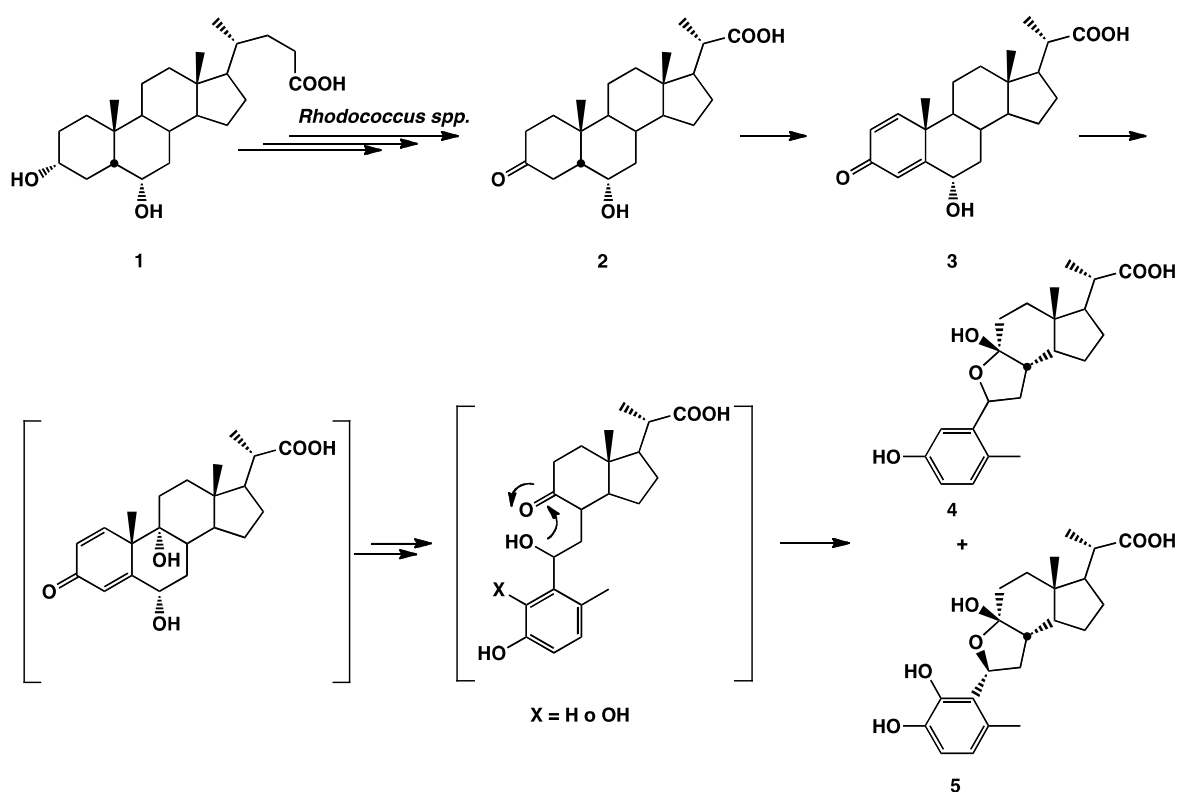
9,10-Secosteroidi da acido iodesossicolico con *Rhodococcus* spp.

In questo capitolo vengono riportati i risultati ottenuti nelle biotrasformazioni di alcuni ceppi di *Rhodococcus* con acido iodesossicolico **1**. Questo lavoro è stato oggetto di pubblicazione (vedi allegato A).

Come precedentemente riportato nel Capitolo 1 gli acidi biliari, oltre al noto processo di trasformazione anaerobica nel tratto intestinale, vengono degradati da molti batteri. Queste degradazioni (Capitolo 1) procedono attraverso: a) ossidazione in C₃; b) deidrogenazione dei legami C₁-C₂ e C₄-C₅; c) rimozione della catena laterale attraverso due passaggi consecutivi di β -ossidazione; d) idrossilazione in C₉ mediata da KSH con apertura dell'anello B e formazione di 9,10-secosteroidi; e) vari passaggi per ottenere la completa mineralizzazione a CO₂. Considerando il grande numero di 17-cheto-secosteroidi isolati dalle degradazioni batteriche di steroidi [47] [52], la presenza di un gruppo 17-cheto sembra essere un prerequisito per l'idrossilazione con KSH. C'è solo un esempio di un 9,10-secosteroide ottenuto dalla degradazione batterica che mantiene la catena laterale in C₁₇ (i.e. la degradazione del colesterolo e dei fitosteroli con *Mycobacterium fortuitum* [83]). Inoltre è risultato attivo *R. rhodochrous* nei confronti di progesterone, steroide che presenta un gruppo acetilico in C₁₇ [57], ma l'atteso 9,10-secosteroide non è stato isolato. In questo lavoro per la prima volta sono stati ottenuti, e completamente caratterizzati, nuovi 9,10-secosteroidi con parziale degradazione della catena in C₁₇ dalle biotrasformazioni di acido iodesossicolico con *Rhodococcus* spp. (i.e. *Rhodococcus atherovorans*, *Rhodococcus ruber* e *Rhodococcus zopfii*) (Schema e Tabella 1)

Tabella 1. Biotrasformazioni di acido iodesossicolico **1** con *Rhodococcus* spp.

Ceppo	Tempo (h)	2 (resa %)	3 (resa %)	4 (resa %)	5 (resa %)
<i>Rh. ruber</i>	24		27	32	10
<i>Rh. atherovorans</i>	24		30	45	
<i>Rh. zopfii</i>	24	23	24		30



Schema

La biotrasformazione di acido iodesossicolico **1** (1 g/l) con *Rh. ruber* fornisce, dopo 24 ore di incubazione a 28°C, l'acido 6 α -idrossi-3-cheto-23,24-dinorcolan-1,4-diene-22-oico **3** (27%), precedentemente caratterizzato come estere metilico [84], insieme ai due nuovi 9,10-secosteroidi, l'acido 3,9 β -diidrossi-6 ξ ,9 α -epossi-9,10-seco-23,24-dinorcolan-1,3,5(10)-triene-22-oico **4** (32%) e l'acido 3,4,9 β -triidrossi-6 β ,9 α -epossi-9,10-seco-23,24-dinorcolan-1,3,5(10)-triene-22-oico **5** (10%). Tutti i prodotti ottenuti mostrano una parziale degradazione della catena in C₁₇.

I composti **3** e **4** vengono ottenuti anche con *R. atherovorans* (30 e 45%, rispettivamente) mentre la biotrasformazione con *Rh. zopfii* fornisce il nuovo acido 6 α -idrossi-3-cheto-23,24-dinor-5 β -colan-22-oico **2** (23%) insieme all'1,4-diene derivato **3** (resa del 24%) e al 9,10-secosteotide diidrossilato **5** (30%).

La via metabolica che porta alla formazione di questi prodotti è rappresentata nello Schema. Il 3-cheto derivato **2** si forma per ossidazione dell'ossidrilico in posizione C₃ e per parziale degradazione della catena laterale dell'acido iodesossicolico **1**. Il composto **2** viene quindi ossidato in posizione C₁-C₂ e C₄-C₅ generando il 3-cheto-1,4-diene derivato **3**,

che viene successivamente idrossilato in C₉ da 3-chetosteroido-9 α -idrossilasi (KSH). La C₉-idrossilazione porta alla rottura spontanea del legame C₉-C₁₀, con formazione del carbonile in C₉. In questo caso il prodotto di apertura, data la presenza di un gruppo ossidrilico in C₆, riarrangia per attacco nucleofilo del gruppo ossidrilico sul carbonile in C₉, portando ai due secosteroidi in forma emiacetalica **4** e **5**.

Il riarrangiamento emiacetalico compiuto dopo la rottura spontanea dell'anello B è stato precedentemente riportato per la degradazione dell'acido iodesossicolico **1** ma con la completa degradazione della catena laterale in C₁₇ a gruppo carbonilico [85]. Inoltre, la seconda entrata di un gruppo ossidrilico in posizione C₄ dell'anello benzenico che porta alla formazione del derivato catecolico **5** non è mai stata riportata per l'acido iodesossicolico **1** e non è possibile determinare se avvenga sul 9,10-secosteroido intermedio (forma aperta) o sull'emiacetale **4**.

Dal momento che in letteratura viene riportato un solo esempio di 9,10-secosteroido con una parziale degradazione della catena laterale in C₁₇ isolato dalla degradazione del colesterolo [83], ed è noto che l'idrossilazione in C₉ degli acidi biliari da parte della KSH avviene esclusivamente dopo la completa degradazione della catena laterale in C₁₇ [52], in questo lavoro viene riportato il primo esempio di 9,10-secosteroidi derivanti da acidi biliari che preservano una parziale catena laterale in C(17). La caratterizzazione dei nuovi metaboliti **2**, **4**, e **5**, è stata ottenuta grazie metodologie spettroscopiche integrate come MS, IR, NMR e NMR-2D.

I dati dei vari composti sono riportati nella Tabella 12 e nella Tabella 3.

Tabella 2. ¹H-NMR di **4** (400 MHz) e **5** (300 MHz) in CD₃OD; δ in ppm; *J* in Hz.

	4	5
H-C(1)	6.92 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.0)	6.43 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8.2, 0.8)
H-C(2)	6.66 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8.0, 2.7)	6.53 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.2)
H-C(4)	6.99 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2.7)	--
H-C(6)	5.40 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 9.1, 6.4)	5.26 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7)
CH ₂ (7)	2.11 (<i>m</i>) ^a / 2.11 (<i>m</i>) ^a	2.02 (<i>m</i>) ^b / 2.13 (<i>m</i>) ^c
H-C(8)	2.14 (<i>m</i>) ^a	2.41 (<i>m</i>)
CH ₂ (11)	1.80 (<i>m</i>) ^c / 2.17 (<i>m</i>) ^a	2.24 (<i>m</i>) ^b / 2.32 (<i>m</i>) ^c
CH ₂ (12)	1.37 (<i>m</i>) / 1.92 (<i>m</i>) ^d	1.47 (<i>m</i>) ^c / 1.85 (<i>m</i>) ^c
H-C(14)	1.54 (<i>m</i>)	1.28 (<i>m</i>)
CH ₂ (15)	1.25 (<i>m</i>) / 1.84 (<i>m</i>) ^d	1.19 (<i>m</i>) / 1.68 (<i>m</i>)
CH ₂ (16)	1.48 (<i>m</i>) / 1.89 (<i>m</i>) ^d	1.43 (<i>m</i>) / 1.97 (<i>m</i>)
H-C(17)	1.66 (<i>m</i>)	1.61 (<i>m</i>)
Me(18)	0.81 (<i>s</i>)	0.87 (<i>s</i>)
Me(19)	2.22 (<i>s</i>)	2.12 (<i>s</i>)
H-C(20)	3.39 (<i>m</i>)	2.37 (<i>m</i>)
Me(21)	1.22 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6.8)	1.22 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6.8)

^a) - ^d) multipletti sovrapposti.

Tabella 3. ¹³C-NMR di **4** (100 MHz) e **5** (75 MHz) in CD₃OD; δ in ppm.

	4	5
C(1)	131.9	121.6
C(2)	114.9	115.2
C(3)	156.7	143.6
C(4)	113.9	140.4
C(5)	143.5	123.4
C(6)	78.6	75.3
C(7)	36.6	41.9
C(8)	48.4	49.7
C(9)	109.7	109.3
C(10)	126.8	128.7
C(11)	28.7	31.3
C(12)	37.0	37.0
C(13)	42.9	43.2
C(14)	50.9	58.1
C(15)	26.0	25.5
C(16)	28.6	28.5
C(17)	53.4	53.1
C(18)	10.9	11.1
C(19)	18.6	17.1
C(20)	43.8	43.8
C(21)	17.8	17.7
C(22)	180.6	180.6

Tutti i segnali di atomi di idrogeno sono stati associati a quelli direttamente legati ad atomi di carbonio mediante esperimenti DEPT e HMQC 2D-NMR. I multipletti relativi agli atomi di idrogeno vengono disposti in sequenza attraverso la tecnica COSY, portando a tre sistemi di spin evidenziati in grassetto in Figura 1.

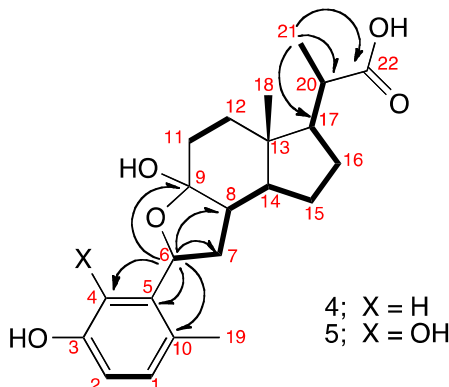


Figura 1. COSY e correlazioni chiave HMB degli emiacetali **4** e **5**.

Attraverso esperimenti HMBC è stato possibile definire l'accorciamento della catena laterale e l'anello emiacetalico, caratteristici del composto **4**.

Il composto **5** mostra proprietà spettroscopiche molto simili a quelle del composto **4**, infatti lo spettro ESI-MS (modalità ione-negativo) mostra un picco avente m/z pari a 371 attribuibile allo ione $M-H_3O$ e l'immediata perdita di acqua, come per il composto **4**, conferma la presenza del gruppo OH emiacetalico. Lo spettro IR mostra solo un assorbimento di un gruppo carbonilico attribuibile al gruppo carbossilico in C_{22} .

Analogamente a quanto descritto per il composto **4** gli esperimenti 1H -NMR, ^{13}C -NMR, DEPT, HMQC 2D-NMR E COSY hanno permesso di definire la struttura di **5**, ulteriormente confermata dall'analisi HMBC (Figura 1). Gli spettri 1H -NMR e ^{13}C -NMR dei composti **4** e **5** sono molto simili con unica eccezione riguardante i segnali aromatici; entrambi gli spettri 1H -NMR e ^{13}C -NMR indicano la presenza di un gruppo OH addizionale in C_4 .

Uno stereomodello della struttura emiacetalica proposta per il composto **5** (calcolato con MarvinSketch software ver. 5.4.1.1) dimostra che esiste solo una configurazione che genera tra $H_6-C_6-C_7-H_7$ un angolo diedro di circa 90° (Figura 2).

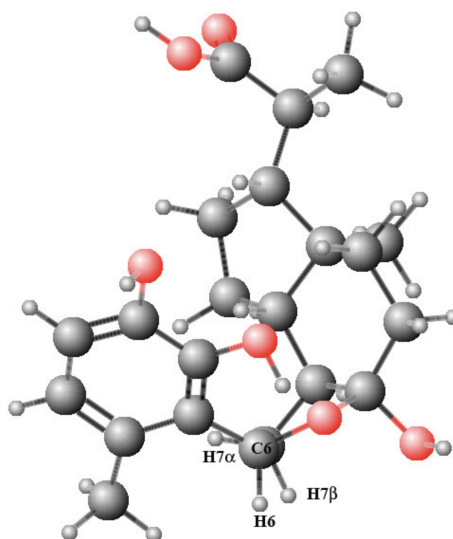


Figura 2. Stereomodello tridimensionale di **5**

Questo stereoisomero richiede l'inversione di configurazione dell'ossidrile in posizione C₆ rispetto a quella originale dell'acido iodesossicolico (6 α).

In conclusione *Rhodococcus atherovorans*, *Rhodococcus ruber* e *Rhodococcus zopfii* nelle biotrasformazioni di acido iodesossicolico generano i tre nuovi prodotti **2**, **4** e **5** caratterizzati dal fatto che presentano solo una parziale degradazione della catena laterale in C₁₇. D'altra parte l'acido 3-cheto-23,24-dinorcolan-1,4-diene-22-oico **3**, precedentemente caratterizzato come estere metilico, non era mai stato proposto come substrato per la KSH, enzima che catalizza l'idrossilazione in C₉.

D'altra parte la struttura dei nuovi 9,10-secosteroidi **4** e **5**, riarrangiati in forma emiacetalica, suggerisce che la degradazione della catena laterale e l'aromatizzazione dell'anello A non sono necessariamente processi consecutivi. Queste molecole sembrano molto promettenti come metaboliti biologicamente attivi e questo approccio biosintetico verrà applicato ad altri acidi biliari.

La caratterizzazione dei nuovi 9,10-secosteroidi sintetizzati, la descrizione della procedura sperimentale e il dettaglio dei materiali e metodi utilizzati vengono riportati nell'articolo (allegato **A**) e gli spettri ¹H- e ¹³C-NMR nell'allegato **B**.

New 9,10-Secosteroids from Biotransformations of Hyodeoxycholic Acid with *Rhodococcus* spp.

by Stefania Costa^{a)}, Pier Paolo Giovannini^{b)}, Giancarlo Fantin^{b)}, Alessandro Medici^{b)}, and Paola Pedrini^{*a)}

^{a)} Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie, Università di Ferrara, Via L. Borsari 46, IT-44121 Ferrara (phone: +390532455700; fax: +390532455715; e-mail: pdp@unife.it)

^{b)} Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche, Università di Ferrara, Via Fossato di Mortara 17–27, IT-44121 Ferrara

The biotransformations of hyodeoxycholic acid with various *Rhodococcus* spp. are reported. Some strains (i.e., *Rhodococcus zopfii*, *Rhodococcus ruber*, and *Rhodococcus aetherivorans*) are able to partially degrade the side chain at C(17) to afford 6 α -hydroxy-3-oxo-23,24-dinor-5 β -cholan-22-oic acid (**2**; 23%) and 6 α -hydroxy-3-oxo-23,24-dinorchol-1,4-dien-22-oic acid (**3**; 23–30%), together with two new 9,10-secosteroids **4** and **5** (10–45%), still bearing the partial side chain at C(17) and adopting an intramolecular hemiacetal form. In addition, the 9,10-secosteroid **5** showed an unprecedented C(4)-hydroxylation. The new secosteroids were fully characterized by MS, IR, NMR, and 2D-NMR analyses.

Introduction. – Bile acid salts are surface-active steroid compounds [1] that occur in the digestive tracts of vertebrates [2]. Their main physiological function is to emulsify bile lipids and dietary lipids. In humans and many other mammals, bile acids are synthesized in the liver. The biosynthesis proceeds *via* modification of the steroid skeleton and shortening of the side chain of cholesterol [3]. Although the bacterial biosynthesis of steroids, and thus also of bile salts, are rarely reported [4–7], the ability of prokaryotic microorganisms to degrade and transform this class of compounds has been extensively documented [8–10]. Regarding the bile acids (Fig. 1), in addition to the well-known process of anaerobic transformation in the intestinal tract, several examples of aerobic bacterial degradation are reported [11][12].

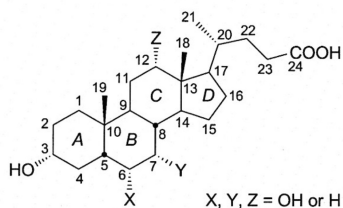


Fig. 1. Structure of bile acids

These degradations proceed through a pathway initial step of which is the HO–C(3) group oxidation to the corresponding 3-oxo derivative, followed by dehydrogenation of the C(1)–C(2) and C(4)–C(5) bonds to 3-oxo-1,4-diene structures.

At the same time, the acidic side chain is removed probably through two consecutive β -oxidation steps [13]. After *A*-ring oxidation, C(9) is subject to hydroxylation by 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase (KSH), a two-component iron-sulfur-containing monooxygenase [14–16]. This reaction leads to the spontaneous cleavage of the *B*-ring by a *retro*-aldol cleavage, and the aromatic 9,10-secosteroids are obtained [17]. Studies on the specificity of KSH purified from *Rhodococcus rhodochrous* DSM 43269 [16] showed that the enzyme accepts a variety of 3-keto steroids with different *A*-ring structures as substrates but the 9 α -hydroxylation that induces the *B*-ring cleavage occurs only with 1,4-tetrahydro-3-oxo steroids. Moreover, the KSH activity appears to be affected by the hindrance of the side chain at C(17). Considering the large number of 17-oxo-secosteroids isolated from bacterial steroid degradations [4–11], the presence of a 17-oxo group seems to be a prerequisite for the KSH catalysis. There is only one example of a 9,10-secosteroid obtained from bacterial degradation with an acidic C₃ side chain at C(17) (*i.e.*, *Mycobacterium fortuitum* degradation of cholesterol and phytosterols [18]). In addition, *R. rhodochrous* KSH activity has been detected also with progesterone, a C(17)-acetylated 4-didehydro steroid [16], but the expected 9,10-secosteroid was not isolated.

Recently, some astrogorgols, a small group of secosterols from gorgonian genera of *Astrogorgia* [19], *Calicogorgia* [20], and *Muricella* [21][22] containing a 3-hydroxy-10-methyl aromatic ring, have been shown to possess cytotoxic, brine-shrimp lethal, antiviral, and anti-inflammatory activities, as well as the ability to inhibit the cell division of the fertilized starfish (*Asterina pectinifera*) eggs [19–23]. Finally the unusual structural patterns of 9,10-secosteroids have also attracted the attention of chemists for total synthesis [24–26].

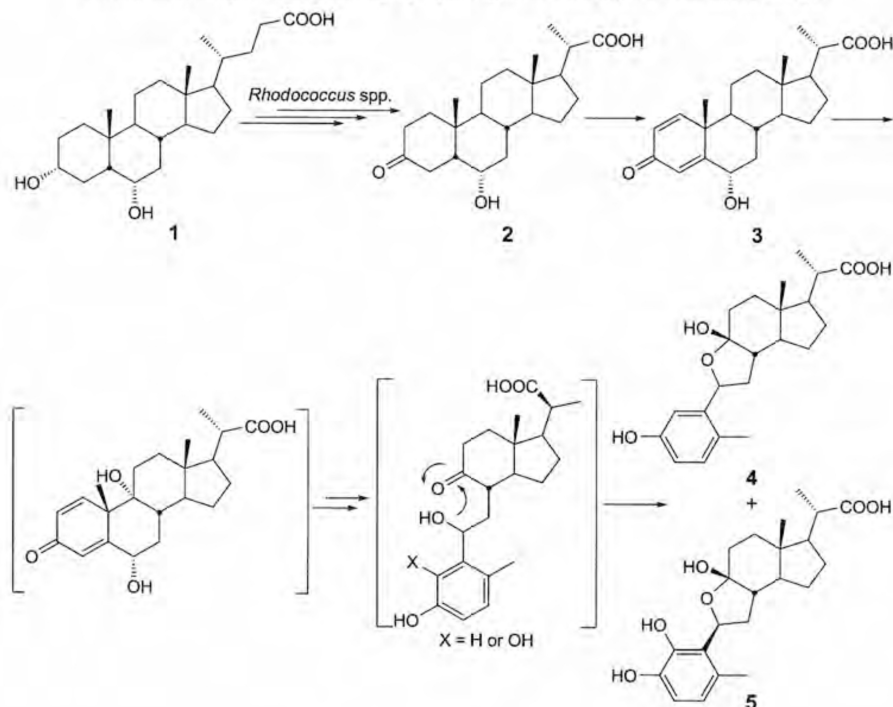
On the basis of these considerations and exploiting our long experience in the synthesis [27][28] and biotransformation of bile acids [29–31], in this article, the biotransformations of hydeoxycholic acid (= (3 α ,5 β ,6 α)-3,6-dihydroxycholan-24-oic acid; **1**) with *Rhodococcus* spp. are reported. New metabolites, in particular two 9,10-secosteroids with a partial C(17)-side-chain degradation and an intramolecular hemiacetal function, were obtained (*Scheme*) and fully characterized.

Results and Discussion. – Various *Rhodococcus* strains were tested for their ability to biotransform hydeoxycholic acid (**1**). Interesting results were obtained with *R. aetherivorans*, *R. ruber*, and *R. zopfii* (*Table 1*).

Table 1. Biotransformation of Hydeoxycholic Acid (**1**) with *Rhodococcus* spp.

Bacteria	Time [h]	Yield [%]			
		2	3	4	5
<i>Rhodococcus ruber</i>	24		27	32	10
<i>Rhodococcus aetherivorans</i>	24		30	45	
<i>Rhodococcus zopfii</i>	24	23	24		30

The biotransformation of **1** (1 g/l) with *R. ruber* afforded, after 24 h incubation at 28°, 6 α -hydroxy-3-oxo-23,24-dinorchola-1,4-dien-22-oic acid (**3**; 27%), previously

Scheme. Biotransformation Pathway of Hydeoxycholic Acid (1) with *Rhodococcus* spp.

characterized as methyl ester [32], and the new 3,9 β -dihydroxy-6 ξ ,9 α -epoxy-9,10-seco-23,24-dinorchola-1,3,5(10)-trien-22-oic acid (4) and 3,4,9 β -trihydroxy-6 β ,9 α -epoxy-9,10-seco-23,24-dinorchola-1,3,5(10)-trien-22-oic acid (5; 32 and 10% yield, resp.). The compounds 3 and 4 were also obtained with *R. aetherivorans* (30 and 45% yield, resp.), while the biotransformation with *R. zopfii* furnished the 1,4-diene derivative 3 (24% yield), the catechol derivative 5 (30% yield), and also the new 3-oxo-23,24-dinorcholanoic acid 2 (23% yield). Compound 2 was formed by the partial degradation of the side chain at C(17) and HO-C(3) oxidation of hydeoxycholic acid (1). The 3-oxoderivative 2 is successively oxidized at C(1)-C(2) and C(3)-C(4) to 3-oxo-1,4-diene derivative 3, which is hydroxylated at C(9) by KSH. The C(9)- α -hydroxylation led to the spontaneous cleavage of the C(9)-C(10) bond, followed by HO-C(6) group attack at the C(9)=O function to give the 9,10-secosteroids 4 and 5 in hemiacetal form. This rearrangement accomplished after the spontaneous cleavage of the B-ring has been previously reported for degradation of hydeoxycholic acid (1) but with the complete degradation of the side chain at C(17) to carbonyl group [17]. Furthermore, the hydroxylation at C(4) to form the catechol derivative 5 has never been reported for 1. On the other hand, there is no evidence for the C(4)-hydroxylation of the A-ring to the catechol secosteroid 5 occurring on the opened hydroxy-keto intermediate or on the

hemiacetal **4**. Since there is only one example of a 9,10-seco-steroid with a partial side chain at C(17) isolated by the degradation of the cholesterol [18], and it is reported that the C(9)-hydroxylation by KSH of bile acids occurs exclusively after the complete removal of the side chain at C(17) [11], this is the first example of 9,10-seco-steroids from bile acids with a partial side chain at C(17). The characterization of new metabolites **2**, **4**, and **5** has been achieved through various and integrated spectroscopic methods such as MS, IR, NMR, and 2D-NMR.

The $^1\text{H-NMR}$ of 3-oxo-6 α -hydroxy-23,24-dinor-5 β -cholan-22-oic acid (**2**) shows three typical and distinctive signals of the bile acid: two *singlets* ($\delta(\text{H})$ 0.71 and 1.02) and a *doublet* ($\delta(\text{H})$ 1.25) attributable to the Me(18) and Me(19), and Me(21), respectively [33]. The *multiplet* ($\delta(\text{H})$ 4.05–4.18) was easily assigned to H–C(6), analogously to the homologous resonance of hyodeoxycholic acid (**1**). The $^{13}\text{C-NMR}$ spectra (broad band (BB) and distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT)) exhibited 22 signals: for three Me, eight CH_2 , seven CH groups, and four quaternary C-atoms, in agreement with a 23,24-dinor derivative. The signal shifted most downfield at $\delta(\text{C})$ 215.5 was readily assigned to the C(3)=O group, whilst the resonance at $\delta(\text{C})$ 181.1 was attributed to the C(22)OOH function. The most downfield CH signal ($\delta(\text{C})$ 67.6) was assigned to C(6) on the basis of the analogy of the homologous resonance of hyodeoxycholic acid (**1**). Finally, the three upfield resonances ($\delta(\text{C})$ 21.0, 17.0, and 12.2) were ascribed to Me(19), Me(21), and Me(18), respectively. The ESI-MS, exhibiting a negative molecular-ion peak at 361 m/z ($[\text{M} - \text{H}]^-$) confirmed the proposed structure.

Regarding the characterization of 3,9 β -dihydroxy-6 ξ ,9 α -epoxy-9,10-seco-23,24-dinorchola-1,3,5(10)-trien-22-oic acid (**4**), a first step was a prominent ion peak at m/z 355 in the ESI-MS spectrum (negative-ion mode) attributable to the $[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^-$ ion. The ready loss of H_2O confirmed the presence of a non-aromatic OH group (*i.e.*, hemiacetal OH) in a position favorable for elimination. This structure was supported by the IR spectrum that showed only one CO absorption at 1715 cm^{-1} , attributable to the C(22)OOH. This was in agreement with the absence of a C(9)=O group [17]. ^1H - and $^{13}\text{C-NMR}$ data of compound **4** are compiled in *Tables 2* and *3*, respectively.

All the H-atom resonances were associated to those of the directly attached C-atoms through the DEPT and 2D-NMR HMQC experiments. The H-atom *multiplets* are arranged in sequence through the COSY experiment, yielding the three spin systems evidenced in bold in *Fig. 2*.

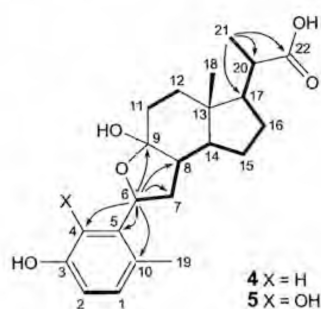


Fig. 2. COSY and key HMB correlations of the proposed hemiacetals **4** and **5**. Further HMBCs are omitted for clarity.

Table 2. $^1\text{H-NMR}$ Data of **4** and **5**. At 400 and 300 MHz, respectively, in CD_3OD ; δ in ppm; J in Hz.

H-Atom	4	5
H-C(1)	6.92 (<i>d</i> , $J = 8.0$)	6.43 (<i>dd</i> , $J = 8.2, 0.8$)
H-C(2)	6.66 (<i>dd</i> , $J = 8.0, 2.7$)	6.53 (<i>d</i> , $J = 8.2$)
H-C(4)	6.99 (<i>d</i> , $J = 2.7$)	–
H-C(6)	5.40 (<i>dd</i> , $J = 9.1, 6.4$)	5.26 (<i>d</i> , $J = 7$)
$\text{CH}_2(7)$	2.08–2.20 (<i>m</i>) ^a	1.98–2.04 (<i>m</i> , H_β), 2.11–2.17 (<i>m</i> , H_α)
H-C(8)	2.08–2.20 (<i>m</i>) ^a	2.36–2.44 (<i>m</i>) ^b
$\text{CH}_2(11)$	1.76–1.87 (<i>m</i>) ^c , 2.08–2.20 (<i>m</i>) ^a	2.21–2.28 (<i>m</i> , H_α), 2.29–2.35 (<i>m</i> , H_β)
$\text{CH}_2(12)$	1.33–1.42 (<i>m</i>), 1.76–1.87 (<i>m</i>) ^c	1.39–1.52 (<i>m</i> , H_α) ^d , 1.80–1.91 (<i>m</i> , H_β)
H-C(14)	1.48–1.58 (<i>m</i>)	1.25–1.34 (<i>m</i>)
$\text{CH}_2(15)$	1.24–1.28 (<i>m</i>), 1.76–1.87 (<i>m</i>) ^c	1.15–1.20 (<i>m</i>), 1.65–1.75 (<i>m</i>)
$\text{CH}_2(16)$	1.42–1.54 (<i>m</i>), 1.76–1.87 (<i>m</i>) ^c	1.39–1.52 (<i>m</i>) ^d , 1.94–1.99 (<i>m</i>)
H-C(17)	1.61–1.70 (<i>m</i>)	1.54–1.65 (<i>m</i>)
Me(18)	0.81 (<i>s</i>)	0.87 (<i>s</i>)
Me(19)	2.22 (<i>s</i>)	2.12 (<i>s</i>)
H-C(20)	2.35–2.44 (<i>m</i>)	2.36–2.44 (<i>m</i>) ^b
Me(21)	1.22 (<i>d</i> , $J = 6.8$)	1.22 (<i>d</i> , $J = 6.8$)

^a)–^d) Overlapping multiplets.

Table 3. $^{13}\text{C-NMR}$ Data of **4** and **5**. At 100 and 75 MHz, respectively, in CD_3OD ; δ in ppm.

C-Atom	4	5	C-Atom	4	5
C(1)	131.9	121.6	C(12)	37.0	37.0
C(2)	114.9	115.2	C(13)	42.9	43.2
C(3)	156.7	143.6	C(14)	50.9	58.1
C(4)	113.9	140.4	C(15)	26.0	25.5
C(5)	143.5	123.4	C(16)	28.6	28.5
C(6)	78.6	75.3	C(17)	53.4	53.1
C(7)	36.6	41.9	C(18)	10.9	11.1
C(8)	48.4	49.7	C(19)	18.6	17.1
C(9)	109.7	109.3	C(20)	43.8	43.8
C(10)	126.8	128.7	C(21)	17.8	17.7
C(11)	28.7	31.3	C(22)	180.6	180.6

The key HMBCs of Me(21) and H-C(6), indicated with the arrows in Fig. 2, define the shortened carboxylic side chain and the hemiacetal five-membered ring, which are the crucial features of compound **4**.

The $^1\text{H-NMR}$ showed, among other, signals of three aromatic H-atoms ($\delta(\text{H})$ 6.66 (*dd*), 6.92 (*d*), and 6.99 (*d*)), which represent a typical pattern of the methylphenol ring in the 9,10-secosteroid [34].

The *doublet* at $\delta(\text{H})$ 1.22 and the *singlet* at $\delta(\text{H})$ 0.81 were easily assigned to Me(21) and Me(18), respectively, while the aromatization of the A-ring was confirmed by downfield shift of the Me(19) signal ($\delta(\text{H})$ 2.22) compared with $\delta(\text{H})$ 1.02 of the homologous in 6 α -hydroxy-3-oxo-23,24-dinor-5 β -cholan-22-oic acid (**2**). The config-

uration of H–C(8) was assumed to be unchanged with respect to the precursor **3** or hydoxycholeic acid (**1**; *i.e.*, H_β–C(8)), since neither the 9 α -hydroxylation nor the *retro*-aldol rearrangement, involved in formation of **4**, should require the change of the configuration at C(8) [17]. The hemiacetal HO–C(9) group should be in β -position to the C ring, since the HO–C(6) can readily attach only to the α -position of C(9) [17]. Moreover, the H-atom resonance (δ (H) 5.40) of **4**, assigned to the benzylic H-atom H–C(6), appeared as *dd* ($J=9.1, 6.4$; Table 2), as expected for coupling to the two vicinal H-atoms at C(7). Nevertheless, these data were insufficient to assign the configuration at C(6), and further experiments (*i.e.*, NOE-DIFF, 2D-ROESY, or single-crystal X-ray) failed. In the absence of further evidences, the configuration at this position remained uncertain (*i.e.*, 6 ξ). As for compound **2**, the ¹³C-NMR spectra (BB and DEPT) of **4** exhibited 22 signals: for three Me, five CH₂, eight CH groups, and six quaternary C-atoms in agreement with a 23,24-dinor derivative. The most downfield signal (δ (C) 180.6) was easily attributable to C(22)OOH function, while the six signals (δ (C) between 156.7 and 113.9) were assigned to the aromatic C-atoms C(1) to C(5), and C(10). The signal at δ (C) 109.7 was attributed to the hemiacetal C(9). On the other hand, the H–C(6) signal (δ (C) 78.6) is *ca.* 11 ppm downfield with respect to the homologous H–C(6) of hydoxycholeic acid (**1**): this downfield shift was consistent with the proposed tetrahydrofuran ring arrangement. Finally, the three upfield resonances at δ (C) 18.6, 17.8 and 10.9 were ascribed to Me(19), Me(21), and Me(18), respectively.

Unlike **4**, the structure of 3,4,9 β -trihydroxy-6 β ,9 α -epoxy-9,10-*seco*-23,24-dinorchola-1,3,5(10)-trien-22-oic acid (**5**) has been completely determined. Compound **5** showed spectroscopic properties very close to those of **4**. In fact, the ESI-MS spectrum (negative-ion mode) of **5** exhibited a prominent ion peak at m/z 371 attributable to the $[M - H_2O]^-$ ion and the ready loss of H₂O, as for compound **4**, confirming the presence of the hemiacetal OH group. The IR spectrum showed only one CO absorption attributable to the C(22)OOH.

As above, ¹H- (Table 2) and ¹³C-NMR (Table 3), and DEPT, 2D-NMR HMQC, and COSY experiments defined the complete structure which was further confirmed by the key HMBCs shown in Fig. 1. The ¹H- and ¹³C-NMR data of the compounds **4** and **5** were very similar with the only exception regarding the aromatic signals: both ¹H- and ¹³C-NMR spectra indicated the presence of an additional OH group at C(4). In fact, the resonances of C(1) (δ (C) 121.6), C(3) (δ (C) 143.6), and C(5) (δ (C) 123.4) of compound **5** were shifted upfield with respect to C(1) (δ (C) 131.9), C(3) (δ (C) 156.7), and C(5) (δ (C) 143.5) of compound **4**. In addition, the C(4) signal of compound **5** is shifted downfield (*ca.* 37 ppm) with respect to C(4) signal of **4** (δ (C) 140.4 and δ (C) 113.9, resp.). Further, the aromatic H-atoms of compound **5** showed only two resonances at δ (H) 6.43 (H–C(1)) and 6.53 (H–C(2)), while the H–C(3) signal (δ (H) 6.99) of **4** was absent in the spectrum of **5** confirming the hydroxylation at C(4). An other interesting feature was the ¹H resonance assigned to the benzylic H-atom, H–C(6) (δ (H) 5.26), of the compound **5** that appeared as *doublet* ($J=7$ Hz; Table 2) instead of *dd* as expected from coupling to CH₂(7). This implied that one of the two coupling constants H–C(6)/H–C(7) was close to zero (Fig. 3).

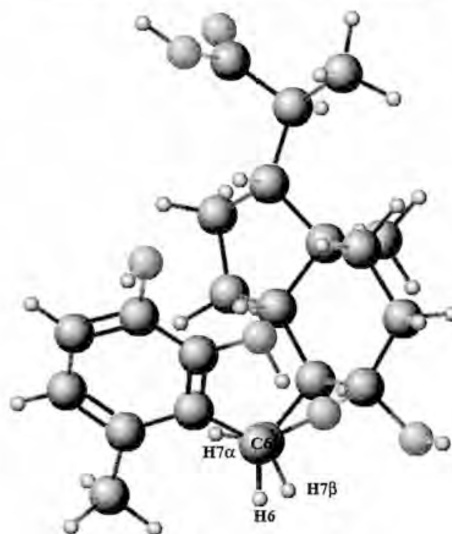


Fig. 3. Three-dimensional stereomodel of **5**. C(6) eclipses C(7), dihedral angles H(6)–H(7) α is ca. 90° and H(6)–H(7) β ca. 15°

A stereomodel of the proposed hemiacetal structure **5**¹⁾ shows that there exists only one configuration producing an H(6)–C(6)–C(7)–H(7) dihedral angle of ca. 90°. Such spatial arrangement is consistent with the observed coupling constants of H–C(6) signal at $\delta(\text{H})$ 5.26 (i.e., ca. 0 Hz for the H(6)–C(6)–C(7)–H α (7) (dihedral angle of ca. 90°) and 7 Hz for the H(6)–C(6)–C(7)–H β (7) (dihedral angle of ca. 15°)). This stereoisomer requires an inversion of the configuration at C(6) with respect to the original 6 α -OH in hyodeoxycholic acid. The configurations at C(8) and C(9) of **5** are assumed to be the same as those proposed for **4**. The structure proposed for **5** is, therefore, 3,4,9 β -trihydroxy-6 β ,9 α -epoxy-9,10-seco-23,24-dinorchola-1,3,5(10)-trien-22-oic acid, also supported by PM3 semiempirical calculations (lower heat of formation with respect to the opposite configuration at C(6)).

Conclusions. – The biotransformations of hyodeoxycholic acid (**1**) with various *Rhodococcus* strains have furnished new metabolites, **2**, **4**, and **5**, with only a partial degradation of the side chain at C(17). On the other hand, 3-oxo-23,24-dinorchola-1,4-dien-22-oic acid (**3**), previously characterized as methyl ester, has never been proposed as substrate for KSH-catalyzed C(9)-hydroxylation. The new secosteroid **4** and **5**, rearranged in hemiacetal form, were fully characterized, and their structures suggest that the side-chain degradation and the A-ring aromatization are not necessarily consecutive processes. The new 9,10-secosteroids **4** and **5** are very promising as biologically active metabolites, so this preliminary biosynthetic approach will be applied to other bile acids.

¹⁾ Calculated using [35].

Experimental Part

General. Sodium salt of hyodeoxycholic acid has been supplied by ICE Industry [36]. The *Rhodococcus* strains (i.e., *R. aetherivorans*, *R. baikurensis*, *R. coprophilus*, *R. equi*, *R. fasciens*, *R. opacus*, *R. rhodnii*, *R. rhodococcus*, *R. rodochrous*, *R. ruber*, and *R. zopfii*) were from the Cambrex-IEP GmbH collection [37]. TLC: precoated silica-gel plates (thickness 0.25 mm; Merck) with cyclohexane/AcOEt/AcOH 60:40:1. M.p.: 510 Büchi melting-point instrument; uncorrected. UV Spectra: Jasco V630 spectrometer. IR Spectra: in CHCl₃ soln.; Perkin-Elmer 1310 grating infrared spectrometer. ¹H-, ¹³C-, and DEPT-NMR Spectra: Varian Gemini 300, at 300 (¹H) and 75 MHz (¹³C), resp.; chemical shifts, δ , referenced to the residual solvent signal (CDCl₃: δ (H) 7.26, δ (C) 77.0; CD₃OD: δ (H) 3.34, δ (C) 49.0); 2D-NMR experiments (COSY, HMQC, HMBC): Varian Mercury Plus 400, at 400 (¹H) and 100 MHz (¹³C); processed using the manufacturer's software. MS: LCQ Duo (TermoQuest, San Jose, CA, USA), equipped with an electrospray ionization (ESI) source. The biotransformation sample (1 ml) was centrifuged (6000 rpm, 15 min) to remove the cells. The supernatant was acidified to pH 2 with 1N HCl and extracted with AcOEt (1 ml), and then analyzed, and phosphomolybdic acid soln. was used as the spray reagent to visualize the steroid spots.

Biotransformation of Hyodeoxycholic Acid (1) with *Rhodococcus* spp. General Procedure. A loopful of the selected *Rhodococcus* from a culture on Plate Count Agar (PCA) was inoculated in Plate Count Broth (PCB; 10 ml) containing glucose (1 g/l), yeast extract (2.5 g/l), and tryptone (5 g/l). After 48 h at 28° and 100 rpm, a portion of this culture (1 ml) was added to the same medium (100 ml) in a 250-ml flask. The growing was continued for 48 h under the same conditions, until the absorbance (660 nm) was 5 OD. To this culture **1** as sodium salt (0.1 g) was added, and the incubation was monitored either by TLC to check the substrate disappearance or measuring the absorbance at 280 nm in order to verify the formation of aromatic derivatives [16]. After 24 h, the broth was centrifuged (6000 rpm, 15 min), and the supernatant was acidified to pH 2 with 1M HCl and extracted with AcOEt (2 × 50 ml). The org. layer was dried (Na₂SO₄), and the solvent was evaporated. The crude products were purified by column chromatography (CC; SiO₂; cyclohexane/AcOEt/AcOH 60:40:1). The results are compiled in Table 1. For the purification and the complete characterization of the metabolites **2**–**5**, the biotransformations with *R. ruber*, *R. zopfii*, and *R. aetherivorans* were repeated on prep. scale starting from **1** as sodium salt (0.5 g) added to the preinoculated medium (500 ml) in a 2-l flask, and the reactions were carried out as reported above.

6 α -Hydroxy-3-oxo-23,24-dinor-5 β -cholan-22-oic Acid (= (2S)-2-[(5R,6S,8S,9S,10R,13S,14S,17R)-Hexadecahydro-6-hydroxy-10,13-dimethyl-3-oxo-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]propanoic Acid; **2).** White crystals (MeOH/H₂O). M.p. 180–182°. IR (CHCl₃, as methyl ester): 3360, 1720. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃; selected peaks): 0.71 (s, Me(18)); 1.02 (s, Me(19)); 1.25 (d, *J* = 6.2, Me(21)); 4.05–4.18 (m, H β -C(6)). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): 212.5 (C(3)); 181.1 (C(22)); 67.6 (C(6)); 55.7; 52.5; 50.1; 42.9; 42.2; 40.2; 39.6; 37.0; 37.0; 36.2; 36.0; 34.5; 34.3; 27.2; 24.2; 22.8; 21.0 (C(19)); 17.0 (C(21)); 12.2 (C(18)). ESI-MS: 361.4 (100, [M – H][–]).

6 α -Hydroxy-3-oxo-23,24-dinorchol-1,4-dien-22-oic Acid (= (2S)-2-[(6S,8S,9S,10R,13S,14S,17R)-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-Dodecahydro-6-hydroxy-10,13-dimethyl-3-oxo-3H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]propanoic Acid; **3) [14].** White crystals (MeOH/H₂O). M.p. 270–272°. IR (CHCl₃, as methyl ester): 3360, 1720, 1650, 1610. ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD; selected peaks): 0.80 (s, Me(18)); 1.19 (d, *J* = 6.5, Me(21)); 1.27 (s, Me(19)); 4.42–4.53 (m, H β -C(6)); 6.22 (dd, *J* = 10, 2.1, H-C(2)); 6.43 (s, slight splitting, H-C(4)); 7.26 (d, *J* = 10, H-C(1)). ¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD): 186.6 (C(3)); 180.7 (C(22)); 174.6 (C(5)); 159.2 (C(1)); 127.6; 119.9; 68.8 (C(6)); 56.4; 54.0; 53.9; 45.4; 43.9; 43.8; 43.7; 40.5; 35.2; 28.3; 25.4; 23.8; 19.5 (C(19)); 17.6 (C(21)); 12.5 (C(18)). ESI-MS: 357.27 (100, [M – H][–]).

3,9 β -Dihydroxy-6 ξ ,9 α -epoxy-9,10-seco-23,24-dinorchola-1,3,5(10)-trien-22-oic Acid (= (2S)-2-[(3aR,5aS,8bS)-Decahydro-3a-hydroxy-2-(5-hydroxy-2-methylphenyl)-5a-methyl-2H-indeno[5,4-b]furan-6-yl]propanoic Acid; **4).** White crystals (MeOH/H₂O). M.p. 150–153°. IR (CHCl₃, as methyl ester): 3655, 3480, 1715, 1595. ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): see Table 2. ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD): see Table 3. ESI-MS: 355.25 (100, [M – H₂O][–]).

3,4,9 β -Trihydroxy-6 β ,9 α -epoxy-9,10-seco-23,24-dinorchola-1,3,5(10)-trien-22-oic Acid (= (2S)-2-[(2S,3aR,5aS,8bS)-2-(2,3-Dihydroxy-6-methylphenyl)-decahydro-3a-hydroxy-5a-methyl-2H-indeno[5,4-

b[*furan-6-yl*]propanoic Acid; **5**). White crystals (MeOH/H₂O). M.p. 160–162°. IR (CHCl₃, as methyl ester): 3660, 3480, 1715, 1595. ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): see Table 2. ¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD): see Table 3. ESI-MS: 371.27 (100, [*M* – H₃O][–]).

We gratefully acknowledge *Cambrex-IEP GmbH* (D-Wiesbaden) and *ICE srl* (Reggio Emilia, Italy) for financial support. We thank Mr. *Paolo Formaglio*, and Dr. *Tatiana Bernardi*, Department of Chemistry, University of Ferrara, for NMR and MS experiments, and Dr. *Valeria Ferretti*, Department of Chemistry, University of Ferrara, for PM3 semiempirical calculations and helpful discussions.

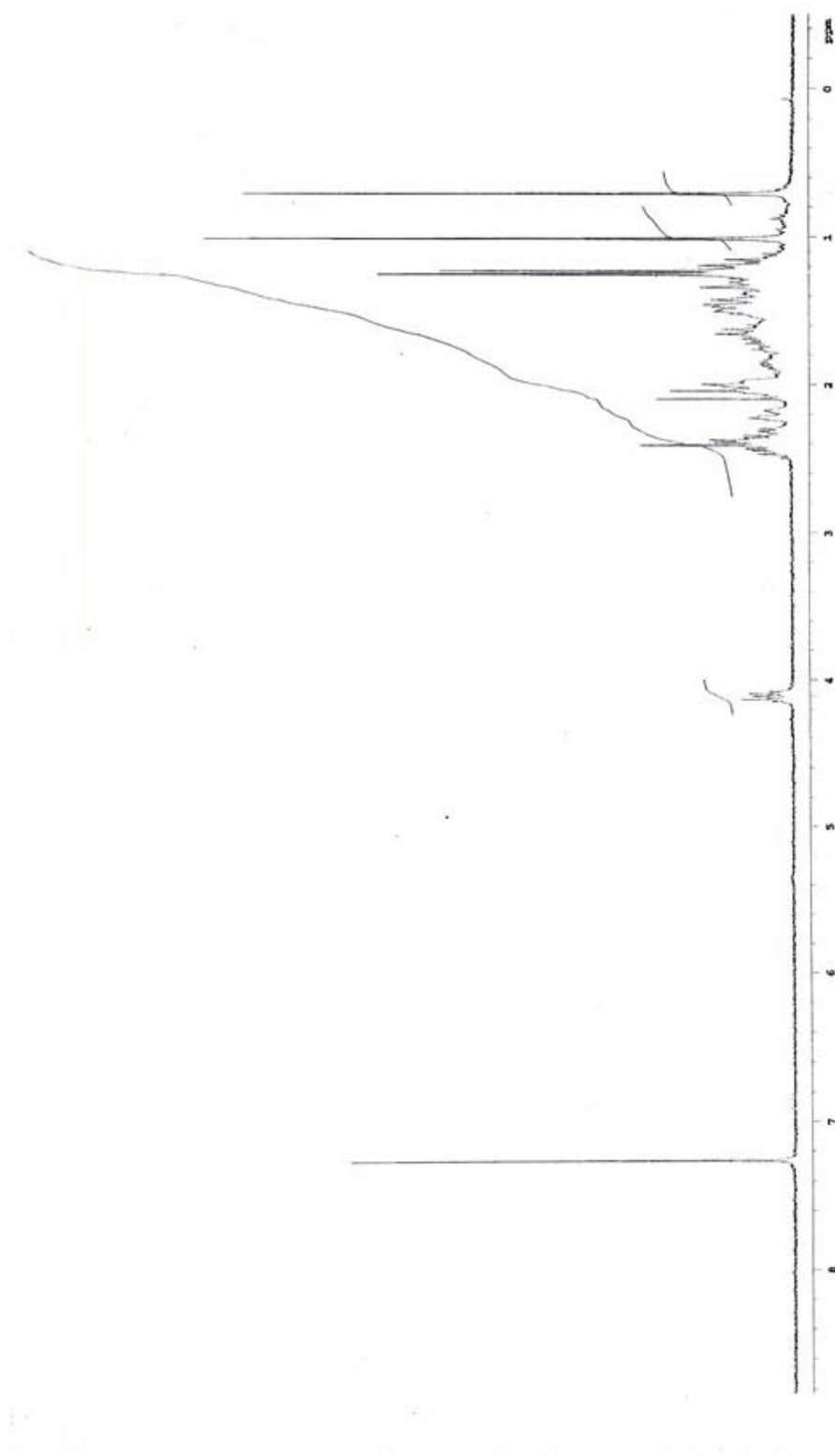
REFERENCES

- [1] A. F. Hofmann, K. J. Mysels, *Colloids Surf.* **1988**, *30*, 145.
- [2] A. Moschetta, F. Xu, L. R. Hagey, G. P. van Berge-Henegouwen, K. J. van Erpercum, J. F. Brouwers, J. C. Cohen, H. H. Hobbs, J. H. Steinbach, A. F. Hofmann, *J. Lipid Res.* **2005**, *46*, 2221.
- [3] D. W. Russel, *Ann. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 137.
- [4] D. Kim, J. S. Lee, J. Kim, S. J. Kang, J. H. Yoon, W. G. Kim, C. H. Lee, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *17*, 403.
- [5] S. Maneerat, T. Nitoda, H. Kanzaki, F. Kawai, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *67*, 679.
- [6] H. B. Bode, B. Zeggel, B. Silakowski, S. C. Wenzel, H. Reichenbach, R. Müller, *Mol. Microbiol.* **2003**, *47*, 471.
- [7] C. W. Bird, J. M. Lynch, F. J. Pirt, W. W. Reid, *Nature* **1971**, *230*, 473.
- [8] M. V. Donova, *Appl. Biochem. Microbiol.* **2007**, *43*, 1.
- [9] P. Fernandes, A. Cruz, B. Angelova, H. M. Pinheiro, J. M. S. Cabral, *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, *32*, 688.
- [10] S. B. Mahato, S. Garai, *Steroids* **1997**, *62*, 332.
- [11] B. Philipp, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *89*, 903.
- [12] S. Hayakawa, *Z. Allg. Mikrobiol.* **1982**, *22*, 309.
- [13] A. Birkenmaier, J. Holert, H. Erdbrink, H. M. Moeller, A. Friemel, R. Schoenenberger, M. J. Suter, J. Klebensberger, B. Philipp, *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 7165.
- [14] Y. Hu, R. van der Geize, G. S. Besra, S. S. Gurucha, A. Liu, M. Rohde, M. Singh, A. Coates, *Mol. Microbiol.* **2010**, *75*, 107.
- [15] J. K. Capyk, I. D'Angelo, N. C. Strynadka, L. D. Eltis, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 9937.
- [16] M. Petrusma, L. Dijkhuizen, R. van der Geize, *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 5300.
- [17] R. J. Park, *Steroids* **1984**, *44*, 175.
- [18] J. C. Knight, M. C. Novcha, *Steroids* **1985**, *46*, 789.
- [19] N. Fusetani, H. Nagata, H. Hirota, T. Tsuyuki, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 7079.
- [20] M. Ochi, K. Yamada, H. Kotsuki, K. Shibata, *Chem. Lett.* **1991**, *20*, 427.
- [21] Y. Seo, K. W. Cho, H. Chung, H.-S. Lee, J. Shin, *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1441.
- [22] Y. Seo, J. Shin, J. I. Song, *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 1291.
- [23] M. Ochi, K. Yamada, Y. Kume, H. Kotsuki, K. Shibata, *Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai* **1990**, *32*, 49.
- [24] G. Della Sala, I. Izzo, F. De Riccardis, G. Sodano, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4741.
- [25] D. F. Taber, S. C. Malcolm, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 944.
- [26] D. F. Taber, Q. Jiang, B. Chen, W. Zhang, C. L. Campbell, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4821.
- [27] G. Fantin, M. Fogagnolo, A. Medici, P. Pedrini, U. Cova, *Steroids* **1993**, *58*, 524.
- [28] A. Medici, P. Pedrini, A. De Battisti, G. Fantin, M. Fogagnolo, A. Guerrini, *Steroids* **2001**, *66*, 63.
- [29] G. Fantin, S. Ferrarini, A. Medici, P. Pedrini, S. Poli, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 1937.
- [30] P. Pedrini, E. Andreotti, A. Guerrini, M. Dean, G. Fantin, P. P. Giovannini, *Steroids* **2006**, *71*, 189.
- [31] P. P. Giovannini, A. Grandini, D. Perrone, P. Pedrini, G. Fantin, M. Fogagnolo, *Steroids* **2008**, *73*, 1385.
- [32] M. E. Tenneson, J. D. Baty, R. F. Bilton, A. N. Mason, *J. Steroid Biochem.* **1979**, *11*, 1227.
- [33] S. Barnes, D. Kirk, 'Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Bile Acids', in 'The Bile Acids – Chemistry, Physiology and Metabolism', Eds. K. D. R. Setchell, P. P. Nair, D. Kritchevsky, Plenum Press, New York-London, 1988, Vol. 4: 'Methods and Applications', Chapt. 3, p. 65.

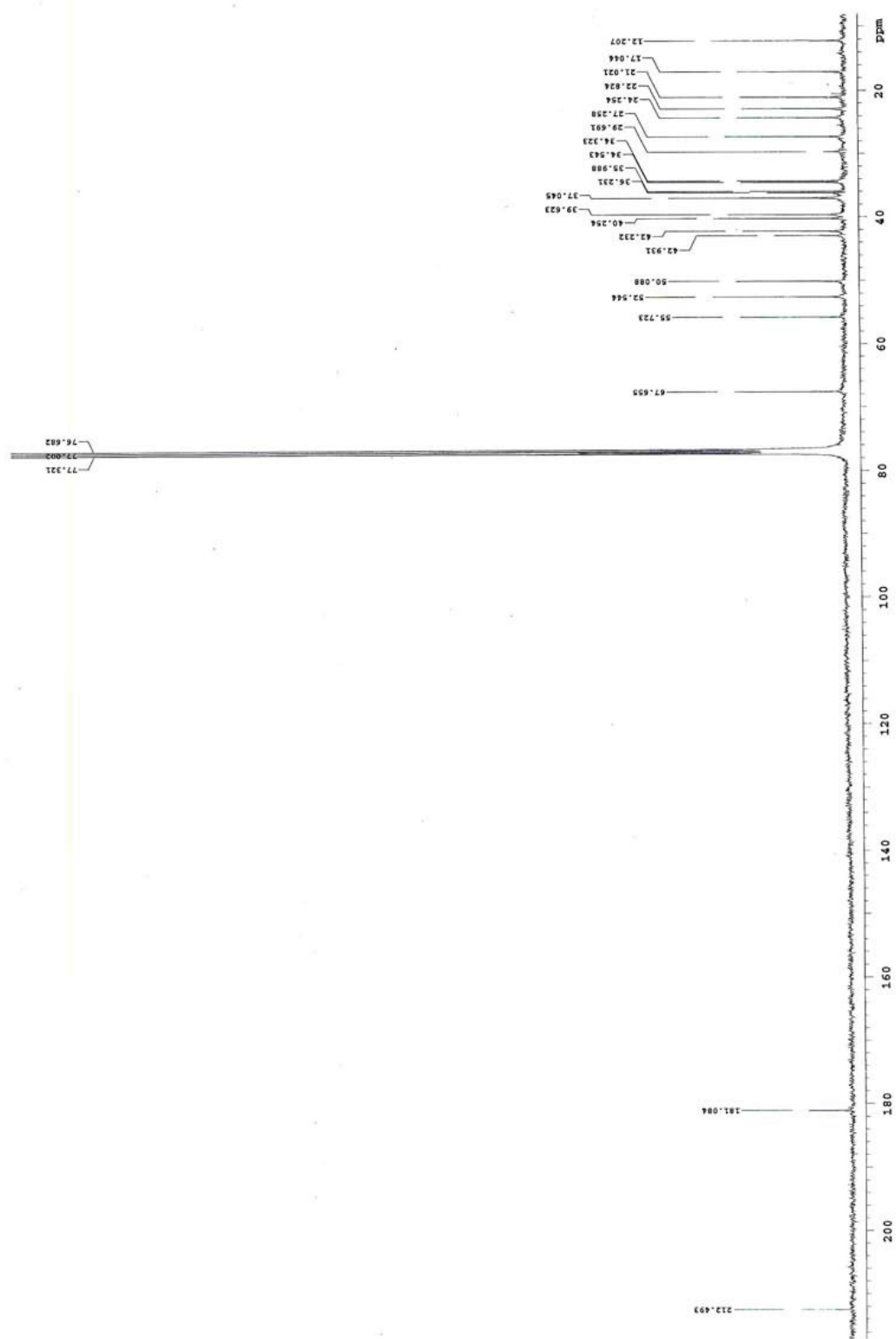
- [34] M. Horinouchia, T. Hayashia, T. Kudo, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *92*, 143.
- [35] MarvinSketch software ver. 5.4.1.1 (<http://www.chemaxon.com>).
- [36] ICE (Industria Chimica Emiliana): <http://www.iceitaly.com/>
- [37] Cambrex-IEP GmbH (Wiesbaden, Germany): <http://www.biocatalysis.com/>

Received March 22, 2012

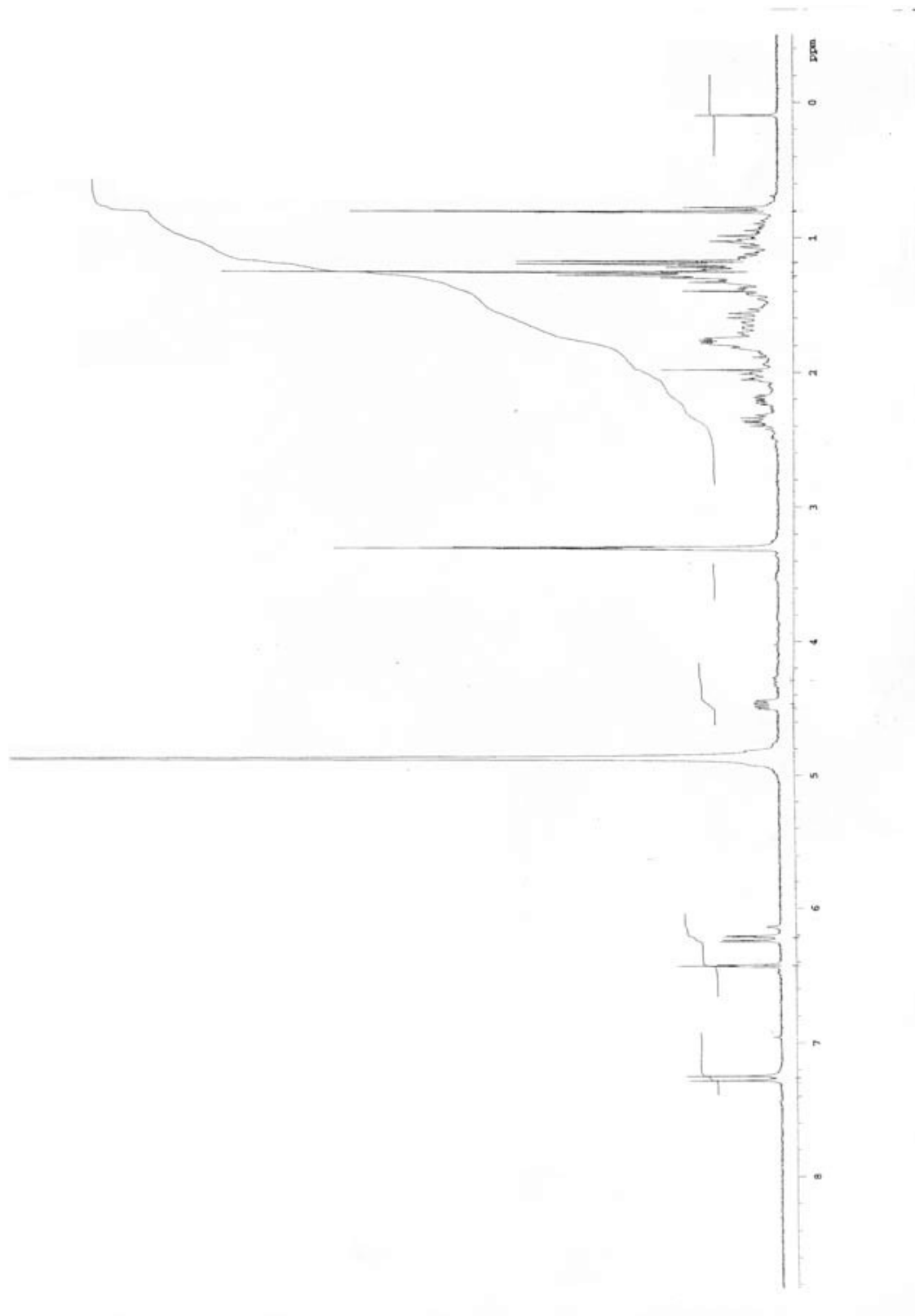
Allegato B)



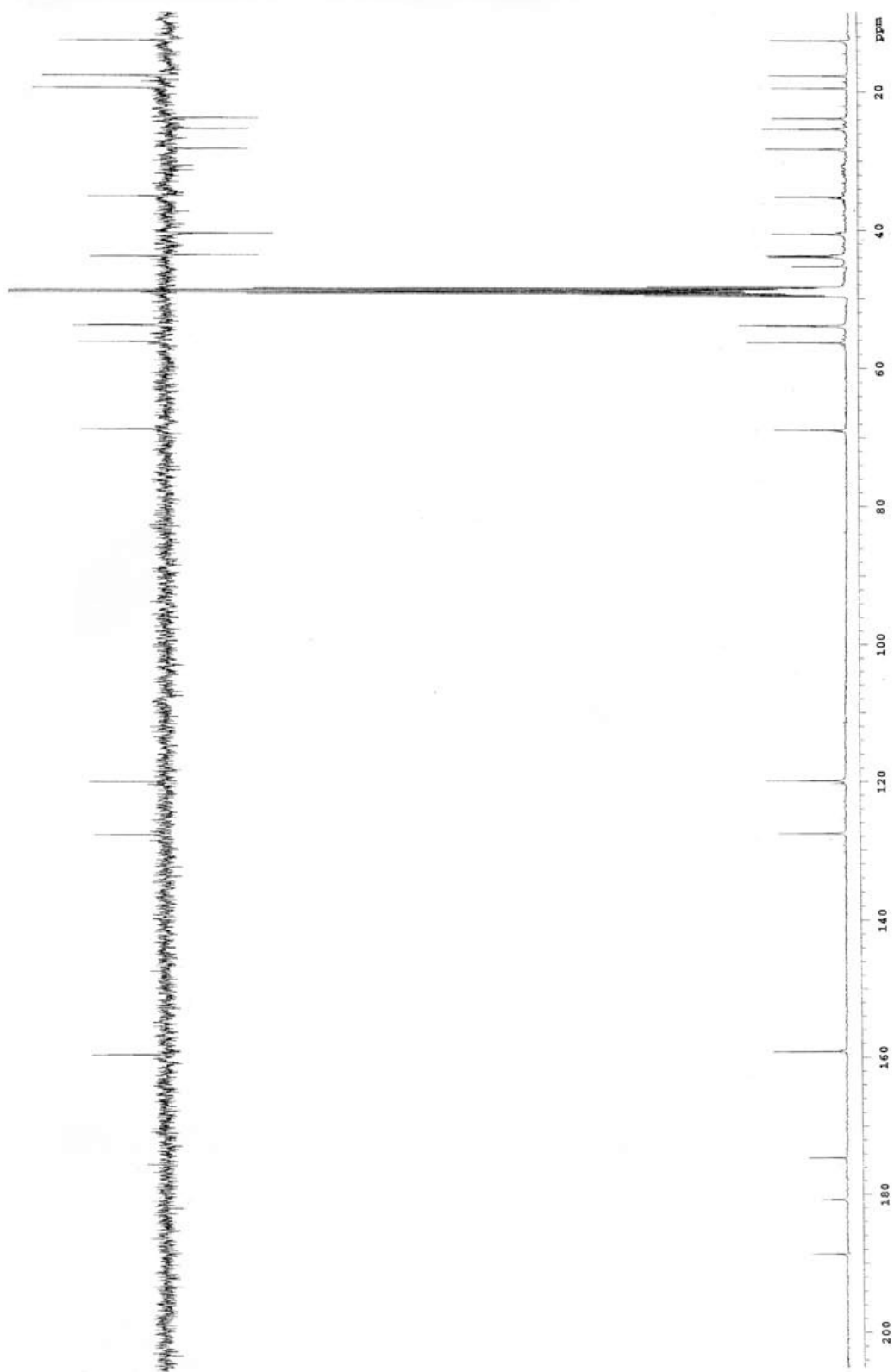
^1H NMR di acido 6α -idrossi-3-cheto-23,24-dinor- 5β -colan-22-oico **2**



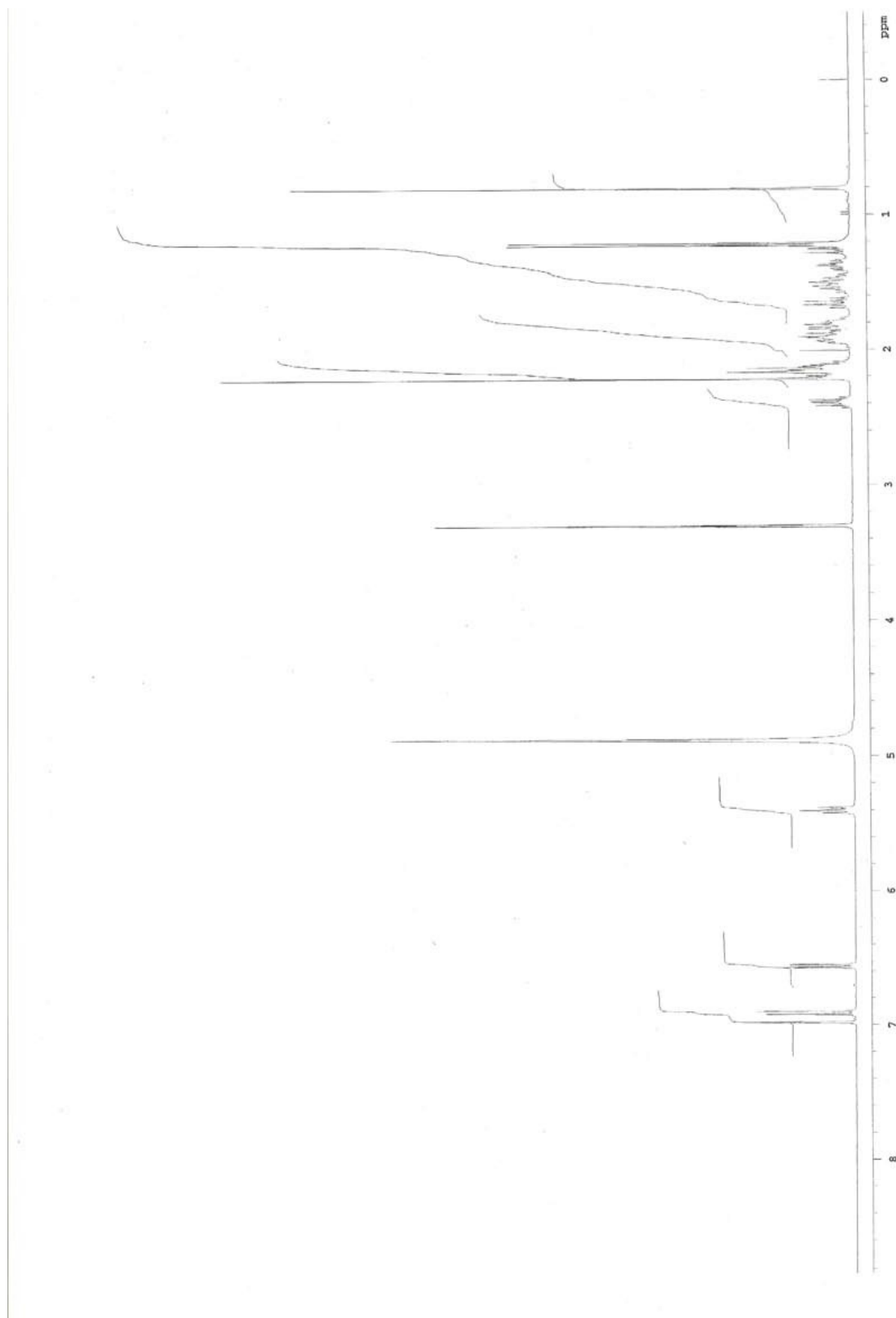
¹³C NMR di acido 6 α -idrossi-3- cheto -23,24-dinor-5 β -colan-22-oico **2**



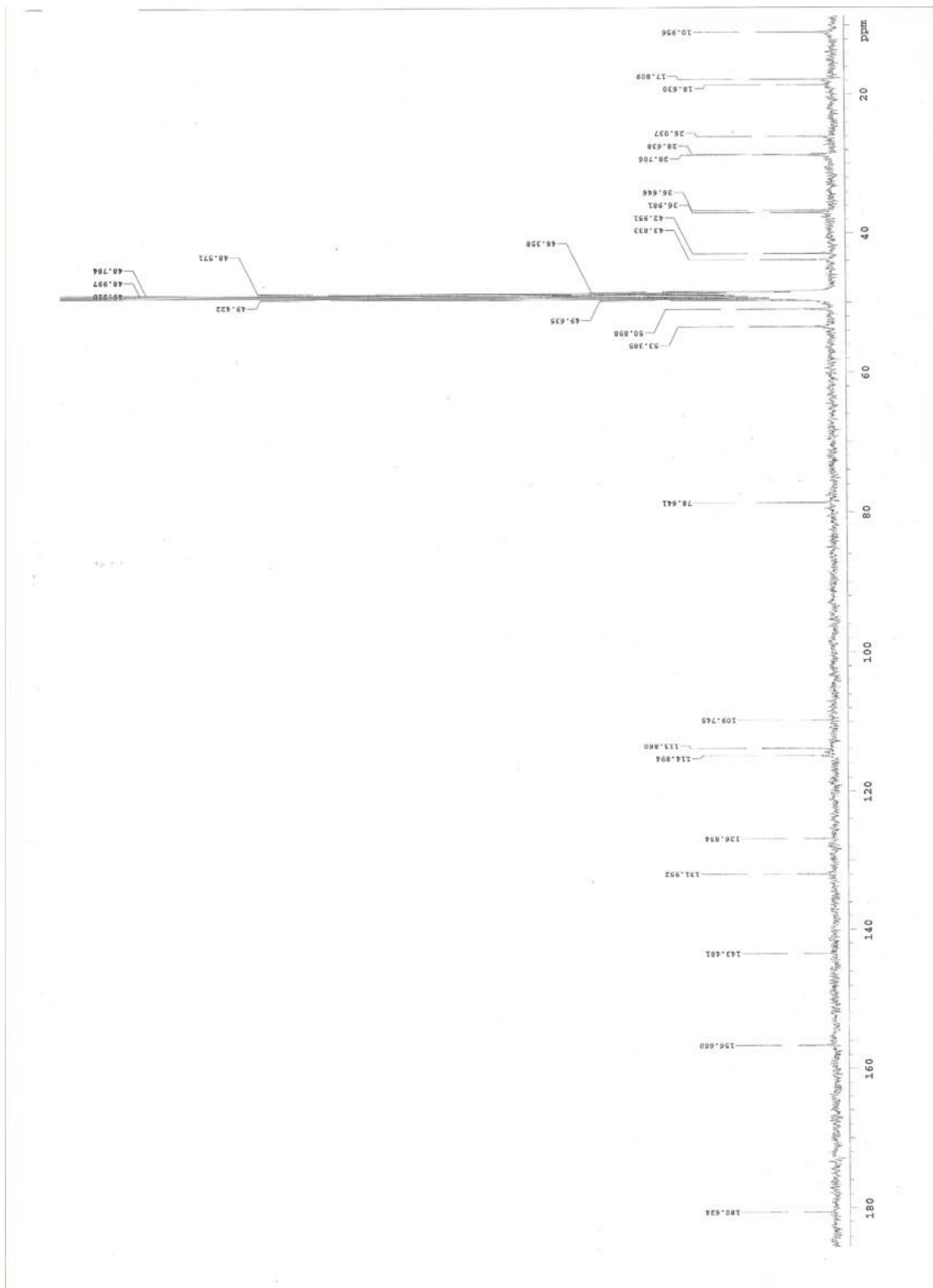
^1H NMR di acido 6α -idrossi-3- cheto -23,24-dinor- 5β -colan-1,4-diene-22-oico **3**



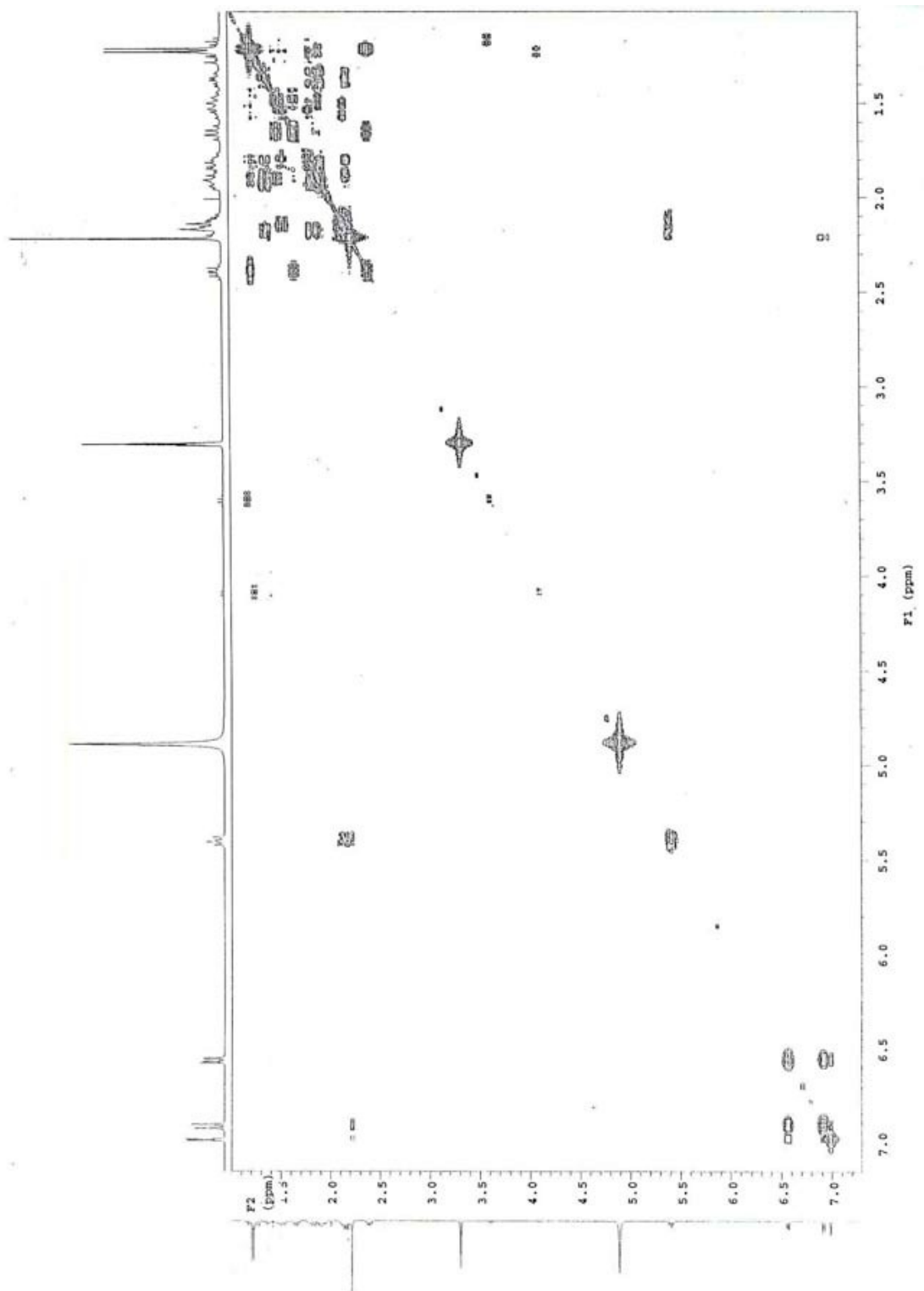
^{13}C NMR/DEPT di acido 6 α -idrossi-3- cheto -23,24-dinor-5 β -colan-1,4-diene-22-oico **3**



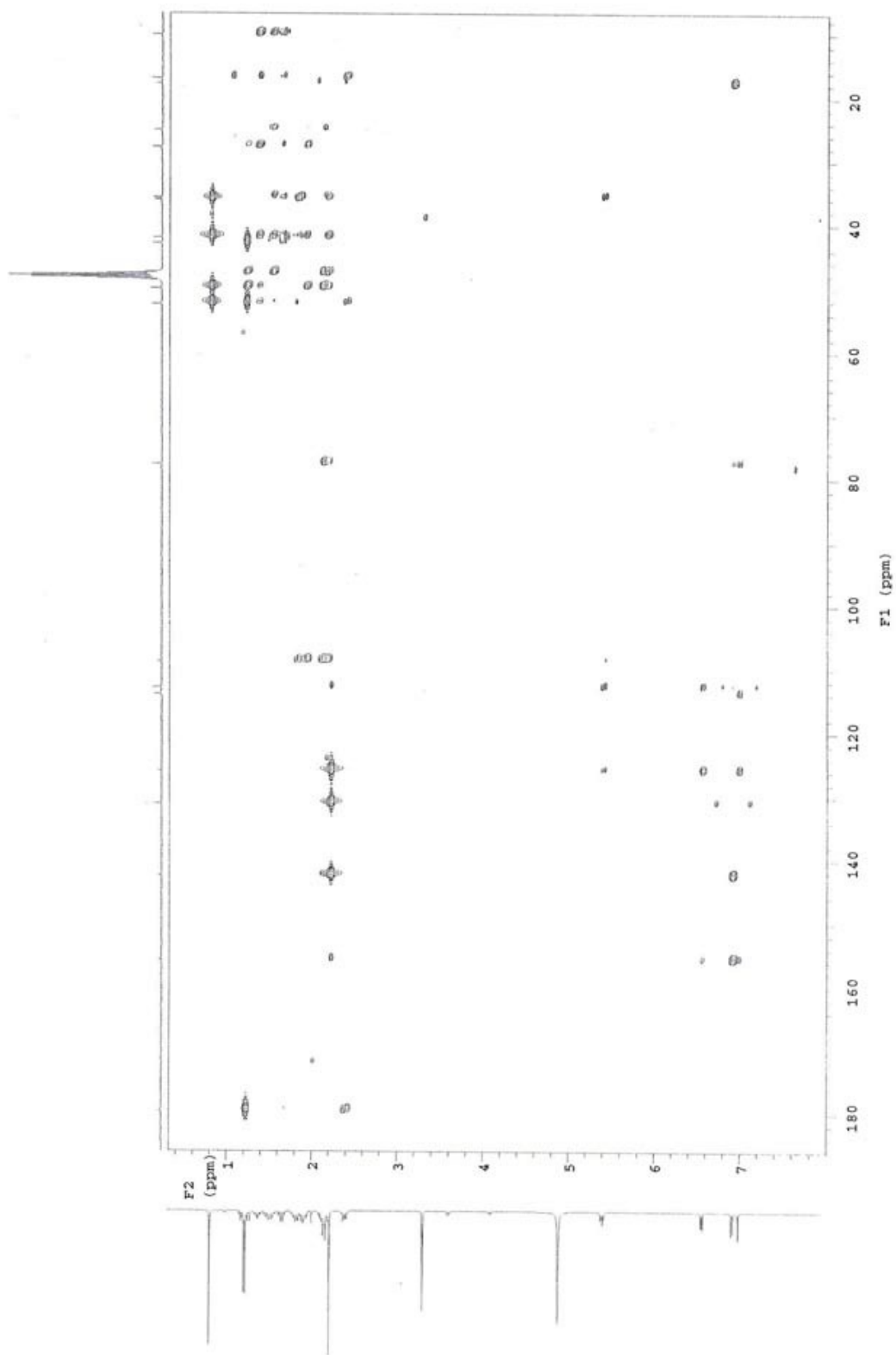
^1H NMR di acido 3,9 β -diidrossi-6 ξ ,9 α -epossi-9,10-seco-23,24-dinorcola-1,3,5(10)-trien-22-oico **4**



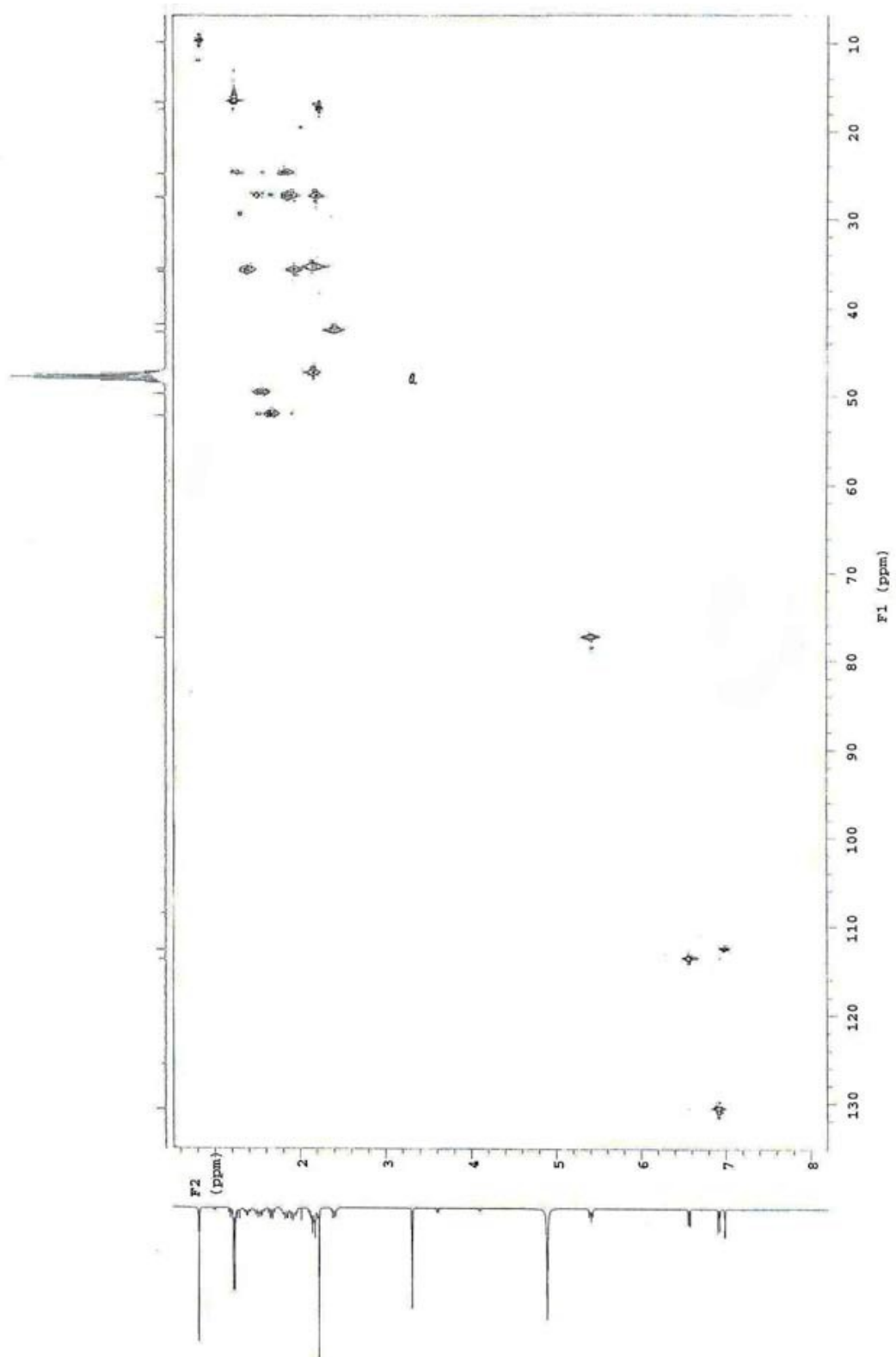
¹³C NMR di acido 3,9β-diidrossi-6ξ,9α-epossi-9,10-seco-23,24-dinorcola-1,3,5(10)-trien-22-oico 4



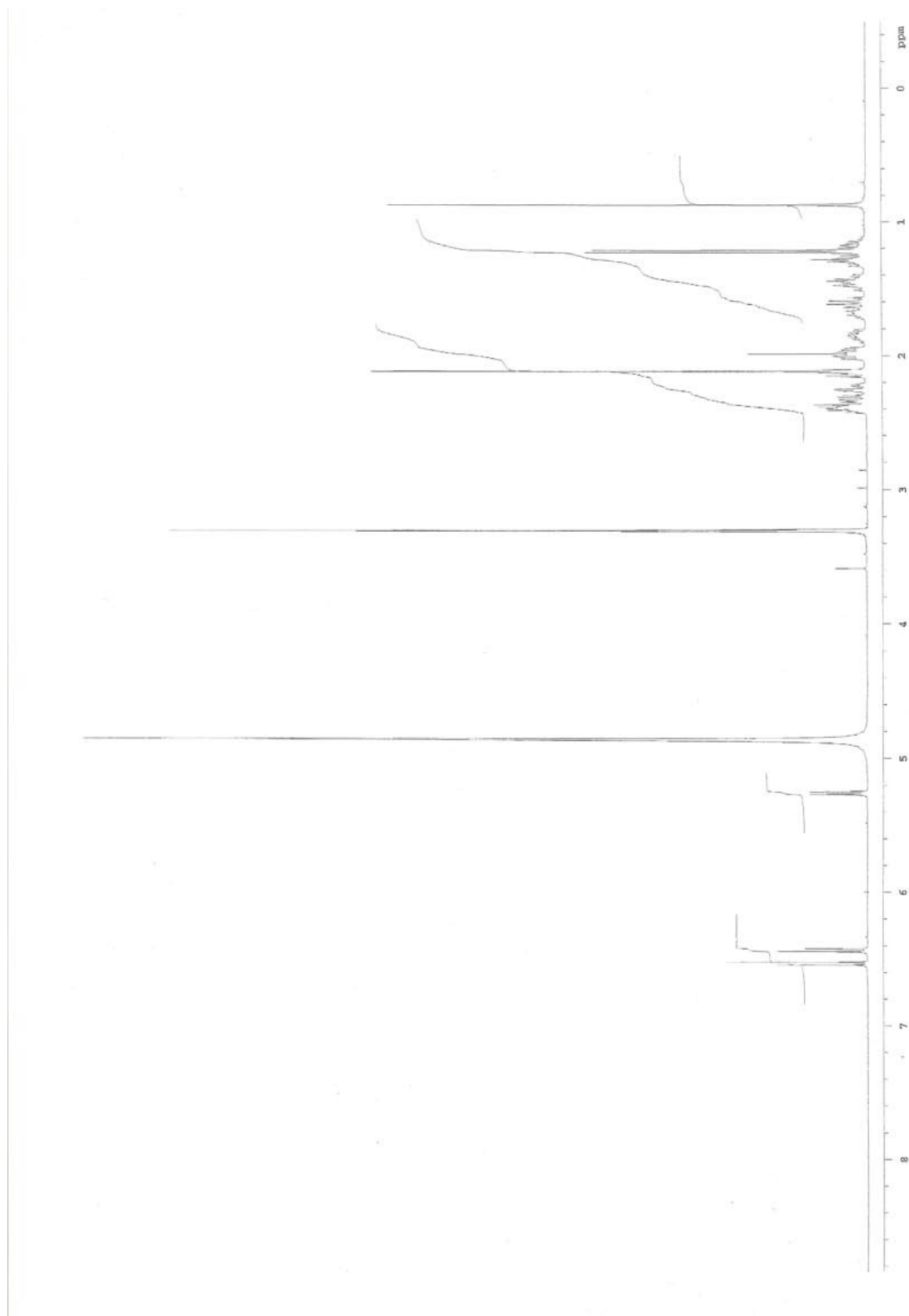
COSY di acido 3,9 β -diidrossi-6 ξ ,9 α -epossi-9,10-seco-23,24-dinorcola-1,3,5(10)-trien-22-oico **4**



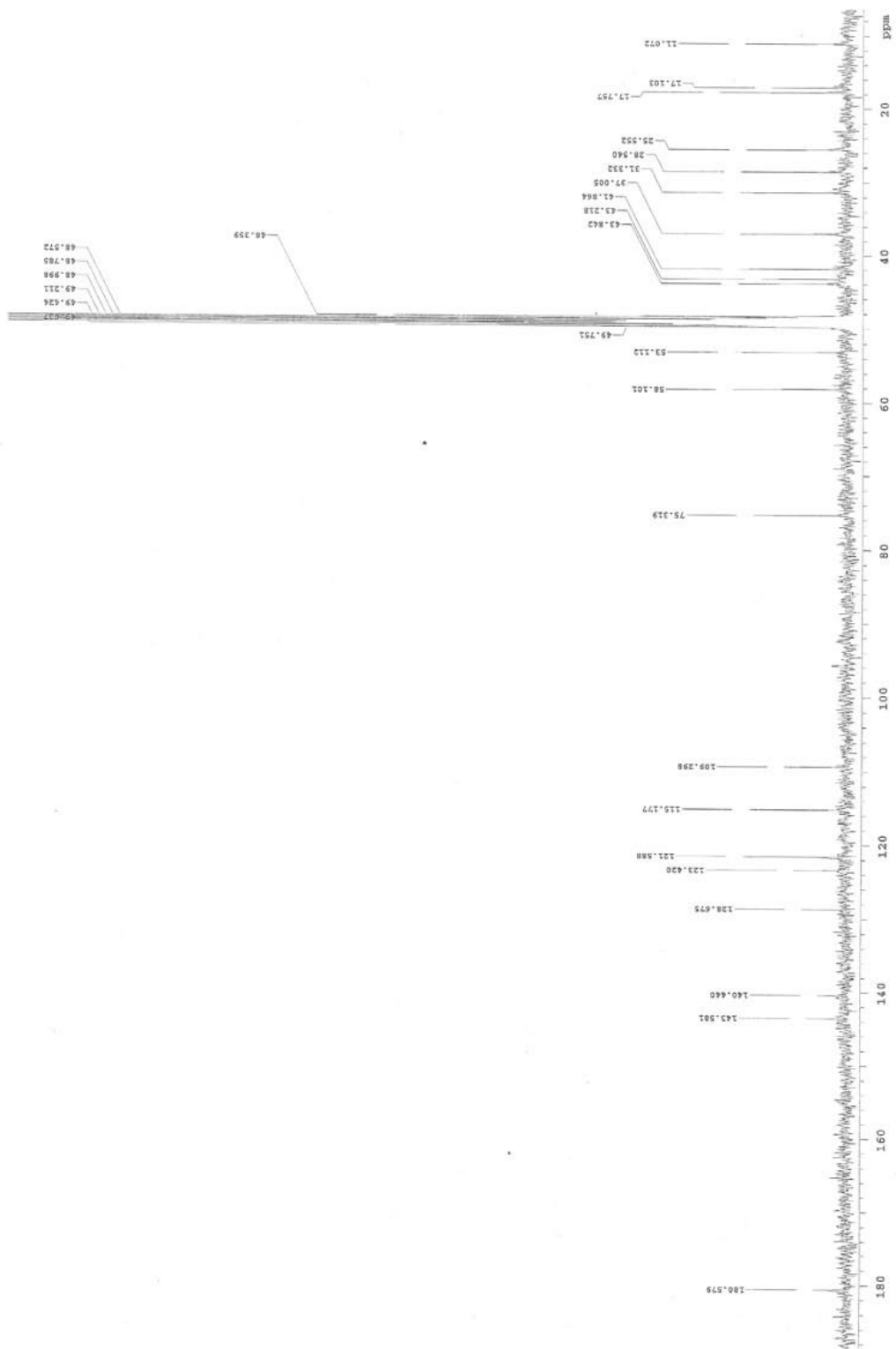
HMBC di acido 3,9 β -diidrossi-6 ξ ,9 α -epossi-9,10-seco-23,24-dinorcola-1,3,5(10)-trien-22-oico **4**



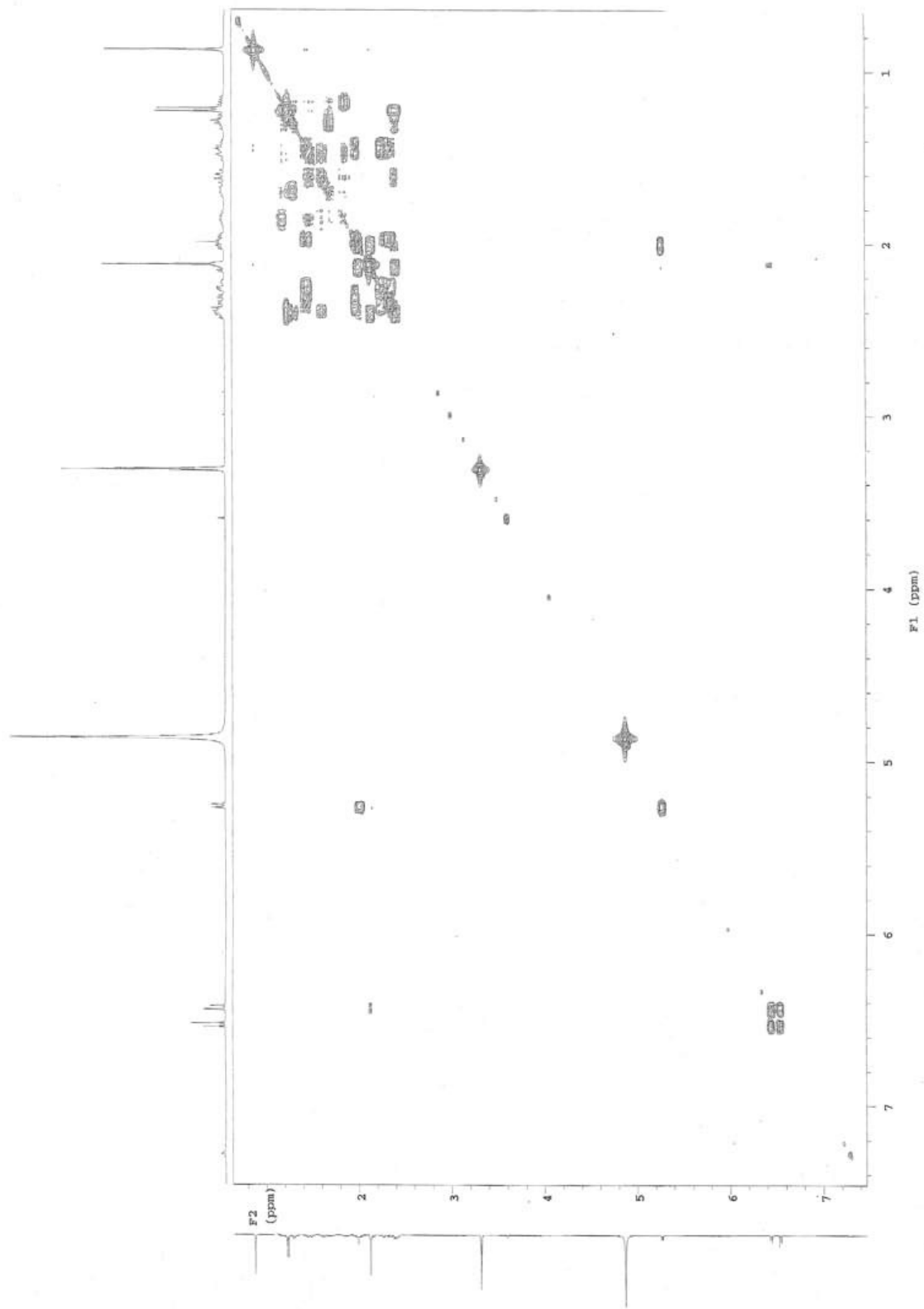
HMOC di acido 3,9 β -diidrossi-6 ξ ,9 α -epossi-9,10-seco-23,24-dinorcola-1,3,5(10)-trien-22-
oico 4



^1H NMR di acido 3,4,9 β -Triidrossi-6 β ,9 α -epossi-9,10-seco-23,24-dinorcola-1,3,5(10)-trien-22-oico **5**

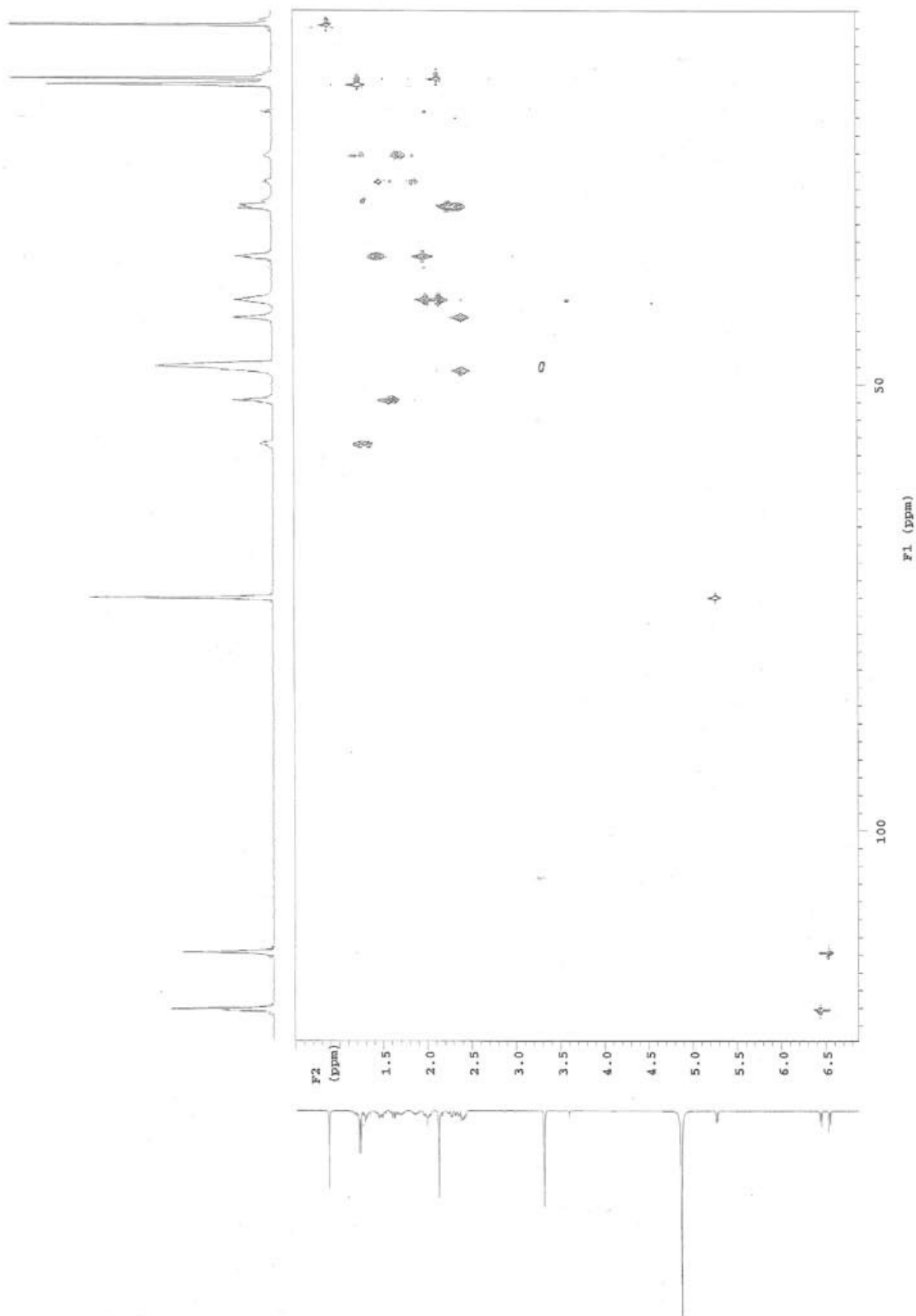


¹³C NMR di acido 3,4,9 β -triidrossi-6 β ,9 α -epossi-9,10-seco-23,24-dinorcola-1,3,5(10)-trien-22-oico **5**

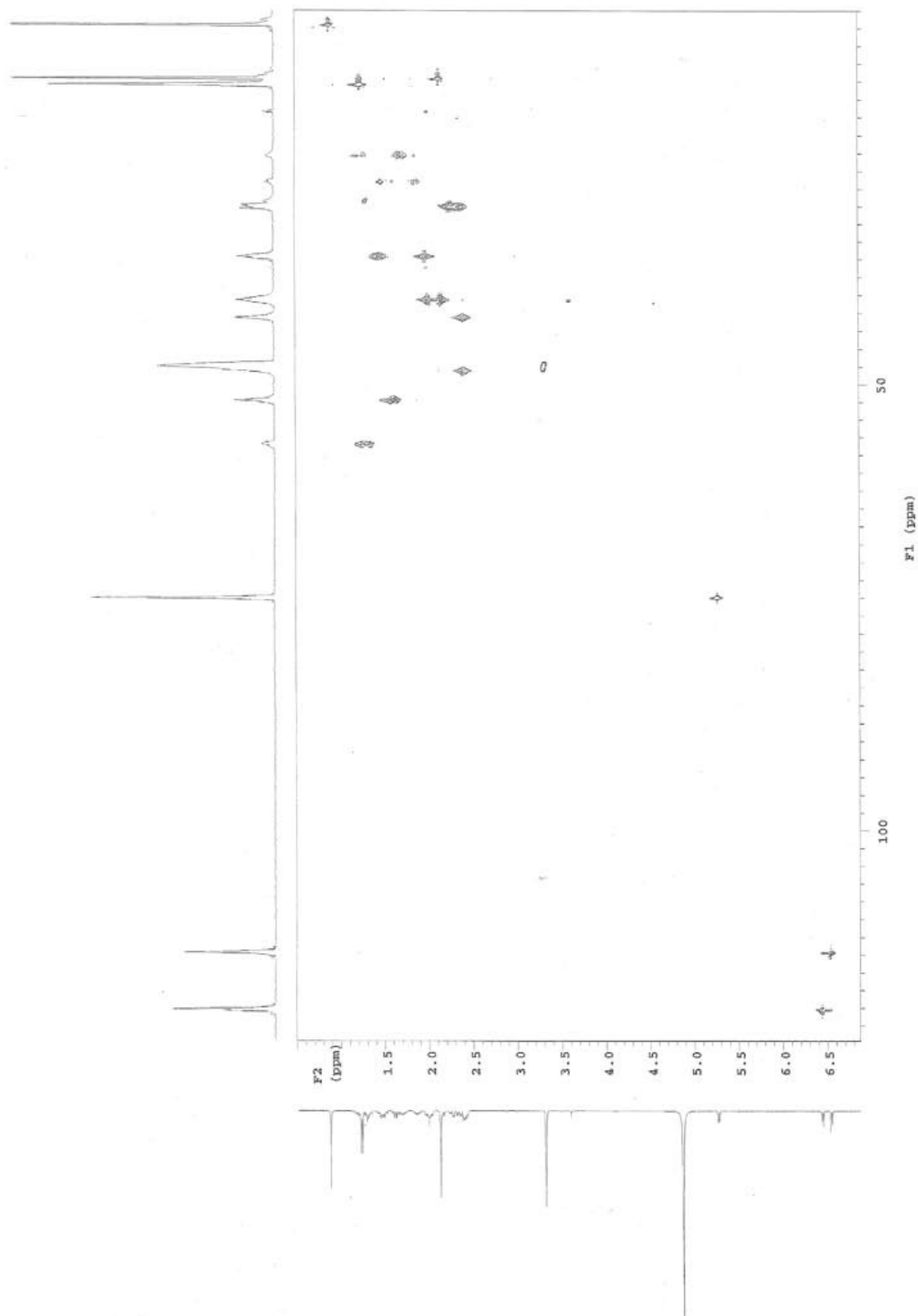


COSY di acido 3,4,9 β -triidrossi-6 β ,9 α -epossi-9,10-seco-23,24-dinorcola-1,3,5(10)-trien-
22-oico **5**

HMBC di acido 3,4,9 β -triidrossi-6 β ,9 α -epossi-9,10-seco-23,24-dinorcola-1,3,5(10)-trien-
22-oico **5**



HMPC di acido 3,4,9 β -triidrossi-6 β ,9 α -epossi-9,10-seco-23,24-dinorcola-1,3,5(10)-trien-22-oico **5**



HMQC di acido 3,4,9 β -triidrossi-6 β ,9 α -epossi-9,10-seco-23,24-dinorcola-1,3,5(10)-trien-22-oico **5**

CAPITOLO 4

9,10-Secosteroidi da acidi biliari con *Rhodococcus ruber*

I nuovi 9,10-secosteroidi ottenuti dalla biotrasformazione dell'acido iodesossicolico (Capitolo 3) con alcuni ceppi di *Rhodococcus*, hanno permesso di focalizzare l'attenzione su *Rhodococcus ruber* studiando le biotrasformazioni di questo ceppo con altri acidi biliari (i.e. acido colico, acido desossicolico e acido iocolico).

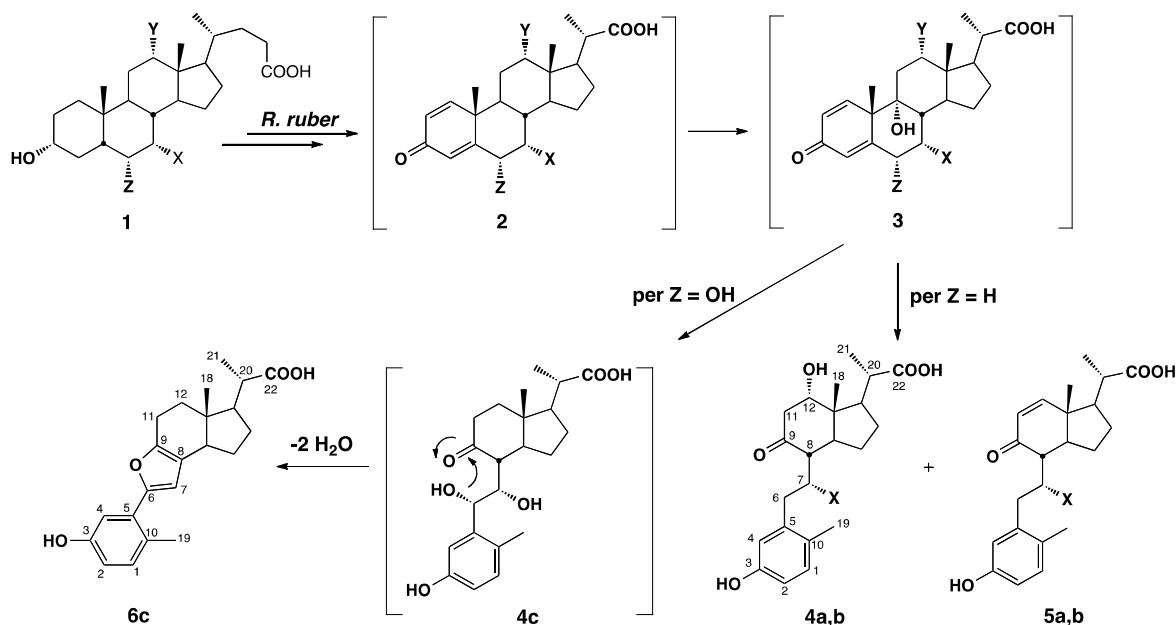
Nel capitolo precedente è stato messo in evidenza che nelle biotrasformazioni di acido iodesossicolico i prodotti ottenuti presentavano solo una parziale degradazione della catena laterale in C₁₇, e questo aveva permesso ugualmente l' α -idrossilazione in posizione C₉ da parte di KSH fornendo i due 9,10-secosteroidi riarrangiati in forma emiacetaleica.

La 9 α -idrossilazione rappresenta è lo stadio che permette la C₉-C₁₀-apertura dell'anello B e l'enzima KSH utilizza come substrati i 3-cheto-1,4-diene derivati (Capitolo 1). E' riportato in letteratura che l'attività di tale enzima era influenzata anche dalla configurazione del gruppo ossidrile in posizione C₁₂, ove presente [82]. Infatti in lavori precedenti a quello riportato nel Capitolo 3 tutti i 9,10-secosteroidi ottenuti dalla degradazione batterica di acidi biliari aventi un gruppo idrossilico in posizione C₁₂ contengono esclusivamente gruppi β -ossidrili [57] [83]. Il gene che codifica per l'enzima che inverte la configurazione dell'ossidrile in posizione C₁₂ è stato identificato in *Comamonas testosteroni* [83], e questa epimerizzazione sembrava facilitare l' α -idrossilazione in C₉.

In questo lavoro, che è stato oggetto di pubblicazione (vedi allegato A), vengono riportati i risultati ottenuti dalle biotrasformazioni di diversi acidi biliari (acido colico **1a**, acido desossicolico **1b** e acido iocolico **1c**) con *Rhodococcus ruber*, uno dei ceppi in grado di produrre 9,10-secosteroidi nelle biotrasformazioni con acido iodesossicolico [86] (Schema e Tabella 1).

Tabella 1. Biotrasformazioni degli acidi biliari **1a-1c** con *Rhodococcus ruber*

Acido biliare	Tempo (h)	4 (resa %)	5 (resa %)	6 (resa %)
1a	24	4a (54)	5a (6)	
1b	24	4b (55)	5b (20)	
1c	24			6c (35)



Schema

La biotrasformazione di **1a** (1 g/l) con *R. ruber* ha fornito, dopo 24 ore di incubazione a 28°C, l'acido 3,7 α ,12 α -triidrossi-9-osso-9,10-seco-23,24-dinorcolan-1,3,5(10)-trien-22-oico **4a** (54%) e l'acido 3,7 α -diidrossi-9-cheto-9,10-seco-23,24-dinorcolan-1,3,5(10),11-tetraene-22-oico **5a** (6%). Analogamente la biotrasformazione di **1b** fornisce l'acido 3,12 α -diidrossi-9-cheto-9,10-seco-23,24-dinorcolan-1,3,5(10)-triene-22-oico **4b** (55%) e l'acido 3-idrossi-9-cheto-9,10-seco-23,24-dinorcolan-1,3,5(10)-tetraene-22-oico **5b** (20%). In entrambi i casi il substrato di partenza viene completamente consumato.

I prodotti **4** e **5** si ottengono mediante un percorso comune (Schema) che procede con l'ossidazione del gruppo ossidrilico in posizione C₃, la parziale degradazione della catena laterale e la deidrogenazione dei legami C₁-C₂ e C₄-C₅ con formazione del 3-cheto-1,4-diene derivato **2** che viene poi idrossilato da KSH a livello del C₉ per dare l'intermedio **3**. L'idrossilazione in C₉ comporta la rottura spontanea del legame C₉-C₁₀ formando il 9-cheto-9,10-secosteroide **4**. Successivamente, i composti **4a** e **4b** (da **1a** e **1b**, rispettivamente) sono parzialmente deidratati ai corrispondenti enoni **5a** e **5b**.

Una via analoga viene seguita dalla biotrasformazione di acido iocolico **1c** con *R. ruber* che fornisce l'acido 3-idrossi-6,9-epossi-9,10-seco-23,24-dinorcolan-1,3,5(10),6,8-

pentaene-22-oico **6c** con resa del 35%. In questo caso il 9,10-secosteroide **4c** non viene isolato ma evolve al derivato furanico **6c** per attacco del gruppo ossidrilico in C₆ sul gruppo carbonilico in C₉, originando il corrispondente emiacetale che spontaneamente elimina due molecole d'acqua.

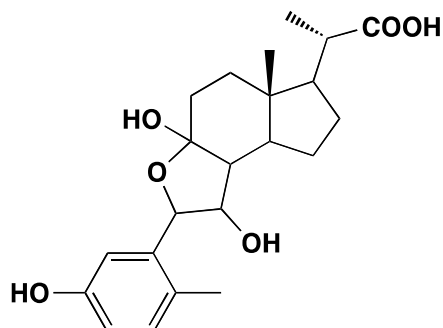


Figura 1. Struttura emiacetalica di **1c**

Questa ipotesi è supportata dai derivati emiacetalici ottenuti dalle biotrasformazioni dell'acido iodesossicolico [86].

I nuovi secosteroidi **4a**, **4b**, **5a**, **5b** e **6c** sono stati caratterizzati grazie metodologie spettroscopiche integrate come MS, IR, NMR e NMR-2D. I dati dei vari composti sono riportati nelle Tabelle 2, 3 e 4.

Tabella 2. Segnali ¹H-NMR selezionati di **4a**, **4b**, **5a** e **5b**. (400 MHz in CD₃OD)

	4a	4b	5a	5b
H-C(1)	6.93 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.2)	6.89 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.2)	6.93 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.2)	6.90 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.2)
H-C(2)	6.52 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8.0, 2.7)	6.48 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8.2, 2.7)	6.52 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8.0, 2.7)	6.50 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8.0, 2.7)
H-C(4)	6.62 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2.7)	6.56 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2.7)	6.68 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2.7)	6.58 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2.7)
H-C(7)	3.90-3.96 (<i>m</i>)	n.a.	4.14-4.20 (<i>m</i>)	n.a.
H-C(11)	n.a.	n.a.	5.80 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9.4)	5.85 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9.4)
H-C(12)	4.06-4.10 (<i>m</i>)	4.13 (<i>m</i>)	7.39 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9.4)	7.45 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9.4)
H-C(18)	0.91 (<i>s</i>)	1.03 (<i>s</i>)	0.90 (<i>s</i>)	0.98 (<i>s</i>)
H-C(19)	2.20 (<i>s</i>)	2.20 (<i>s</i>)	2.20 (<i>s</i>)	2.20 (<i>s</i>)
H-C(21)	1.25 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6.5)	1.25 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6.5)	1.35 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6.5)	1.35 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6.5)

n.a.: non assegnati

Tabella 3. Segnali ^{13}C -NMR selezionati di **4a**, **4b**, **5a** e **5b**. (400 MHz in CD_3OD)

	4a^a	4b^a	5a^a	5b^a
C(1)	132.0	131.8	131.9	131.9
C(2)	114.1	113.6	114.1	113.7
C(3)	156.2	156.3	156.1	156.4
C(4)	117.9	116.7	118.0	116.7
C(5)	140.2	143.3	139.9	143.0
C(7)	71.8	n.a.	72.3	n.a.
C(9)	213.2	213.6	202.8	204.5
C(10)	128.4	127.7	128.5	127.6
C(11)	n.a.	n.a.	130.4	129.5
C(12)	73.6	73.9	159.0	159.0
C(18)	12.6	12.6	14.2	13.9
C(19)	18.8	18.5	18.7	18.5
C(21)	16.8	16.9	17.7	17.9
C(22)	180.6	180.6	179.9	180.6

n.a.: Non assegnati.

Tabella 4. Segnali ^1H -NMR e ^{13}C -NMR di **6c**. (400 MHz in CD_3OD)

Posizione	$\delta(\text{H})$	$\delta(\text{C})$
1	7.00 (<i>d</i> , $J = 8.3$)	133.1
2	6.57 (<i>dd</i> , $J = 8.3, 2.7$)	114.8
3	--	152.9
4	7.08 (<i>d</i> , $J = 2.7$)	113.6
5	--	125.8
6	--	156.4
7	6.33 (<i>s</i>)	109.1
8	--	122.6
9	--	150.2
10	--	129.4
11	2.7-2.77 (<i>m</i>)	22.0
12	1.67-1.76 (<i>m</i>)/2.21-2.29 (<i>m</i>)	36.4
13	--	45.0
14	2.61-2.69 (<i>m</i>)	49.8
15	1.41-1.53 (<i>m</i>)/1.91-2.00 (<i>m</i>)	24.5
16	1.56-1.66 (<i>m</i>)/2.00-2.00 (<i>m</i>)	29.7
17	1.77-1.85 (<i>m</i>)	51.6
18	0.69 (<i>s</i>)	11.3
19	2.34 (<i>s</i>)	21.4
20	2.40-2.51 (<i>m</i>)	44.2
21	1.27 (<i>d</i> , $J = 6.8$)	18.0
22	--	180.7

In conclusione le biotrasformazioni degli acidi colico, desossicolico e iocolico (**1a**, **1b** e **1c** rispettivamente) con *Rhodococcus ruber* producono cinque nuovi metaboliti (**4a** e **4b**, **5a** e **5b** e **6c**) con la catena laterale in C₁₇ parzialmente degradata a conferma del fatto che gli acidi 3-cheto-23,24-dinorcolan-1,4-diene-22-oiici **2a-2c** sono i substrati dell'idrossilazione catalizzata da KSH. La struttura di questi composti supporta l'ipotesi che la degradazione della catena laterale e l'aromatizzazione dell'anello A non sono necessariamente processi consecutivi. Inoltre, i nuovi secosteroidi **4a** e **4b** sono i primi esempi di 9,10-secosteroidi isolati da degradazioni batteriche di acidi biliari, che mantengono il gruppo C₁₂-ossidrilico in posizione α , quindi l'inversione di configurazione di tale gruppo funzionale sembra non essere necessaria per la successiva rottura dell'anello B. Infine, il 9,10-secosteroide **6c** deriva dal riarrangiamento in forma emiacetalica di **4c** e dalla successiva perdita di due molecole d'acqua che comporta la formazione del derivato furanico.

La caratterizzazione dei nuovi 9,10-secosteroidi sintetizzati, la descrizione della procedura sperimentale e il dettaglio dei materiali e metodi utilizzati vengono riportati nell'articolo (allegato **A**) e gli spettri ¹H- e ¹³C-NMR nell'allegato **B**.

New 9,10-Secosteroids from Biotransformations of Bile Acids with *Rhodococcus ruber*

by Stefania Costa^a), Pier Paolo Giovannini^b), Giancarlo Fantin^b), Alessandro Medici^b),
and Paola Pedrini^{*a})

^a) Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie, Università di Ferrara, Via L. Borsari 46,
IT-44121 Ferrara (phone + 390532455700; fax + 390532455715; e-mail: pdp@unife.it)

^b) Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche, Università di Ferrara, Via Fossato
di Mortara 17–27, IT-44121 Ferrara

The biotransformations of cholic, deoxycholic, and hyocholic acids with *Rhodococcus ruber* are reported. In all biotransformations, the C₁₇-side chain is partially degraded, and the new 9,10-secosteroids **4a** (54%) and **4b** (55%) are obtained from cholic and deoxycholic acids, respectively. The loss of H₂O from C(11)–C(12) of secosteroids **4a** and **4b** affords the compounds **5a** (5%) and **5b** (20%), respectively. On the other hand, in the biotransformation of hyocholic acid with *R. ruber* the 9,10-secosteroid **4c** is not detected, but, rearranging to an intramolecular hemiacetal form, it evolves to the final furan derivative **6c** (35%) by easy elimination of two molecules of H₂O. The new secosteroids were characterized by IR, NMR, and 2D-NMR spectroscopy, and mass spectroscopy.

Introduction. – Aerobic bacterial degradation of bile salts was intensely investigated, and a general scheme based on the structure of isolated degradation intermediates have been proposed [1]. A recent review [2] suggests that the biotransformation pathway of bile acids (*Fig. 1*) starts with the oxidation of the OH group at C(3), followed by the dehydrogenation of the C(1)–C(2) and C(4)–C(5) bonds to the 3-oxo 1,4-diene structures.

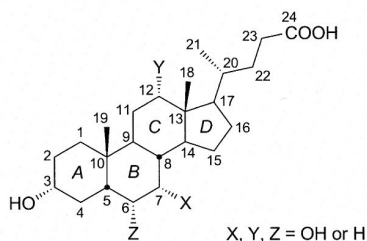


Fig. 1. Structures of bile acids

At the same time, the acidic side chain is removed by two consecutive β -oxidation steps [3] yielding an androsta-1,4-diene-3,17-dione derivative (ADD) bearing various OH groups depending on the starting bile salt (*Fig. 2*).

ADDs are subject to hydroxylation at C(9) by 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase (KSH), a two-component iron-sulfur-containing monooxygenase [4–6]. This reaction leads to the spontaneous cleavage of the B-ring by a *retro*-aldol cleavage, and the

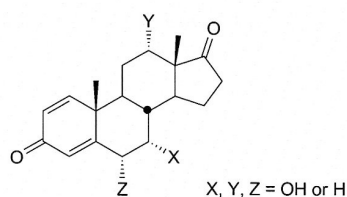


Fig. 2. Structure of ADD

aromatic 9,10-secosteroids are obtained [7]. This crucial step to 9,10-secosteroid derivatives occurs only with 3-oxo-1,4-diene bile acids, and the KSH activity appears to be affected by the hindrance of the side chain at C(17) and, if present, by the configuration of the HO–C(12) group.

Considering the large number of 17-oxo-secosteroids isolated from steroid bacterial degradations [2][8–14], the presence of a C(17)=O group seems to be a prerequisite for the KSH catalysis. There is only one example of a 9,10-secosteroid obtained from bacterial degradation with a partially degraded (3 C-atoms) acidic side chain at C(17) (*i.e.*, *Mycobacterium fortuitum* degradation of cholesterol and phytosterols [15]). In addition, all 9,10-secosteroids obtained from bacterial degradation of 12 α -OH bile acids contain exclusively 12 β -OH groups [2][16–18]. The gene, encoded for the enzyme that inverts the configuration of the HO–C(12) group, has been identified in *Comamonas testosteroni* [18], and this epimerization seems to facilitate the 9 α -hydroxylation.

In a recent work, we have pointed out that the complete degradation of the side chain at C(17) is not essential for KSH 9 α -hydroxylation, since two 9,10-secosteroids were obtained with a partial degradation of the side chain at C(17) by biotransformation of hyodeoxycholic acid with some *Rhodococcus* spp. [19].

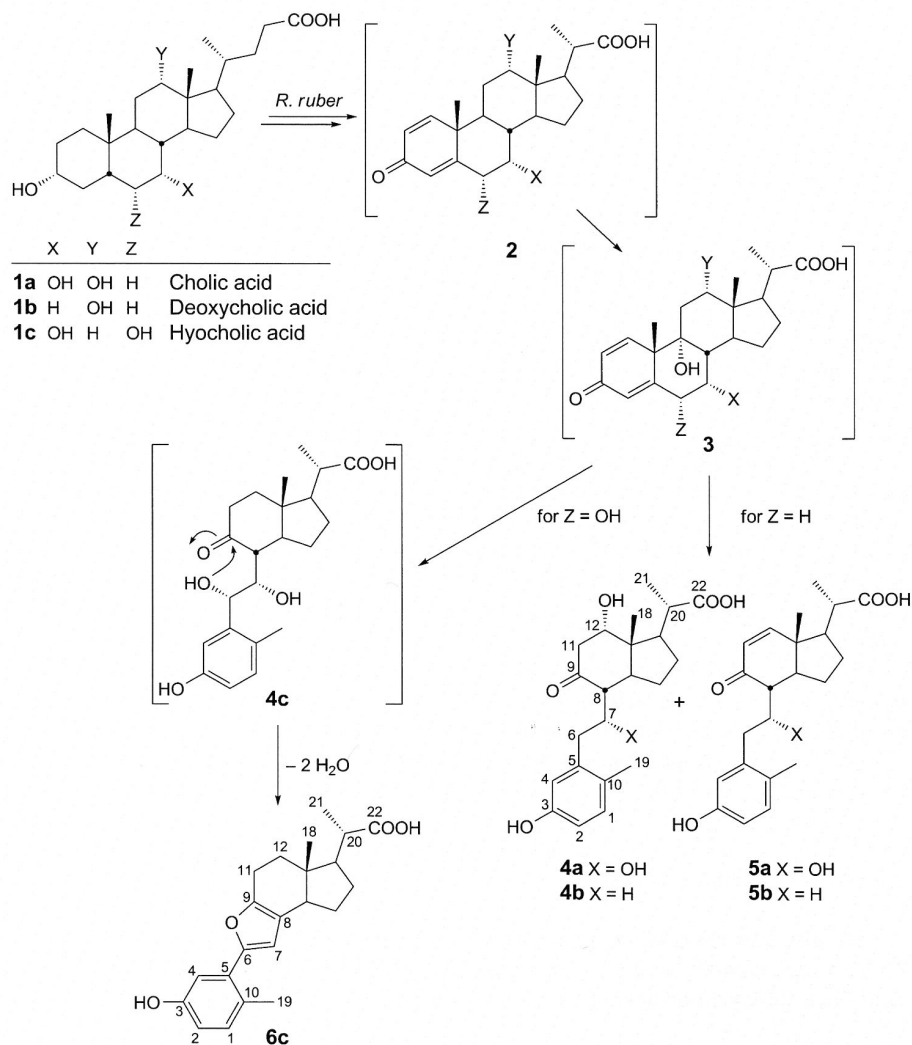
Herein, we report the biotransformation of various bile acids (*i.e.*, cholic acid (**1a**), deoxycholic acid (**1b**), and hyocholic acid (**1c**)) with *Rhodococcus ruber*. A series of new 9,10-secosteroids with a partial degradation of the side chain at C(17) are obtained (*Scheme*) and characterized.

Results and Discussion. – *Rhodococcus ruber*, able to produce 9,10-secosteroids with hyodeoxycholic acid [19], was also employed in the biotransformations of cholic acid (**1a**), deoxycholic acid (**1b**), and hyocholic acid (**1c**) (*Table 1*).

Table 1. Biotransformations of Bile Acids **1a–1c** with *Rhodococcus ruber*

Bile acids	Time [h]	4 (Yield [%])	5 (Yield [%])	6 (Yield [%])
1a	24	4a (54)	5a (6)	
1b	24	4b (55)	5b (20)	
1c	24			6c (35)

The biotransformation of **1a** (1 g/l) with *R. ruber* afforded, after 24 h incubation at 28°, 3,7 α ,12 α -trihydroxy-9-oxo-9,10-seco-23,24-dinorchola-1,3,5(10)-trien-22-oic acid (**4a**; 54%) and 3,7 α -dihydroxy-9-oxo-9,10-seco-23,24-dinorchola-1,3,5(10),11-tetraen-

Scheme. Biotransformation Pathway of Bile Acids **1a–1c** with *Rhodococcus ruber*

22-oic acid (**5a**; 6%). Analogous biotransformation of **1b** furnished 3,12 α -dihydroxy-9-oxo-9,10-seco-23,24-dinorchola-1,3,5(10)-trien-22-oic acid (**4b**; 55%) and 3-hydroxy-9-oxo-9,10-seco-23,24-dinorchola-1,3,5(10)-tetraen-22-oic acid (**5b**; 20%). In both cases, the starting material was completely consumed.

The products **4** and **5** are obtained through a common pathway (*Scheme*) that proceeds with the partial degradation of the side chain at C(17), the oxidation of the HO–C(3), the dehydrogenation of the C(1)–C(2) and C(3)–C(4) bonds to 3-oxo-1,4-diene intermediates **2** that are finally hydroxylated at C(9) by KSH to give the

intermediates **3**. The α -hydroxylation at C(9) leads to the spontaneous cleavage of the C(9)–C(10) bond to the 9-oxo-9,10-secosteroids **4**. Subsequently, the compounds **4a** and **4b** (from **1a** and **1b**, resp.) are partially dehydrated to the corresponding enones **5a** and **5b**.

The high-resolution mass spectrum (HR-ESI-MS) of **4a** revealed a molecular formula $C_{22}H_{30}O_6$ while the low-resolution (LR) ESI-MS spectrum (positive-ion mode) showed a distinctive pattern of intense peaks at m/z 391 ($[M + H]^+$), 373 ($[M + H - H_2O]^+$), and 355 ($[M + H - 2 H_2O]^+$). The ready loss of two molecules of H_2O confirmed the presence of two non-aromatic OH groups in position favorable for elimination (*i.e.*, HO–C(7) and HO–C(12)). The most significant 1H - and ^{13}C -NMR data for compound **4a** are collected in *Tables 2* and *3*, respectively.

Table 2. Selected 1H -NMR Data of **4a** and **4b**, and **5a** and **5b**. At 400 MHz in CD_3OD ; δ in ppm; J in Hz. Atom numbering as indicated in the *Scheme*.

H-Atom	4a	4b	5a	5b
H–C(1)	6.93 (<i>d</i> , $J = 8.2$)	6.89 (<i>d</i> , $J = 8.2$)	6.93 (<i>d</i> , $J = 8.2$)	6.90 (<i>d</i> , $J = 8.2$)
H–C(2)	6.52 (<i>dd</i> , $J = 8.0, 2.7$)	6.48 (<i>dd</i> , $J = 8.2, 2.7$)	6.52 (<i>dd</i> , $J = 8.0, 2.7$)	6.50 (<i>dd</i> , $J = 8.0, 2.7$)
H–C(4)	6.62 (<i>d</i> , $J = 2.7$)	6.56 (<i>d</i> , $J = 2.7$)	6.68 (<i>d</i> , $J = 2.7$)	6.58 (<i>d</i> , $J = 2.7$)
H–C(7) or $CH_2(7)$	3.90–3.96 (<i>m</i>)	n.a. ^{a)}	4.14–4.20 (<i>m</i>)	n.a.
$CH_2(11)$ or H–C(11)	n.a.	n.a.	5.80 (<i>d</i> , $J = 9.4$)	5.85 (<i>d</i> , $J = 9.4$)
H–C(12)	4.06–4.10 (<i>m</i>)	4.13 (<i>m</i>)	7.39 (<i>d</i> , $J = 9.4$)	7.45 (<i>d</i> , $J = 9.4$)
Me(18)	0.91 (<i>s</i>)	1.03 (<i>s</i>)	0.90 (<i>s</i>)	0.98 (<i>s</i>)
Me(19)	2.20 (<i>s</i>)	2.20 (<i>s</i>)	2.20 (<i>s</i>)	2.20 (<i>s</i>)
Me(21)	1.25 (<i>d</i> , $J = 6.5$)	1.25 (<i>d</i> , $J = 6.5$)	1.35 (<i>d</i> , $J = 6.5$)	1.35 (<i>d</i> , $J = 6.5$)

^{a)} n.a.: Not assigned.

Table 3. Selected ^{13}C -NMR Data of **4a** and **4b**, and **5a** and **5b**^{a)}. At 400 MHz in CD_3OD ; δ in ppm. Atom numbering as indicated in the *Scheme*.

C-Atom	4a	4b	5a	5b
1	132.0	131.8	131.9	131.9
2	114.1	113.6	114.1	113.7
3	156.2	156.3	156.1	156.4
4	117.9	116.7	118.0	116.7
5	140.2	143.3	139.9	143.0
7	71.8	n.a. ^{b)}	72.3	n.a.
9	213.2	213.6	202.8	204.5
10	128.4	127.7	128.5	127.6
11	n.a.	n.a.	130.4	129.5
12	73.6	73.9	159.0	159.0
18	12.6	12.6	14.2	13.9
19	18.8	18.5	18.7	18.5
21	16.8	16.9	17.7	17.9
22	180.6	180.6	179.9	180.6

^{a)} All signals are reported in the *Exper. Part*. ^{b)} n.a.: Not assigned.

The $^1\text{H-NMR}$ showed, among others, signals of three aromatic H-atoms ($\delta(\text{H})$ 6.52 (*dd*), 6.62 (*d*), and 6.93 (*d*)), which represents a typical pattern of the methylphenolic ring in 9,10-secosteroid [20]. The *doublet* ($\delta(\text{H})$ 1.25) and the *singlet* ($\delta(\text{H})$ 0.91) were easily assigned to Me(21) and Me(18), respectively, while the aromatization of the A-ring was confirmed by downfield shift of the Me(19) signal ($\delta(\text{H})$ 2.20) compared with the corresponding signal ($\delta(\text{H})$ 0.92) of cholic acid (**1a**) [21]. The configuration of H–C(8) was assumed to be unchanged with respect to the cholic acid **1a** (*i.e.*, $\text{H}_\beta\text{-C}(8)$), since neither the 9α -hydroxylation nor the *retro*-aldol rearrangement, involved in formation of **4a**, should require change of the configuration at C(8) [7]. It is noteworthy that the signal at $\delta(\text{H})$ 4.06–4.10 ppm (see *Table 2*), attributable to H–C(12), showed a profile typical of a H-atom with a β -configuration [22]. In addition, when the same H–C(12) resonating at $\delta(\text{H})$ 4.06–4.10 ppm was saturated, and the NOE-difference spectrum was acquired, an enhancement of *ca.* 3% of the Me(18) signal at $\delta(\text{H})$ 0.91 was observed. This experiment confirmed the β orientation of the H-atom at C(12) and, consequently, the α -configuration of the OH group [23]. This is, to the best of our knowledge, the first example of 9,10-secosteroid derived from bacterial degradation of cholic acid with the 12-OH group in α -position [2][16–18].

The $^{13}\text{C-NMR}$ spectra (BB and DEPT) of **4a** exhibited 22 signals (see *Exper. Part*) in agreement with a 23,24-dinor derivative. The most downfield signals (see *Table 3*) ($\delta(\text{C})$ 213.2) and ($\delta(\text{C})$ 180.6) were easily attributable to the C(9) and the C(22)OOH respectively, while the six signals (from $\delta(\text{C})$ 156.2 to 114.1) were assigned to the C-atoms C(1)–C(5) and C(10).

The signals at $\delta(\text{C})$ 71.8 and 73.6 were attributed to the H–C(7) and H–C(12), respectively, and, finally, the upfield resonances at $\delta(\text{C})$ 18.8, 16.8, and 12.6 were ascribed to the Me(19), Me(21) and Me(18), respectively.

The HR-ESI-MS of **5a**, derived from **4a** by loss of H_2O from H–C(11) and HO–C(12), indicated the molecular formula $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_5$, while the LR-ESI-MS (negative-ion mode) exhibited three intense peaks at m/z 371, 743, and 1115, attributable to the monomer, dimer, and trimer, respectively. The IR spectrum showed two distinctive stretchings at 1651 and 1609 cm^{-1} , attributable to an α,β -unsaturated ketone. The most significant $^1\text{H-NMR}$ signals (*Table 2*) of **5a** were very similar to those of **4a** (*i.e.*, three aromatic H-atoms ($\delta(\text{H})$ 6.52 (*dd*), 6.68 (*d*) and 6.93 (*d*)), the *doublet* $\delta(\text{H})$ 1.35 and the *singlets* $\delta(\text{H})$ 0.90 and 2.20 assigned to Me(21), Me(18), and Me(19), resp.). The configuration at C(8) was assumed to be unchanged with respect to the cholic acid **1a** (*i.e.*, $\text{H}_\beta\text{-C}(8)$). The *doublet* at $\delta(\text{H})$ 7.39 assigned to the H–C(12) was in agreement with the C(11)=C(12) bond. Of course, the ‘twin’ H–C(11) *doublet* was also present at $\delta(\text{H})$ 5.80. The $^{13}\text{C-NMR}$ spectra (BB and DEPT) of **5a** (very similar to **4a**) were in accordance with a 23,24-dinor structure (see *Exper. Part*). The most downfield signals (*cf. Table 3*; $\delta(\text{C})$ 202.8 and 179.9) were assigned to the C(9) and C(22), respectively, while the signals at $\delta(\text{C})$ 130.4 and 159.0 were attributable to the C(11)=C(12) bond.

Compound **4b** showed spectral properties very similar to those of **4a**. The HR-MS indicated a molecular formula $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_5$, while the LR-ESI-MS (negative-ion mode) showed three intense peaks at m/z 373, 747, and 1121, attributable to the monomer, dimer, and trimer, respectively. The most significant ^1H - and $^{13}\text{C-NMR}$ data of **4b** are compiled in *Tables 2 and 3*, respectively. The $^1\text{H-NMR}$ spectrum of **4b**, as observed for

4a, exhibited signals of three aromatic H-atoms ($\delta(\text{H})$ 6.48 (*dd*), 6.56 (*d*), and 6.89 (*d*)), and a *doublet* ($\delta(\text{H})$ 1.25) and two *singlets* ($\delta(\text{H})$ 1.03 and 2.20) that were easily assigned to Me(21), Me(18) and Me(19), respectively. The configuration at C(8) was assumed to be unchanged with respect to the deoxycholic acid **1b** (*i.e.*, $\text{H}_\beta\text{-C}(8)$), and the resonance at $\delta(\text{H})$ 4.13 was attributable to the H-atom at C(12) with a β -configuration for the same reasons as for **4a**. As observed for **4a**, the ^{13}C -NMR spectra (BB and DEPT) of **4b** exhibited the 22 signals (see *Exper. Part*) in accordance with a 23,24-dinor derivative. The most downfield signals (see *Table 2*) ($\delta(\text{C})$ 213.6 and 180.6) were assigned to C(9) and C(22), respectively, while the resonances at $\delta(\text{C})$ 73.9 was ascribed to C(12).

Finally the HR-ESI-MS of **5b**, derived from **4b** by loss of H_2O from $\text{H-C}(11)$ and $\text{HO-C}(12)$, indicated the molecular formula $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_4$, while LR-ESI-MS (negative-ion mode) displayed an intense peak at m/z 355 attributable to the $[M - \text{H}]^-$ ion. The IR spectrum showed two distinctive stretchings at 1654 and 1609 cm^{-1} , attributable to an α,β -unsaturated ketone. The ^1H -NMR spectrum was very similar to that of **5a** (see *Table 2*). Also in this case, the configuration at C(8) was assumed to be unchanged with respect to the deoxycholic acid **1b** (*i.e.*, $\text{H}_\beta\text{-C}(8)$). The *doublets* ($\delta(\text{H})$ 7.45 and $\delta(\text{H})$ 5.85) were assigned to the olefinic H-atoms $\text{H-C}(12)$ and $\text{H-C}(11)$, respectively. The ^{13}C -NMR spectra (BB and DEPT) of **5b** exhibited 22 signals (see *Exper. Part*). The most downfield signals (*cf. Table 3*; $\delta(\text{C})$ 204.5 and 180.6) were easily attributable to C(9) and C(22), respectively, while the signals at $\delta(\text{C})$ 129.5 and 159.0 were ascribed to the $\text{C}(11)=\text{C}(12)$ bond.

An analogous pathway is followed by the biotransformation of hyocholic acid **1c** with *R. ruber* that afforded the 3-hydroxy-6,9-epoxy-9,10-*seco*-23,24-dinorchola-1,3,5(10),6,8-pentaen-22-oic acid (**6c** *cf. Scheme*) in 35% yield. In this case, however, the 9,10-*seco*steroid **4c** is not detected but evolves to the furan derivative **6c** by the attack of OH at C(6) to the $\text{C}(9)=\text{O}$ function to give the corresponding hemiacetal (*Fig. 3*) that spontaneously underwent elimination of two molecules of H_2O . This hypothesis is supported by the stable hemiacetal derivatives obtained from biotransformation of hydeoxycholic acid [19].

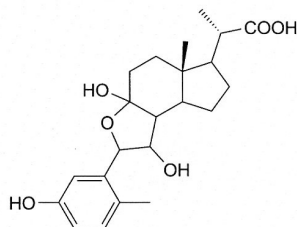


Fig. 3. Hemiacetal structure of **1c**

The HR-ESI-MS of **6c** provided the molecular formula $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_4$, while LR-ESI-MS (positive-ion mode) showed an ion peak at m/z 355 attributable to the $[M + \text{H}]^+$. The IR spectrum showed only one carbonyl absorption bond at 1715 cm^{-1} attributable to the $\text{C}(22)\text{OOH}$ group. ^1H - and ^{13}C -NMR data of compound **6c**, recorded in CD_3OD , are compiled in *Table 4*.

Table 4. ^1H - and ^{13}C -NMR Data of **6c**. At 400 MHz in CD_3OD ; δ in ppm; J in Hz.

Position	$\delta(\text{H})$	$\delta(\text{C})$
1	7.00 (<i>d</i> , $J = 8.3$)	133.1
2	6.57 (<i>dd</i> , $J = 8.3, 2.7$)	114.8
3	–	152.9
4	7.08 (<i>d</i> , $J = 2.7$)	113.6
5	–	125.8 ^{a)}
6	–	156.4
7	6.33 (<i>s</i>)	109.1
8	–	122.6 ^{b)}
9	–	150.2 ^{b)}
10	–	129.4 ^{a)}
11	2.7–2.77 (<i>m</i>)	22.0
12	1.67–1.76 (<i>m</i>), 2.21–2.29 (<i>m</i>)	36.4
13	–	45.0
14	2.61–2.69 (<i>m</i>)	49.8
15	1.41–1.53 (<i>m</i>), 1.91–2.00 (<i>m</i>)	24.5
16	1.56–1.66 (<i>m</i>), 2.00–2.00 (<i>m</i>)	29.7
17	1.77–1.85 (<i>m</i>)	51.6
18	0.69 (<i>s</i>)	11.3
19	2.34 (<i>s</i>)	21.4
20	2.40–2.51 (<i>m</i>)	44.2
21	1.27 (<i>d</i> , $J = 6.8$)	18.0
22	–	180.7

^{a)}, ^{b)} Assignments may be interchanged.

All the H-atom resonances were correlated with those of the directly attached C-atoms by the DEPT and 2D-NMR HMQC experiments, and the H-atom spin systems were established through the COSY experiment. In particular, the *singlet* ($\delta(\text{H})$ 2.34) of Me(19), and signals of the three aromatic H-atoms ($\delta(\text{H})$ 6.57 (*dd*), 7.00 (*d*), and 7.08 (*d*)) in the ^1H -NMR formed the characteristic pattern consistent with a secophenol moiety [20] and derived by a well-known degradation pathway of bile acids (9 α -hydroxylation and *B*-ring cleavage *via retro*-aldol rearrangement). Moreover, the presence of a *singlet* ($\delta(\text{H})$ 0.69) and of a *doublet* ($\delta(\text{H})$ 1.27) indicated that Me(18) and Me(21) were still present in the molecule. On the other hand, the ^{13}C -NMR spectrum displayed ten resonances (from $\delta(\text{C})$ 109.1 to 156.4) attributable to the aromatic C-atoms: six for the methylphenol moiety (*i.e.*, C(1)–C(5) and C(10)) and four for the furan ring (*i.e.*, C(6)–C(9)).

Conclusions. – The biotransformations of cholic, deoxycholic, and hyocholic acids (**1a**, **1b**, and **1c**, resp.) with *Rhodococcus ruber* produced five new metabolites (**4a** and **4b**, **5a** and **5b**, and **6c**) with a partial degradation of the side chain at C(17), confirming the 3-oxo-23,24-dinorchola-1,4-dien-22-oic acids **2a–2c** as substrates for KSH catalyzed C(9)-hydroxylation. The structure of these compounds supports the hypothesis that the side-chain degradation and the *A* ring-aromatization are not necessarily consecutive processes. In addition, the new secosteroids **4a** and **4b** are the first examples of 9,10-secosteroids isolated from bacterial degradation of bile acids,

possessing still the 12 α -OH group so the inversion of the configuration at C(12) does not appear necessary for the subsequent *B*-ring cleavage. Finally, the 9,10-secosteroid **6c** is derived from **4c**, by rearrangement to hemiacetalic form and losing two molecules of H₂O to afford the furan derivative.

Experimental Part

General. Sodium salt of cholic, deoxycholic, and hyocholic acids were supplied by *ICE industry* [24]. *Rhodococcus ruber* belongs to *Cambrex-IEP GmbH* collection [25]. TLC: Precoated silica-gel plates (SiO₂; thickness 0.25 mm; *Merck*) with cyclohexane/AcOEt/AcOH 60:40:1, withdrawing periodically aliquots of the biotransformation broth (1 ml). The broth was centrifuged (6000 rpm, 15 min) to remove the cells and the supernatant was acidified to pH 2 with 1M HCl, extracted with AcOEt (1 ml) and then analyzed. Phosphomolybdic acid soln. was used as spray reagent to visualize the steroid spots. M.p.: uncorrected; 510 *Büchi* melting point instrument. UV Spectra: *Jasco V630* spectrometer. IR Spectra: *Perkin-Elmer 1310* grating infrared spectrometer (CHCl₃ soln.) or *Perkin-Elmer Spectrum 100* FT-IR (ATR mode). The ¹H- and ¹³C-, DEPT-NMR, and 2D-NMR spectra (COSY, HMQC) were recorded in CD₃OD soln. in 5-mm tubes, at r.t., with a *Varian Mercury Plus 400*, operating at 400 (¹H) and 100 MHz (¹³C), resp; the ¹H chemical shifts referenced to the residual solvent signal (CD₃OD: δ (H) 3.34 ppm); the ¹³C chemical shifts with reference to CD₃OD (δ (C) 49.0 ppm). ESI-MS: *LCQ Duo (TermoQuest, San Jose, CA, USA)*. HR-ESI-MS: *ESI-Q-TOF 6520 Agilent Technologies* instrument.

Biotransformation of Bile Acids 1a–1c with Rhodococcus ruber. General Procedure. A loopful of *Rhodococcus ruber* from a culture on Plate Count Agar (PCA) was inoculated in Plate Count Broth (PCB; 10 ml) containing glucose (1 g/l), yeast extract (2.5 g/l), and tryptone (5 g/l). After 48 h at 28° and 100 rpm, a portion of this culture (5 ml) was added to the same medium (500 ml) in a 2-l flask. The growing was continued for 48 h under the same conditions until the absorbance (660 nm) was 5 OD. To this culture, the proper bile acid **1** as sodium salt (0.5 g) was added, and the incubation was monitored either by TLC to check the substrate disappearance or measuring the absorbance at 280 nm in order to verify the formation of aromatic derivatives [4]. After 24 h, the broth was centrifuged (6000 rpm, 15 min), and the supernatant was acidified to pH 2 with 1M HCl and extracted with AcOEt (2 \times 100 ml). The org. layer was dried (Na₂SO₄), and the solvent was evaporated. The crude products were purified by CC (SiO₂; cyclohexane/AcOEt/AcOH 60:40:1). The results are compiled in *Table 1*.

3,7 α ,12 α -Trihydroxy-9-oxo-9,10-seco-23,24-dinorchola-1,3,5(10)-trien-22-oic Acid (= (α S,IR,3 α S,4R,7S,7 α S)-Octahydro-7-hydroxy-4-[1-hydroxy-2-(5-hydroxy-2-methylphenyl)ethyl]- α ,7 α -dimethyl-5-oxo-1H-indene-1-acetic Acid; **4a**). Yield: 0.24 g (54%). Colorless gum. [α]_D²⁰ = +30 (*c* = 0.8, MeOH). IR (ATR): 3356, 2947, 1694. ¹H-NMR: see *Table 2*. ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD): 213.2 (C(9)); 180.6 (C(22)); 156.2 (C(3)); 140.2 (C(5)); 132.0 (C(1)); 128.4 (C(10)); 117.9 (C(4)); 114.1 (C(2)); 73.6; 71.8; 55.7; 48.6; 48.2; 45.0; 44.2; 43.7; 39.5; 28.4; 25.6; 18.8 (C(19)); 16.8 (C(21)); 12.6 (C(18)). ESI-MS (pos.): 391 (65, [M + H]⁺), 373 ([M + H – H₂O]⁺), 355 ([M + H – 2 H₂O]⁺). HR-ESI-MS (neg.): 389.1973 ([M – H][–], C₂₂H₂₉O₆[–]; calc. 389.2042).

3,7 α -Dihydroxy-9-oxo-9,10-seco-23,24-dinorchola-1,3,5(10),11-tetraen-22-oic Acid (= (α S,4R,7 α S)-2,3,3 α ,4,5,7 α -Hexahydro-4-[(IR)-1-hydroxy-2-(5-hydroxy-2-methylphenyl)ethyl]- α ,7 α -dimethyl-5-oxo-1H-indene-1-acetic Acid; **5a**). Yield: 26 mg (6%). Colorless gum. [α]_D²⁰ = –20.1 (*c* = 1.0, MeOH). IR (ATR): 3247, 2928, 1704, 1651, 1609. ¹H-NMR: see *Table 2*. ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD): 202.8 (C(9)); 179.9 (C(22)); 159.0 (C(12)); 156.1 (C(3)); 139.9 (C(5)); 131.9 (C(1)); 130.4 (C(11)); 128.5 (C(10)); 118.0 (C(4)); 114.1 (C(2)); 72.3 (C(7)); 53.3; 49.6; 48.8; 46.1; 44.1; 39.7; 28.4; 25.6; 18.7 (C(19)); 17.7 (C(21)); 14.2 (C(18)). ESI-MS (neg.): 371 ([M – H][–]), 743 ([2M – H][–]), 1115 ([3M – H][–]). HR-ESI-MS (neg.): 371.1838 ([M – H][–], C₂₂H₂₇O₅[–]; calc. 371.1937).

3,12 α -Dihydroxy-9-oxo-9,10-seco-23,24-dinorchola-1,3,5(10)-trien-22-oic Acid (= (α S,IR,3 α S,4S,7S,7 α S)-Octahydro-7-hydroxy-4-[2-(5-hydroxy-2-methylphenyl)ethyl]- α ,7 α -dimethyl-5-oxo-1H-indene-1-acetic Acid; **4b**). Yield: 0.25 g (55%). Colorless gum. [α]_D²⁰ = +12.1 (*c* = 0.8, MeOH). IR (ATR): 3350, 2953, 1702. ¹H-NMR: see *Table 2*. ¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD): 213.6 (C(9)); 180.6 (C(22)); 156.3 (C(3)); 143.3 (C(5)); 131.8 (C(1)); 127.7 (C(10)); 116.7 (C(4)); 113.6 (C(2)); 73.9 (C(12));

51.6; 48.1; 48.0; 47.9; 44.5; 43.7; 31.9; 28.8; 28.3; 25.6; 18.5 (C(19)); 16.9 (C(21)); 12.6 (C(18)). ESI-MS (neg.): 373 ($[M - H]^-$), 747 ($[2M - H]^-$), 1121 ($[3M - H]^-$). HR-ESI-MS (neg.): 373.2024 ($[M - H]^-$, $C_{22}H_{29}O_5^-$; calc. 373.2093).

3-Hydroxy-9-oxo-9,10-seco-23,24-dinorchola-1,3,5(10),11-tetraen-22-oic Acid (= α S,4S,7aS)-2,3,3a,4,5,7a-Hexahydro-4-[2-(5-hydroxy-2-methylphenyl)ethyl]- α ,7a-dimethyl-5-oxo-1H-indene-1-acetic Acid; **5b**). Yield: 86 mg (20%). Colorless gum. $[\alpha]_D^{20} = -7.1$ ($c = 1.6$, MeOH). IR (ATR): 3304, 2942, 1704, 1654, 1609. 1H -NMR: see Table 2. ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD): 204.5 (C(9)); 180.6 (C(22)); 159.9 (C(12)); 156.4 (C(3)); 143.0 (C(5)); 131.9 (C(1)); 129.5 (C(11)); 127.6 (C(10)); 116.7 (C(4)); 113.7 (C(2)); 56.4; 51.8; 48.1; 46.3; 44.6; 31.1; 29.7; 28.1; 25.5; 18.5 (C(19)); 17.9 (C(21)); 13.9 (C(18)). ESI-MS (neg.): 355 ($[M - H]^-$). HR-ESI-MS (pos.): 357.2057 ($[M + H]^+$, $C_{22}H_{29}O_4^+$; calc. 357.1988).

3-Hydroxy-6,9-epoxy-9,10-seco-23,24-dinorchola-1,3,5(10),6,8-pentaen-22-oic Acid (= α S,5aR)-5,5a,6,7,8,8a-Hexahydro-2-(5-hydroxy-2-methylphenyl)- α ,5a-dimethyl-4H-indeno[5,4-b]furan-6-acetic Acid; **6c**). Yield: 150 mg (35%). White crystals (MeOH/ H_2O). M.p. 175–177°. $[\alpha]_D^{20} = +14$ ($c = 0.8$, MeOH). IR ($CHCl_3$, as methyl ester derivative): 3400, 1715, 1595. 1H - and ^{13}C -NMR: see Table 4. ESI-MS (pos.): 355 (100, $[M + H]^+$). HR-ESI-MS (neg.): 353.1759 ($[M - H]^-$, $C_{22}H_{25}O_4^-$; calc. 353.1831).

We gratefully acknowledge Cambrex-IEP GmbH (DE-Wiesbaden) and ICE srl (IT-Reggio Emilia) for the financial support. We thank Mr. Paolo Formaglio and Dr. Tatiana Bernardi, Department of Chemistry, University of Ferrara, for NMR and MS experiments and helpful discussions.

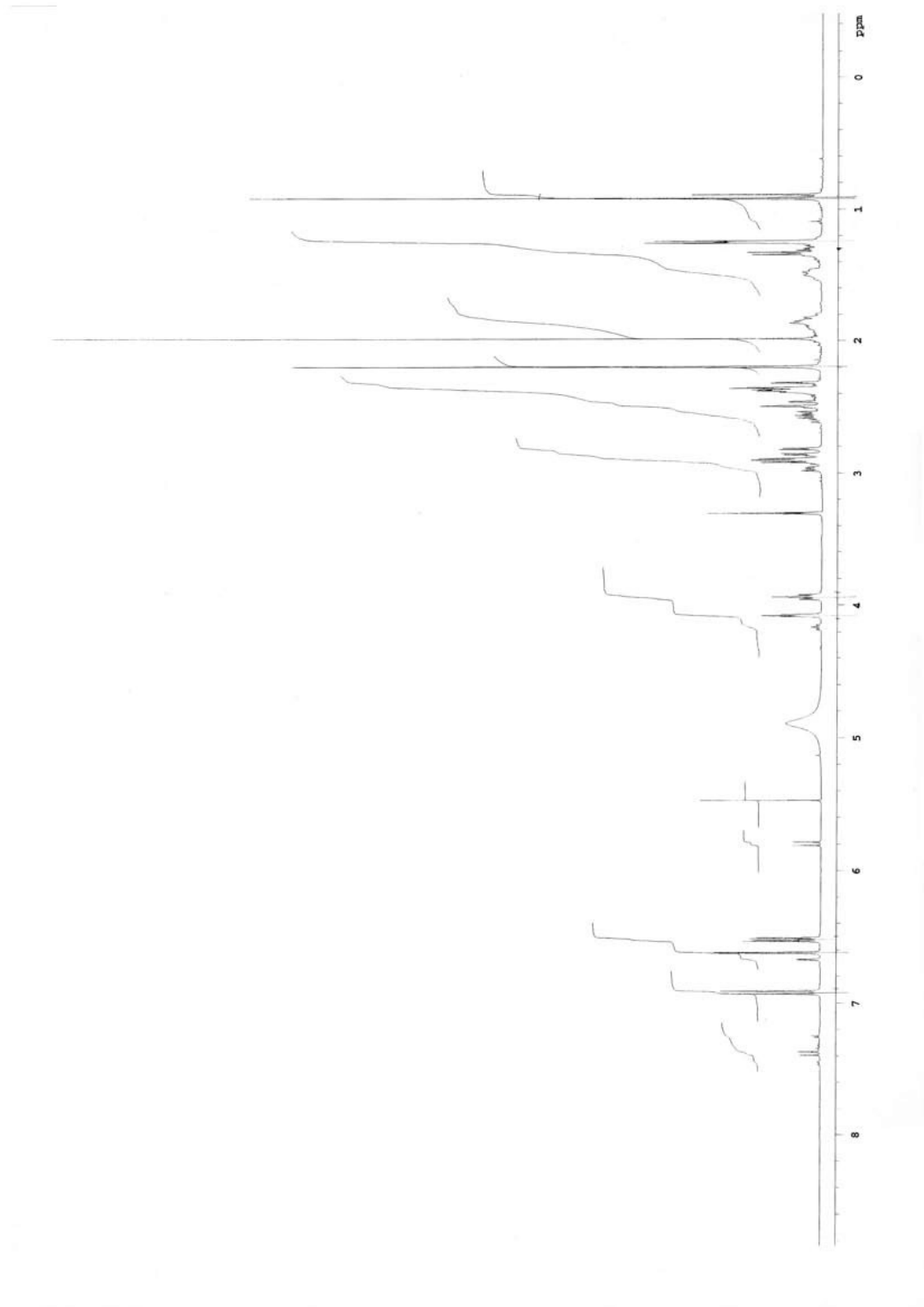
REFERENCES

- [1] S. Hayakawa, *Z. Allg. Mikrobiol.* **1982**, *22*, 309.
- [2] B. Philipp, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *89*, 903.
- [3] A. Birkenmaier, J. Holert, H. Erdbrink, H. M. Moeller, A. Friemel, R. Schoenenberger, M. J.-F. Suter, J. Klebensberger, B. Philipp, *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 7165.
- [4] Y. Hu, R. Van Der Geize, G. S. Besra, S. S. Gurucha, A. Liu, M. Rohde, M. Singh, A Coates, *Mol. Microbiol.* **2010**, *75*, 107.
- [5] J. K. Capyk, I. D'Angelo, N. C. Strynadka, L. D. Eltis, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 9937.
- [6] M. Petrusma, L. Dijkhuizen, R. van der Geize, *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 5300.
- [7] R. J. Park, *Steroids* **1984**, *44*, 175.
- [8] D. Kim, J. S. Lee, J. Kim, S. J. Kang, J. H. Yoon, W. G. Kim, C. H. Lee, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *17*, 403.
- [9] S. Maneerat, T. Nitoda, H. Kanzaki, F. Kawai, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *67*, 679.
- [10] H. B. Bode, B. Zeggel, B. Silakowski, S. C. Wenzel, H. Reichenbach, R. Müller, *Mol. Microbiol.* **2003**, *47*, 471.
- [11] C. W. Bird, J. M. Lynch, F. J. Pirt, W. W. Reid, C. J. W. Brooks, B. S. Middleditch, *Nature* **1971**, *230*, 473.
- [12] M. V. Donova, *Appl. Biochem. Microbiol.* **2007**, *43*, 1.
- [13] P. Fernandes, A. Cruz, B. Angelova, H. M. Pinheiro, J. M. S. Cabral, *Enz. Microb. Technol.* **2003**, *32*, 688.
- [14] S. B. Mahato, S. Garai, *Steroids* **1997**, *62*, 332.
- [15] J. C. Knight, M. C. Wovcha, *Steroids* **1985**, *46*, 789.
- [16] M. E. Tenneson, J. D. Baty, R. Bilton, A. N. Mason, *Biochem. J.* **1979**, *184*, 613.
- [17] R. J. Park, N. W. Dunn, J. A. Ide, *Steroids* **1986**, *48*, 439.
- [18] M. Horinouchi, T. Hayashi, H. Koshino, M. Malon, T. Yamamoto, T. Kudo, *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 5545.
- [19] S. Costa, P. P. Giovannini, G. Fantin, A. Medici, P. Pedrini, *Helv. Chim. Acta* **2013**, *96*, 1062.
- [20] M. Horinouchi, T. Hayashi, T. Kudo, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *92*, 143.
- [21] S. Barnes, D. Kirk, 'Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Bile Acids', in: 'The Bile Acids – Chemistry, Physiology and Metabolism – Vol. 4: Methods and Applications', Eds. K. D. R. Setchell, P. P. Nair, D. Kritchevsky, Plenum Press, New York-London, 1988, Chapt. 3, p. 91.

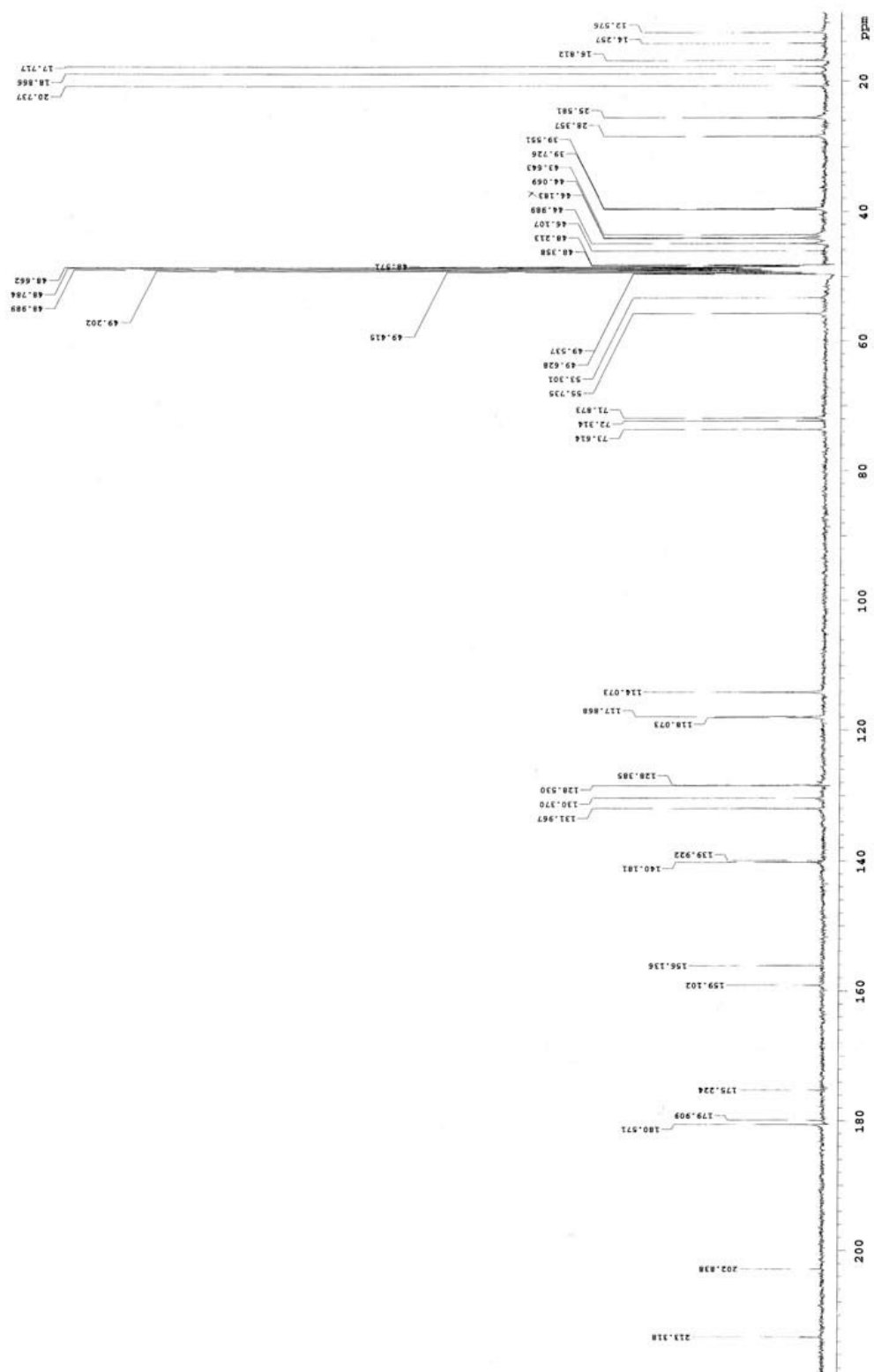
- [22] S. Barnes, D. Kirk, '*Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Bile Acids*', in 'The Bile Acids – Chemistry, Physiology and Metabolism – Vol. 4: Methods and Applications', Eds. K. D. R. Setchell, P. P. Nair, D. Kritchevsky, Plenum Press, New York, London, 1988, Chapt. 3, p. 110.
- [23] S. Barnes, D. Kirk, '*Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Bile Acids*', in 'The Bile Acids – Chemistry, Physiology and Metabolism – Vol. 4: Methods and Applications', Eds. K. D. R. Setchell, P. P. Nair, D. Kritchevsky, Plenum Press, New York, London, 1988, Chapt. 3, p. 120.
- [24] ICE (*Industria Chimica Emiliana*), <http://www.iceitaly.com/>.
- [25] Cambrex-IEP GmbH (Wiesbaden, Germany), <http://www.biocatalysis.com/>.

Received March 8, 2013

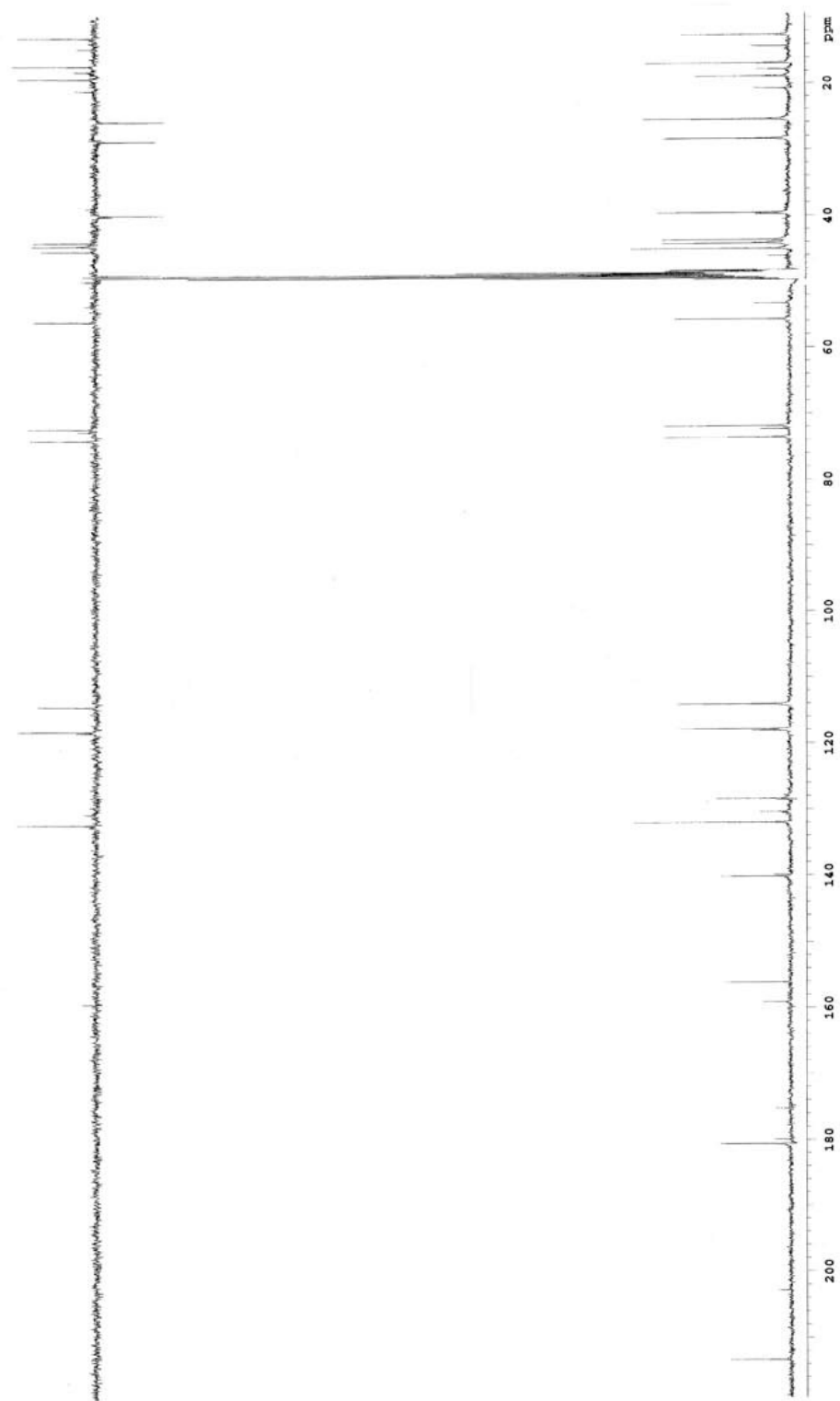
Allegato B)



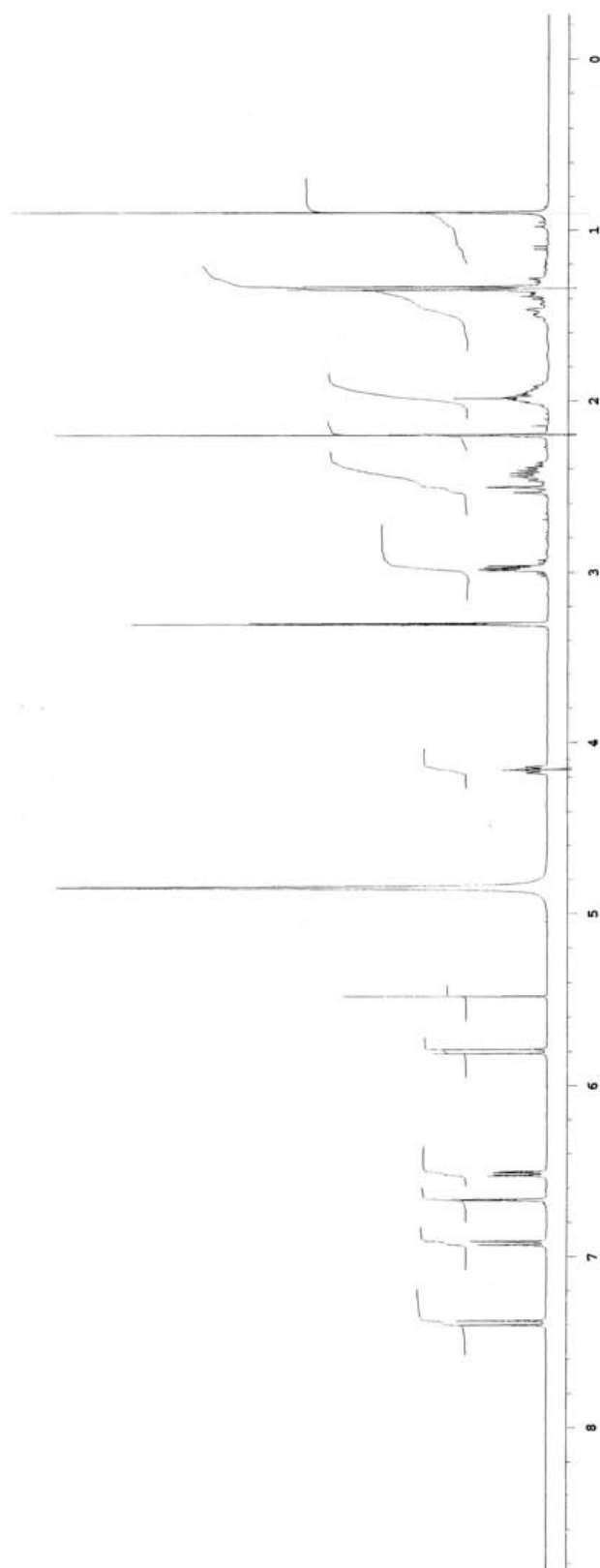
¹H NMR di acido 3,7 α ,12 α -triidrossi-9-osso-9,10-seco-23,24-dinor-1,3,5(10)-colatrien-22-
oico **4a**



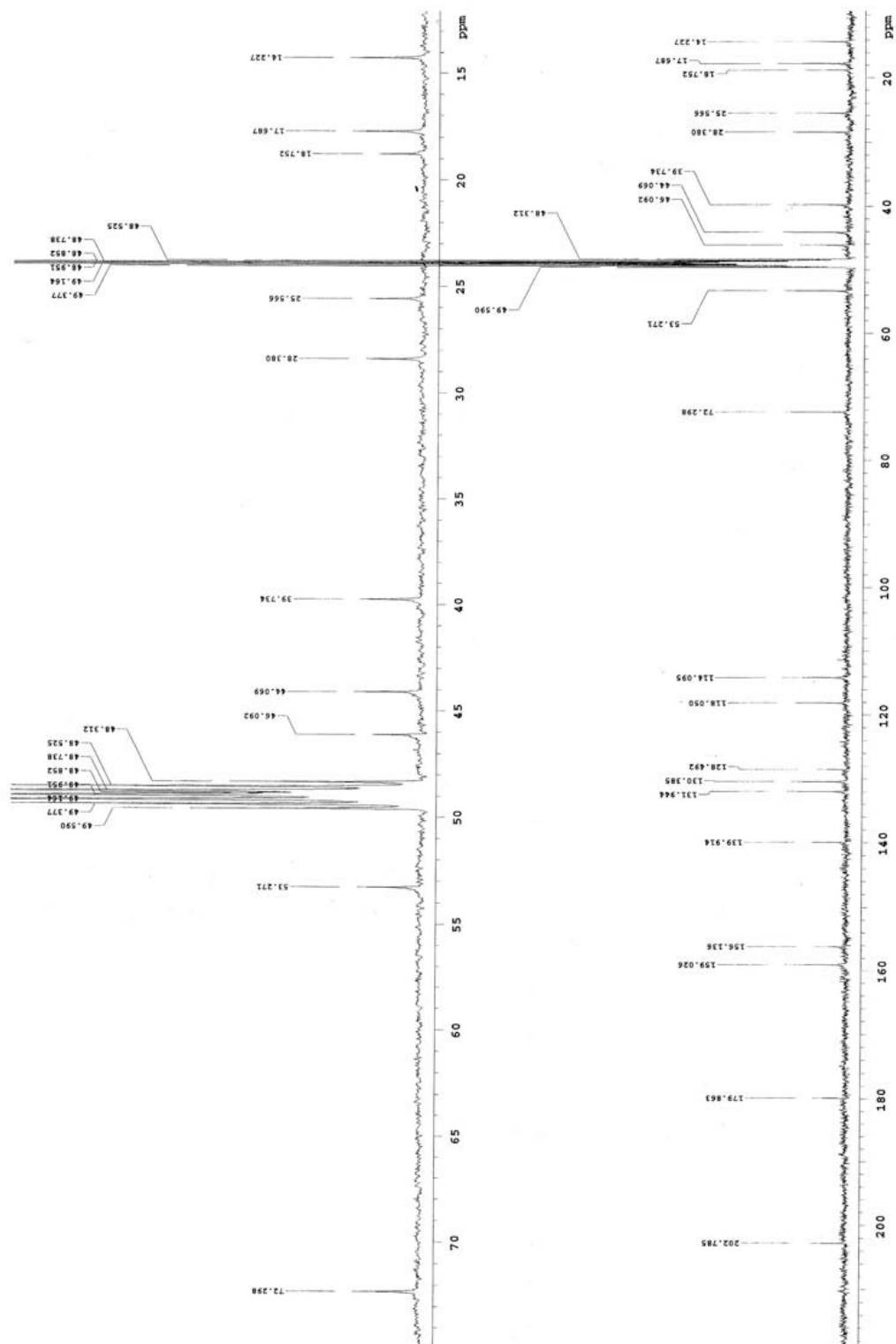
^{13}C NMR di acido 3,7 α ,12 α -triidrossi-9-osso-9,10-seco-23,24-dinor-1,3,5(10)-colatrien-22-oico **4a**



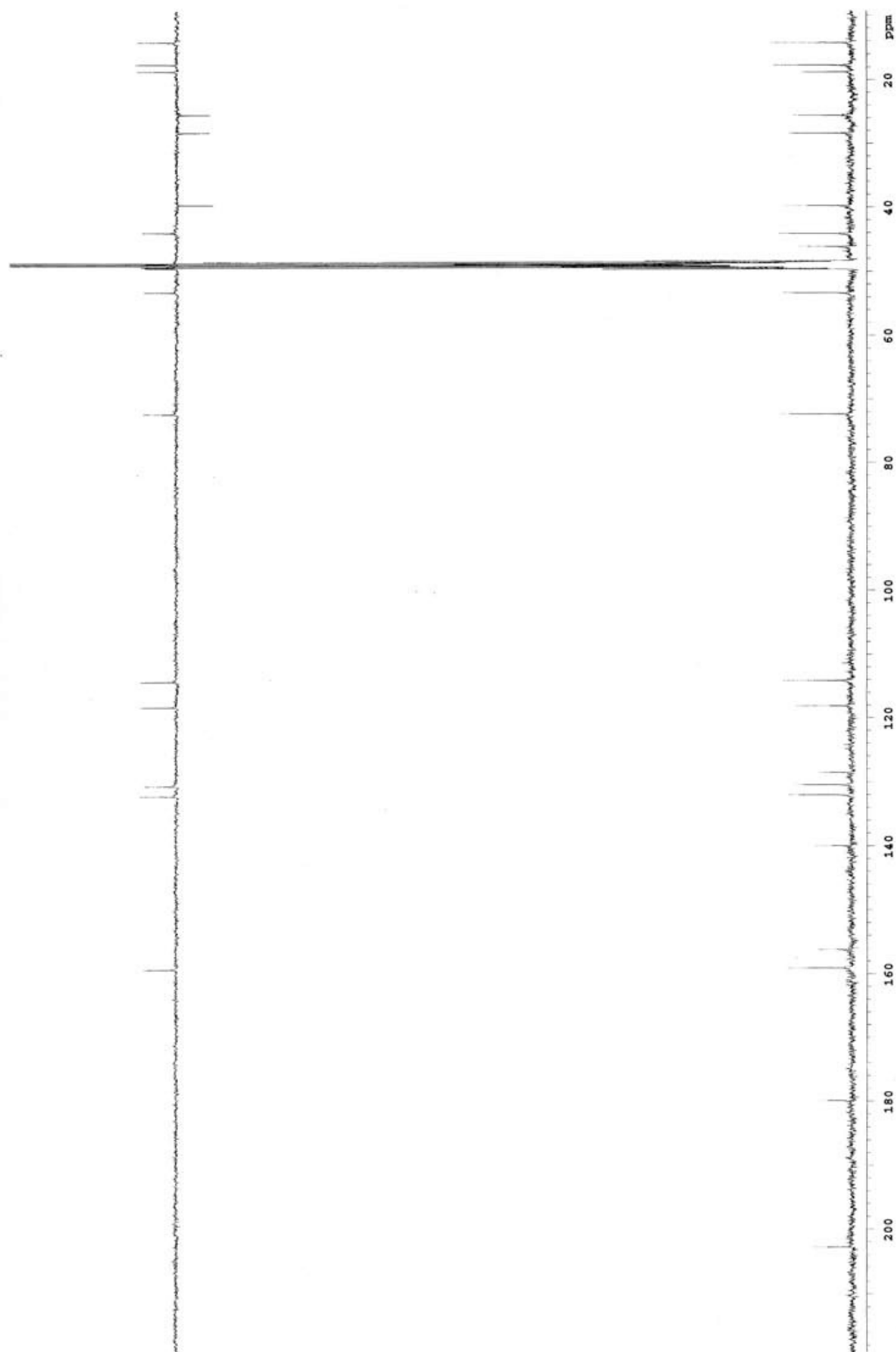
^{13}C NMR/DEPT di acido 3,7 α ,12 α -triidrossi-9-osso-9,10-seco-23,24-dinor-1,3,5(10)-colatrien-22-oico **4a**



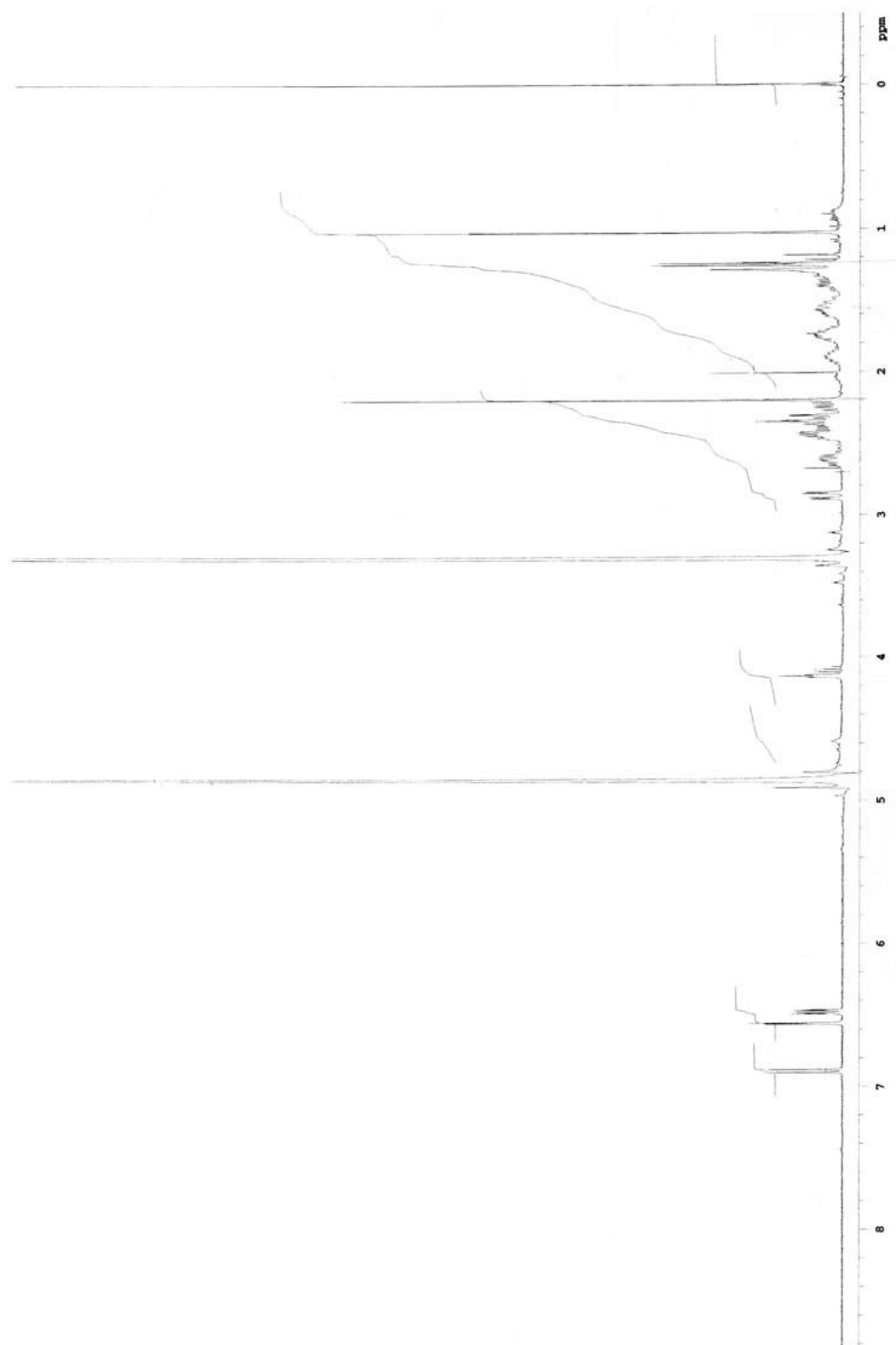
^1H NMR di acido 3,7 α -diidrossi-9-osso-11-ene-9,10-seco-23,24-dinor-1,3,5(10)-colatrien-22-oico **5a**



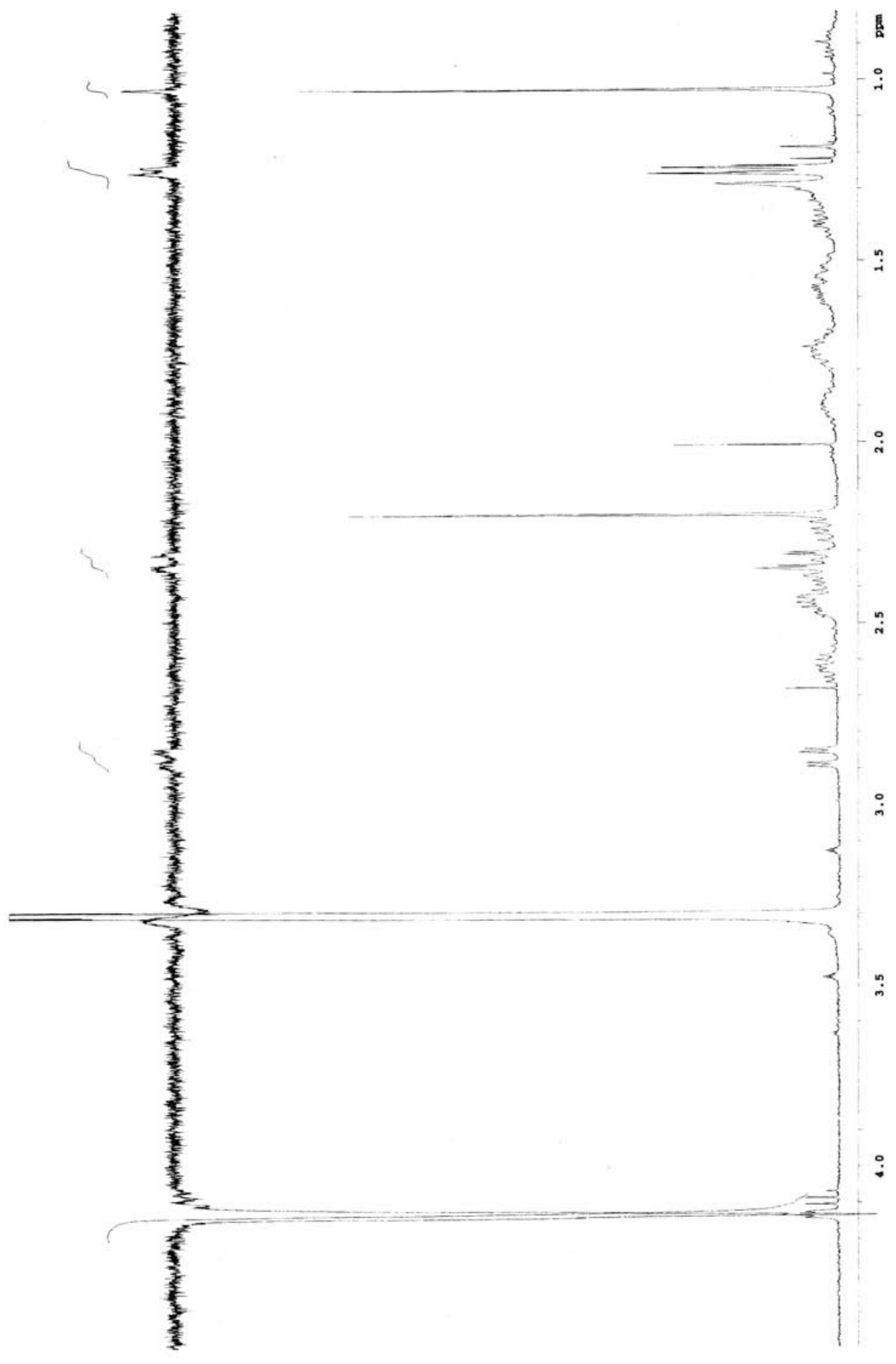
^{13}C NMR di acido 3,7 α -diidrossi-9-osso-11-ene-9,10-seco-23,24-dinor-1,3,5(10)-colatrien-22-oico **5a**



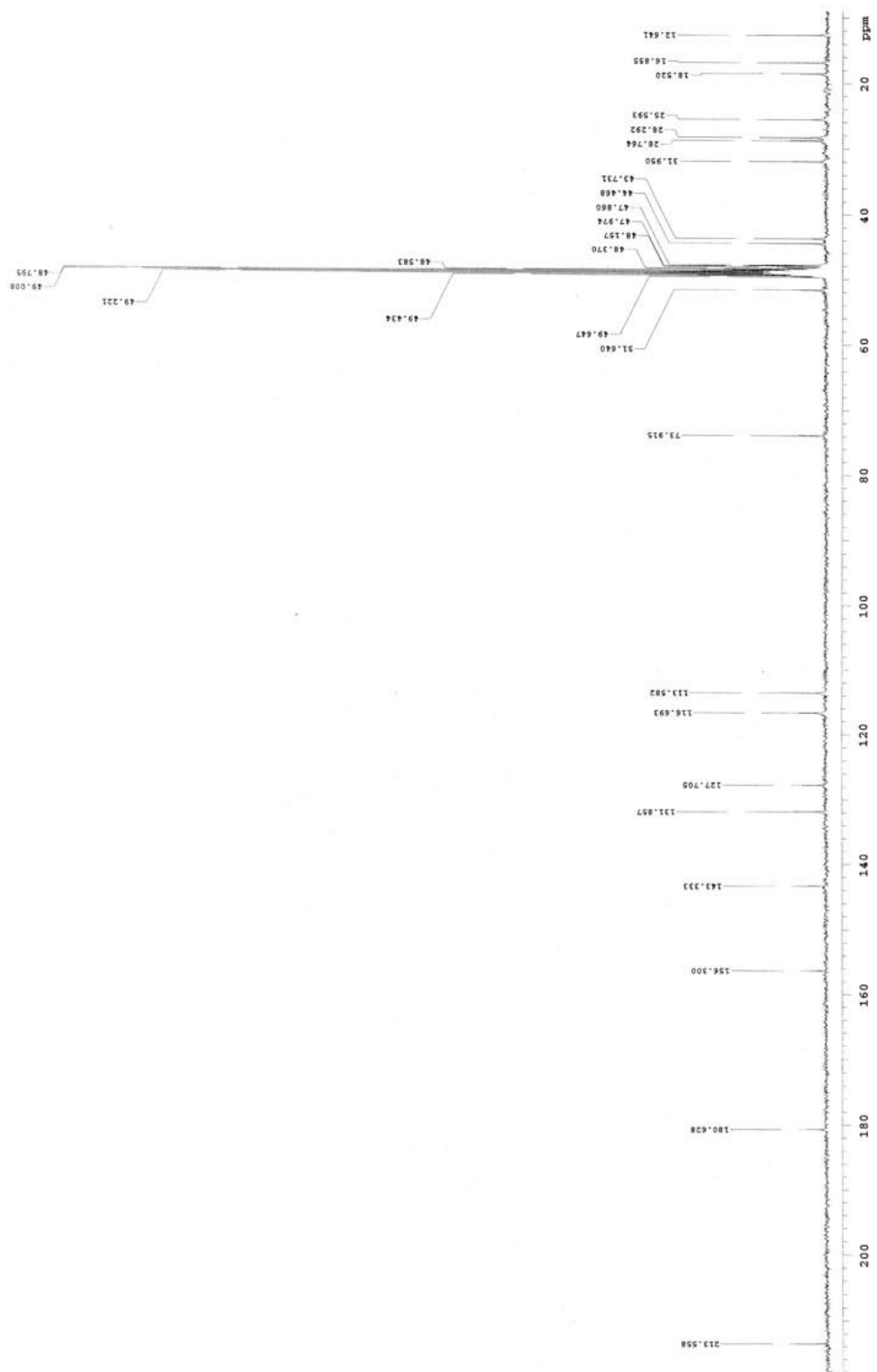
^{13}C NMR/DEPT di acido 3,7 α -diidrossi-9-osso-11-ene-9,10-seco-23,24-dinor-1,3,5(10)-colatrien-22-oico **5a**



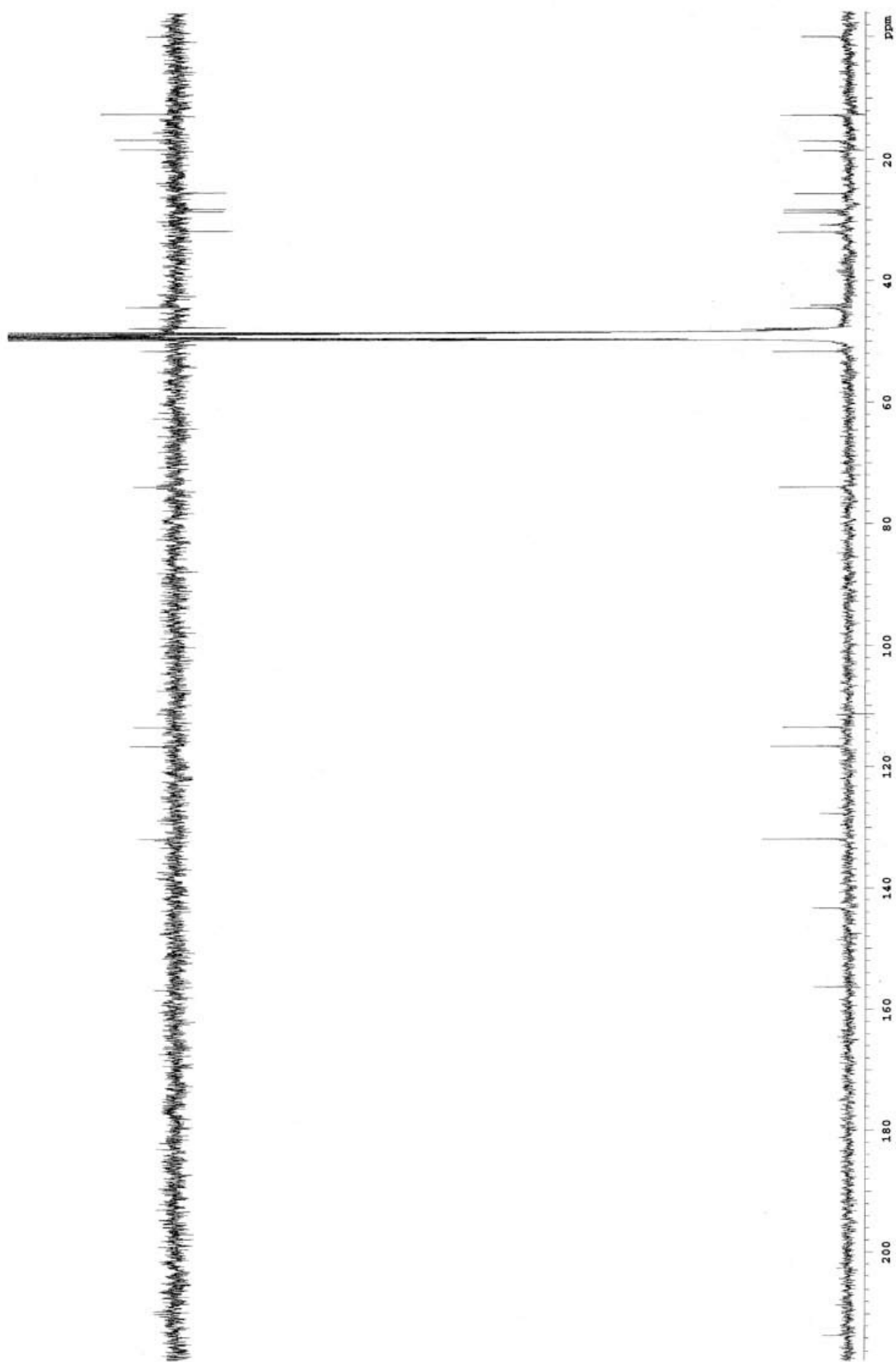
^1H NMR di acido 3,12 α -diidrossi-9-osso-9,10-seco-23,24-dinor-1,3,5(10)-colatrien-22-
oico **4b**



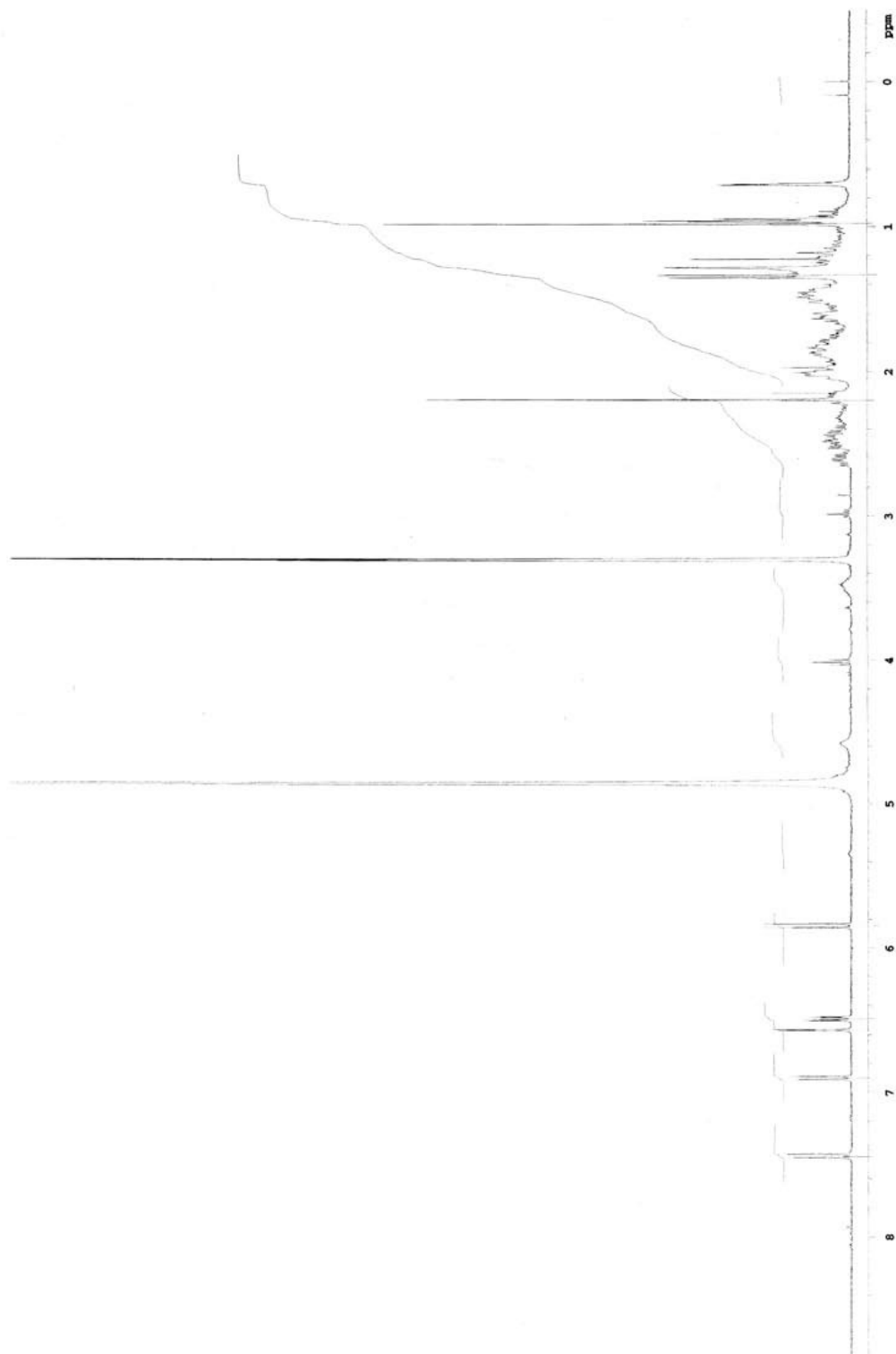
¹H NMR/NOE di acido 3,12 α -diidrossi-9-osso-9,10-seco-23,24-dinor-1,3,5(10)-colatrien-
22-oico **4b**



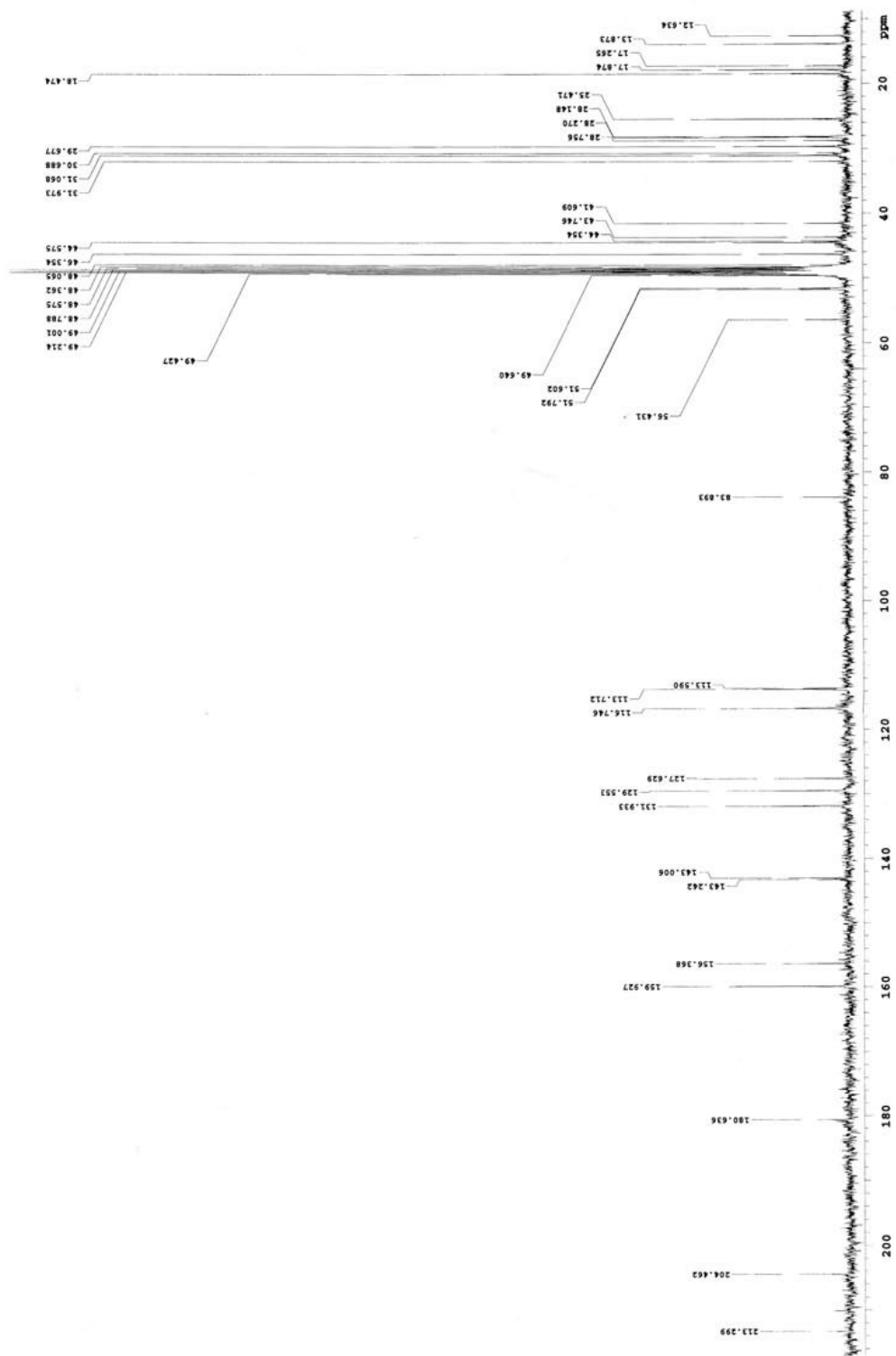
¹³C NMR di acido 3,12 α -diidrossi-9-osso-9,10-seco-23,24-dinor-1,3,5(10)-colatrien-22-
oico **4b**



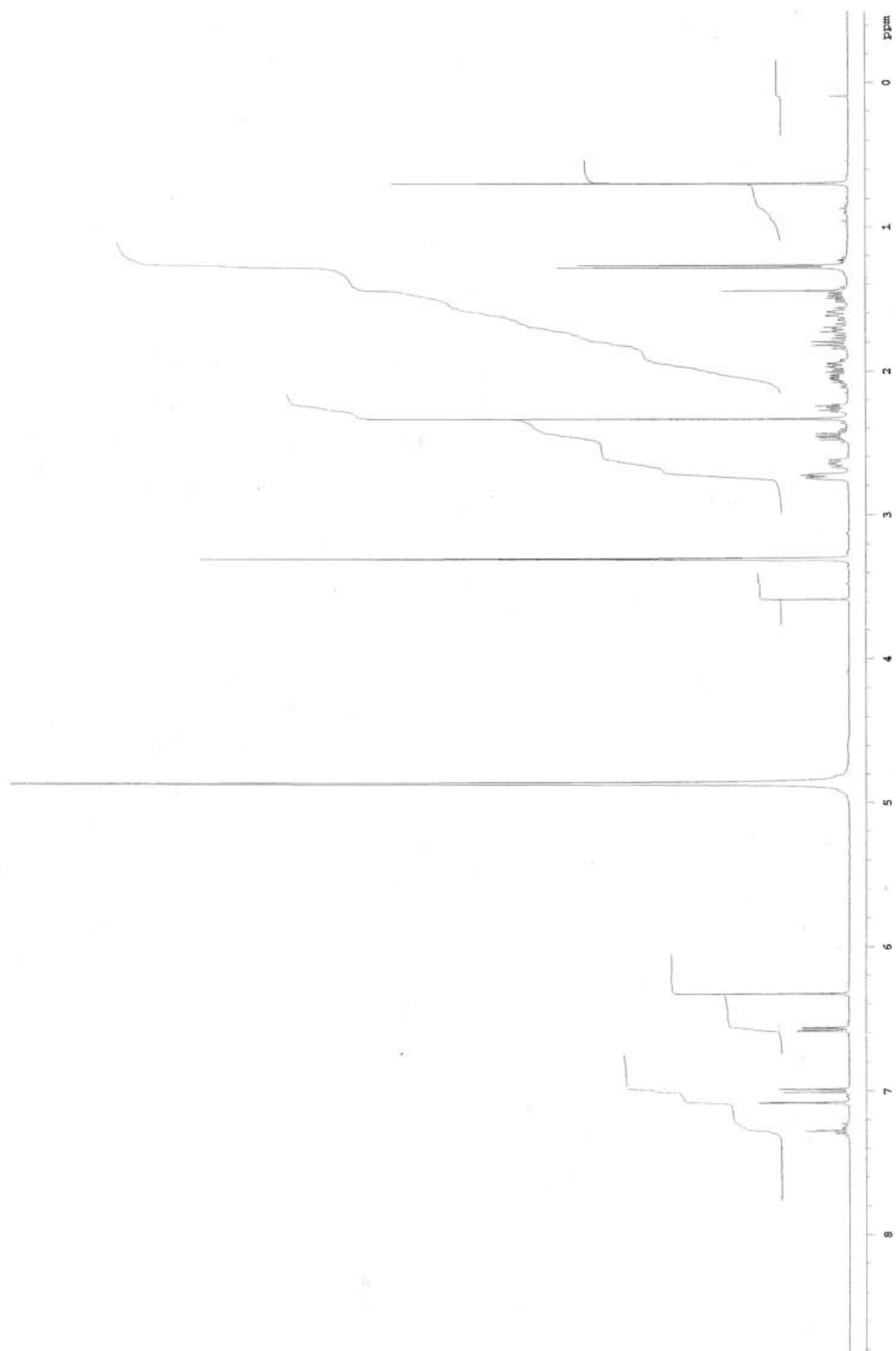
^{13}C NMR/DEPT di acido 3,12 α -diidrossi-9-osso-9,10-seco-23,24-dinor-1,3,5(10)-
colatrien-22-oico **4b**



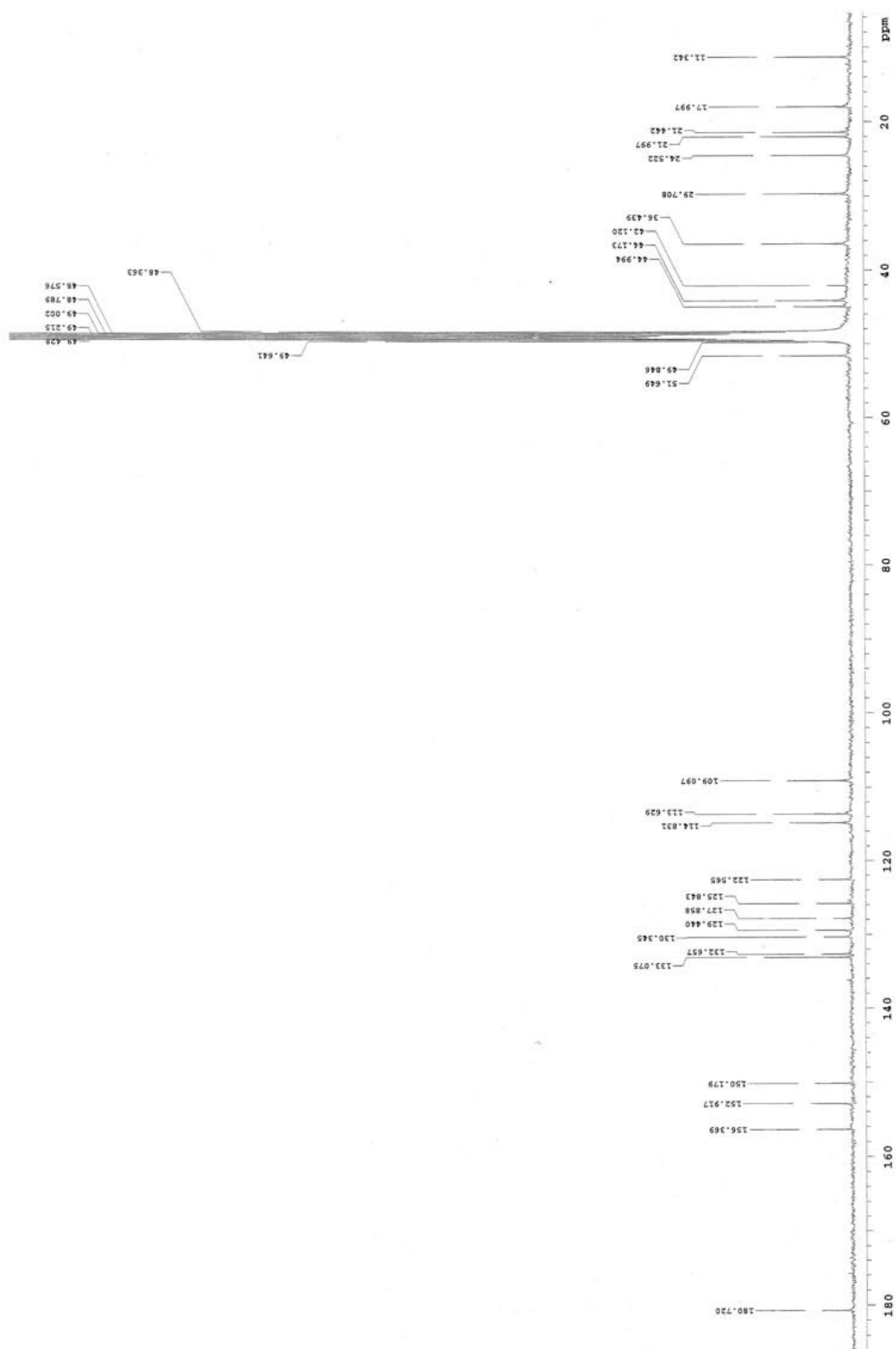
^1H NMR di acido 3-idrossi-9-osso-11-ene-9,10-seco-23,24-dinor-1,3,5(10)-colatrien-22-
oico **5b**



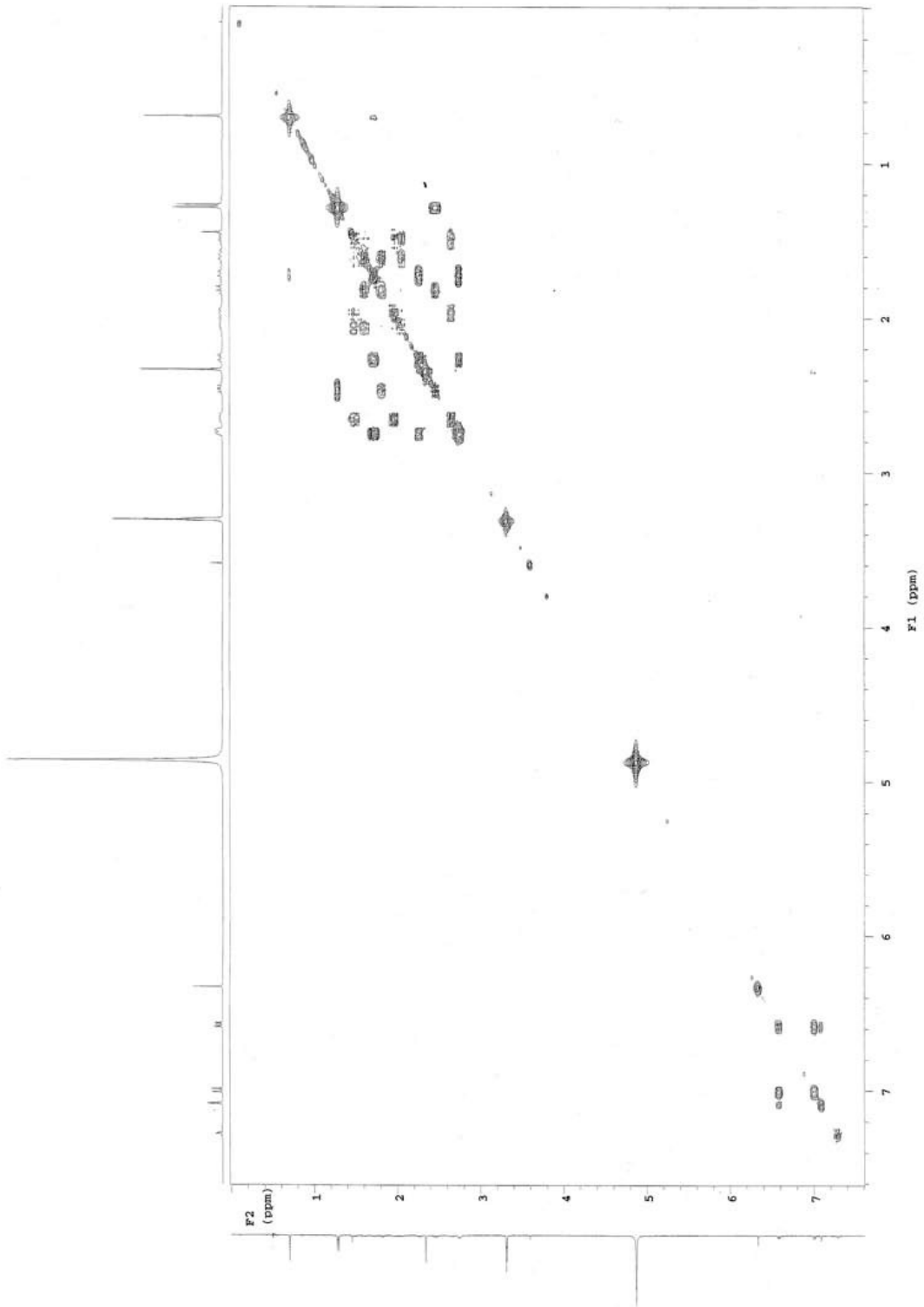
¹³CNMR di acido 3-idrossi-9-osso-11-ene-9,10-seco-23,24-dinor-1,3,5(10)-colatrien-22-
oico **5b**



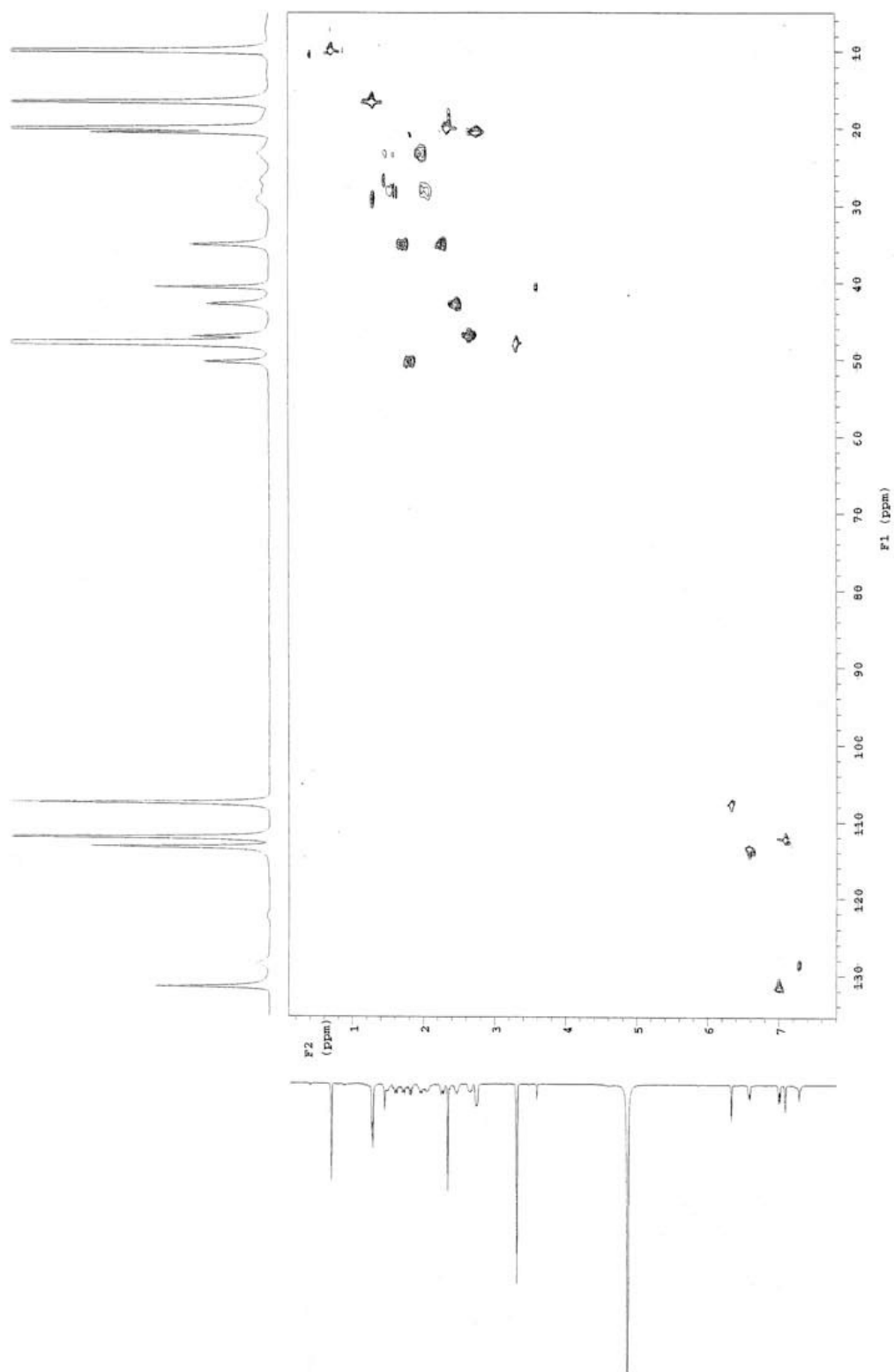
^1H NMR di acido 3-idrossi-6,8-dien-6,9-epossi-9,10-seco-23,24-dinor-1,3,5(10)-colatrien-22-oico **6c**



¹³C NMR di acido 3-idrossi-6,8-dien-6,9-epossi-9,10-seco-23,24-dinor-1,3,5(10)-colatrien-22-oico **6c**



COSY di acido 3-idrossi-6,8-dien-6,9-epossi-9,10-seco-23,24-dinor-1,3,5(10)-colatrien-22-
oico **6c**



HMQC di acido 3-idrossi-6,8-dien-6,9-epossi-9,10-seco-23,24-dinor-1,3,5(10)-colatrien-22-oico **6c**

CAPITOLO 5

Attività antibatterica ed antifungina

In questo capitolo vengono discussi i risultati delle attività antibatterica e antimicotica dei nuovi 9,10-secosteroidi riportati nei capitoli 3 e 4. Tali molecole, ottenute dalle biotrasformazioni degli acidi biliari sono risultate completamente nuove in letteratura e alcune di esse derivano da prodotti di “scarto” della lavorazione della bile (acido desossicolico e acido iodesossicolico) per cui si è pensato di effettuare alcuni test riguardanti la loro potenziale attività biologica.

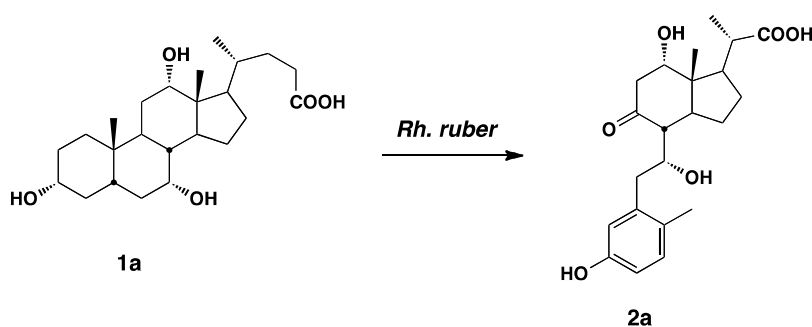
Sulla base di una ricerca bibliografica effettuata su molecole simili sono state valutate le capacità antibatteriche e antimicotiche di questi nuovi composti.

Tali studi sono stati effettuati in collaborazione col gruppo di ricerca del Prof. Gianni Sacchetti, presso il Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie dell’Università di Ferrara.

Gli esperimenti sono stati effettuati in parallelo comparando l’attività dei nuovi 9,10-secosteroidi con l’attività degli acidi biliari di partenza per valutare se i nuovi prodotti presentano attività biologica potenzialmente sfruttabile a livello industriale.

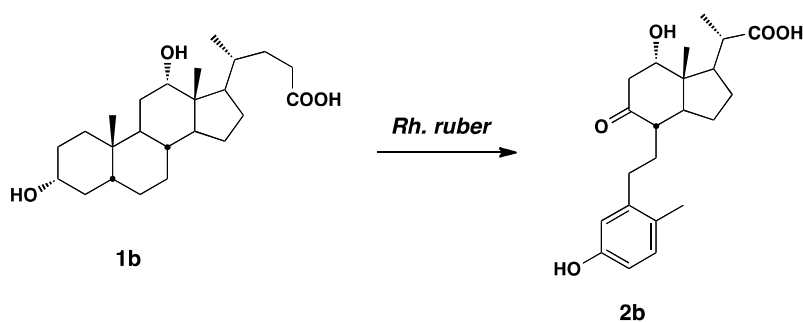
I nuovi prodotti sottoposti a test sono i seguenti:

- L’acido 3,7 α ,12 α -triidrossi-9-osso-9,10-seco-23,24-dinorcolan-1,3,5(10)-trien-22-oico **2a** che deriva dalla biotrasformazione dell’acido colico **1a** con *Rhodococcus ruber* (Schema 1);



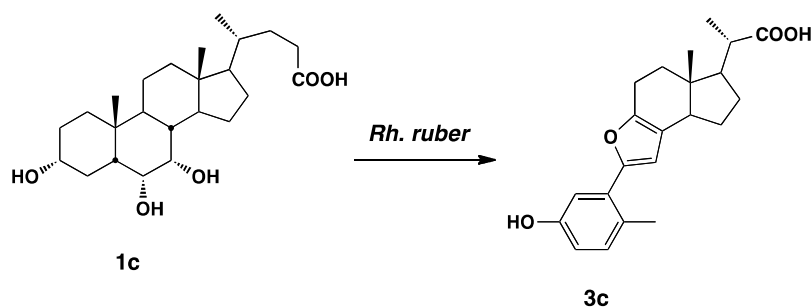
Schema 1

- L’acido 3,12 α -diidrossi-9-osso-9,10-seco-23,24-dinorcolan-1,3,5(10)-trien-22-oico **2b** che deriva dalla biotrasformazione dell’acido colico **1b** con *Rhodococcus ruber* (Schema 2);



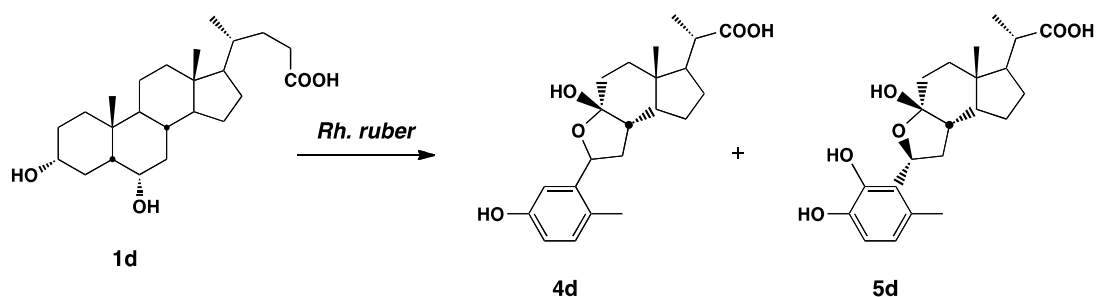
Schema 2

- L'acido 3-idrossi-6,9-epossi-9,10-seco-23,24-dinorcolan-1,3,5(10),6,8-pentaen-22-oico **3c** che deriva dalla biotrasformazione dell'acido iocolico **1c** con *Rhodococcus ruber* (Schema 3);



Schema 3

- L'acido 3,9 β -diidrossi-6 ξ ,9 α -epossi-9,10-seco-23,24-dinorcolan-1,3,5(10)-trien-22-oico **4d** e l'acido 3,4,9 β -triidrossi-6 β ,9 α -epoxy-9,10-seco-23,24-dinorcolan-1,3,5(10)-trien-22-oico **5d** che derivano dalla biotrasformazione dell'acido iodesossicolico **1d** con *Rhodococcus sp.* (Schema 4).



Schema 4

Attività antibatterica

L'attività antibatterica sui 9,10-secosteroidi ed i rispettivi prodotti di partenza, è stata valutata mediante la tecnica del disk diffusion.

Tale tecnica permette di valutare l'attività antibatterica in vitro di composti e di confrontare direttamente i risultati con l'antibiotico di riferimento (controllo positivo).

I ceppi testati sono batteri fitopatogeni (Tabella 1), batteri patogeni per l'uomo (Tabella 2) e un lievito (Tabella 3) qui inserito in quanto valutato con la stessa tecnica dei batteri.

Tabella 1. Batteri fitopatogeni

Ceppo	Gram	Codice	Pianta bersaglio	Patologie
<i>Pseudomonas syringae pv. syringae</i>	Gram-	DSM 10604	Pero	Gemma nera
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Gram-	DSM 30207	Alberi da frutto	Tumore del colletto e delle radici
			Margherita	Tumore del fusto
			Crisantemo	Tumore batterico

Al fine di valutare l'attività antibatterica i 9,10-secosteroidi sono stati preparati secondo le metodiche riportate nei Capitoli 3 e 4. I prodotti di reazione sono stati estratti e l'analisi NMR di tutti gli estratti ha confermato che le miscele contenevano i 9,10-secosteroidi di interesse con tracce dei loro precursori. Ogni estratto è stato poi solubilizzato in DMSO (100 mg/ml). Per quanto riguarda gli acidi biliari, testati parallelamente ai secosteroidi, si è proceduto direttamente con la solubilizzazione degli acidi in DMSO alla stessa concentrazione dei 9,10-secosteroidi.

La valutazione dell'attività antibatterica mediante la tecnica del disk diffusion prevede l'inoculo del microrganismo in terreno liquido precedentemente sterilizzato (TSB, NB o YEPD a seconda del ceppo). La coltura viene lasciata crescere in agitazione a temperatura controllata per i giorni necessari alla crescita (riportati nella parte sperimentale). Trascorso il tempo necessario alla crescita vengono effettuate diluizioni seriali (da 1:10⁶ a 1:10⁹) dalla coltura madre e sulla base della conta cellulare, viene stimata la concentrazione batterica presente nella beuta di partenza. Sulla base di tale concentrazione vengono effettuate

diluizioni successive mirate ad ottenere una concentrazione di 10^6 unità formanti colonie (CFU)/ml di sospensione nel caso dei batteri, mentre utilizzando *Candida albicans* tale concentrazione deve essere 10^5 unità formanti colonie (CFU)/ml di sospensione.

Tabella 2. Batteri patogeni per l'uomo

Ceppo	Gram	Codice	Bersaglio	Patologie
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram-	collezione UniFe	Polmone	Tracheobronchiti e broncopolmoniti
			Cute	Follicolite
			Vie urinarie	Cistiti e uretriti
			Orecchio	Otiti
<i>Escherichia coli</i>	Gram-	ATCC 4350	Vie urinarie	Cistiti e uretriti
			Apparato gastrointestinale	Sindromi diarroiche
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram+	ATCC 29213	Cute	Esfoliazione della pelle, foruncoli, necrosi epidermica acuta
			Apparato respiratorio	Polmonite
			Sistema nervoso centrale	Ascessi cerebrali
			Apparato scheletrico	Osteomielite
			Apparato genito-urinario	Ascesso renale, infezione delle basse vie
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Gram+	DSM 20044 ATCC 14990	Apparato cardiaco	Endocardite
<i>Micrococcus luteus</i>	Gram+	ATCC 9622	Cute	Infezioni cutanee croniche, pustole con o senza ulcerazione
			Apparato cardiaco	Endocardite
			Sistema nervoso centrale	Meningite

Tabella 3. Lieviti patogeni per l'uomo

Ceppo	Codice	Bersaglio	Patologie
<i>Candida albicans</i>	ATCC 48274	Vagina	Vaginite
		Cavo orale	Mughetto
		Cute	Infezioni superficiali della pelle

Una volta selezionata la diluizione, 100 µl vengono seminati su di una piastra petri di 90 mm contenente il terreno necessario alla crescita del microrganismo (lo stesso del terreno liquido ma addizionato di agar) e la soluzione viene dispersa in maniera omogenea. Sulle varie piastre così preparate vengono posizionati i dischetti assorbenti del diametro di 6 mm imbevuti con 10 µl del campione da testare sciolto in DMSO (100 mg/ml). Contemporaneamente vengono preparate, con la stessa modalità, piastre gemelle in cui si pone un dischetto imbevuto dell'antibiotico di riferimento per il controllo positivo: clotrimazolo (CTZ) per *Candida albicans* e cloramfenicolo (CLF) per i batteri. Oltre al controllo positivo viene effettuato anche un controllo negativo che corrisponde al solvente (DMSO) in cui è sciolto il prodotto da testare.

Le piastre vengono incubate a 30°C per 72 ore. Si misurano gli aloni di inibizione attorno ai vari dischetti per valutare l'attività antibatterica rapportandoli all'alone dell'antibiotico di riferimento a parità di concentrazioni.

Nelle Tabelle 4 e 5 vengono riportati i risultati del disk diffusion riguardanti l'attività antibatterica dei 9,10-secosteroidi **2-5** nei confronti di diversi ceppi batterici e *Candida albicans*.

Tabella 4. Attività dei 9,10-secosteroidi **2-5** su batteri fitopatogeni.

Ceppo	CLF	DMSO	2a	2b	3c	4d + 5d
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	100%	0%	0.5%	0.4%	0.2%	0.5%
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	100%	0%	0%	0%	0%	0%

Tabella 5. Attività dei 9,10-secosteroidi **2-5** su batteri patogeni per l'uomo e su *Candida albicans*

Ceppo	CLF	DMSO	2a	2b	3c	4d + 5d
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100%	0%	0.12%	0.24%	0%	0.72%
<i>Escherichia coli</i>	100%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	0%	0%	0%	1.28%	0%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100%	0%	0.24%	0.24%	1.04%	0.24%
<i>Micrococcus luteus</i>	100%	0%	0%	0%	0.4%	0%
	CTZ					

<i>Candida albicans</i>	100%	0%	0%	0%	0%	0%
-------------------------	------	----	----	----	----	----

Dai dati raccolti i composti testati non mostrano nessuna attività antibatterica nei confronti dei batteri fitopatogeni, di quelli patogeni per l'uomo e di *Candida albicans*.

In parallelo, insieme ai secosteroidi, sono stati testati anche gli acidi biliari che costituiscono i substrati delle biotrasformazioni per verificare se i nuovi prodotti possono costituire un valore aggiunto rispetto ai prodotti di partenza. Nelle Tabelle 6 e 7 vengono riportati i risultati dell'attività antimicrobica degli acidi biliari sugli stessi ceppi testati con gli acidi biliari.

Tabella 6. Attività degli acidi biliari **1a-d** su batteri fitopatogeni

Ceppo	CLF	DMSO	1a	1b	1c	1d
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	100%	0%	0%	0%	0.1%	0.25%
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	100%	0%	0.4%	0.2%	0.4%	0.5%

Tabella 7. Attività degli acidi biliari **1a-d** su batteri patogeni per l'uomo e su *Candida albicans*

Ceppo	CLF	DMSO	1a	1b	1c	1d
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>Escherichia coli</i>	100%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	0%	0.4%	1.4%	0.4%	0.8%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100%	0%	0.28%	1%	0.8%	1.6%
<i>Micrococcus luteus</i>	100%	0%	0.56%	0.4%	0.3	0%
	CTZ					
<i>Candida albicans</i>	100%	0%	0.32%	3.6%	2.6%	2.3%

Anche nel caso degli acidi biliari non si sono evidenziati ceppi sensibili a questo tipo di composti.

Attività antifungina

L'attività antimicotica è stata valutata mediante un test di valutazione dell'inibizione della crescita diametrale dei funghi testati. Grazie a questa metodologia è possibile verificare se le molecole o le miscele testate sono in grado di interferire con la crescita dei funghi utilizzati. I microrganismi utilizzati per questi test sono funghi fitopatogeni (Tabella 8) e funghi dermatofiti (Tabella 9).

Tabella 8. Funghi fitopatogeni

Ceppo	Codice/provenienza	Pianta bersaglio	Patologie
<i>Botrytis cinerea</i>	BC (collezione DIPROVAL Bologna)	Pero, vite, agrumi, albicocco, ciliegio e altre	Marciume grigio
<i>Neonectria galligena</i>	NG (collezione DIPROVAL Bologna)	Pomacee (melo, pero, cotogno, nespolo)	Cancro delle pomacee
<i>Alternaria sp.</i>	A (collezione DIPROVAL Bologna)	Asteracee (lattuga, radicchio, carciofo, girasole...), patate, pomodoro fava, piselli	Macchie nere, avvizzimento e marciume
<i>Fusarium moniliforme</i>	ATCC 36541	Mais	Marciume grigio
<i>Fusarium oxysporum f. sp. radicans</i>	FO (SIAPA)	Pomodoro	Marciume radicale
<i>Phoma betae</i>	PB (Bologna)	Bietola	Mal del piede
<i>Penicillium crustosum</i>	PC (SIAPA)	Cereali, mele, pere, frutta secca	Produzione di tossine pericolose per gli animali
<i>Pythium ultimum</i>	CBS 29131	Cavolo, carota, cetriolo, melone, ecc...	Marciume radicale e avvizzimento
<i>Sclerotinia minor</i>	SM (SIAPA)	Soia, girasole, fagiolo, cetriolo, lattuga, spinaci, cavoli, patate dolci, patate irlandese, pepe, pomodori, arachidi	Ruggine, muffa bianca, marciumi
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	SS (SIAPA)	Piante erbacee e succulente, in particolare fiori e ortaggi	Muffa bianca

Tabella 9. Funghi dermatofiti

Ceppo	Codice/Provenienza	Bersaglio	Patologie
<i>Thricophyton mentagrophytes</i>	CBS 160 66	Cute	Dermatomicosi quali la tigna (infezione della cute)
<i>Nannizia gypsea</i>	NGY (Collezione Unife)	Cuoio capelluto	Dermatomicosi quali la tigna
<i>Trichophyton tonsurans</i>	TT (Collezione Unife)	Cuoio capelluto	Perdita di capelli infiammazione, desquamazione, pustole e prurito.
<i>Microsporium gypseum</i>	MG (Collezione Unife)	Pelle, capelli, peli, unghie	Eritema, desquamazione, talora pustole, croste ed alterazioni del capello che si tronca originando alopecia

Per il test di attività antifungina si prepara il terreno di coltura Potato Dextrose Agar (PDA) suddividendolo in un numero di beute equivalente ai composti da testare. Una volta sterilizzato il terreno viene fatto raffreddare fino a 48°C, e si aggiungono i composti **2-5** (concentrazione finale 1 g/l) sciolti in DMSO e il terreno viene versato nelle piastre petri e lasciato solidificare.

Sulle petri così preparate si inoculano i funghi utilizzando colture in terreno solido (preparate una settimana prima) da cui viene asportata una parte di micelio che viene trasferita nella nuova petri. I funghi vengono fatti crescere nelle opportune condizioni (riportate nella parte sperimentale). Terminata l'incubazione vengono misurati i diametri raggiunti e confrontati con il controllo negativo (funghi cresciuti su PDA in presenza del solvente (DMSO).

Di seguito vengono riportati i risultati dell'attività antimicotica dei 9-10-secoosteroidi **2-5** nei confronti di funghi fitopatogeni (Tabella 10) che verranno poi confrontati con l'attività antifungina degli acidi biliari di partenza **1a-d** (Tabella 11).

Tabella 10. Attività dei 9,10-secosteroidi **2-5** su funghi fitopatogeni.

Ceppo	DMSO	2a	2b	3c	4d + 5d
<i>Botrytis cinerea</i>	0%	30%	64%	62%	78%
<i>Neonectria galligena</i>	0%	36%	50%	39%	56%
<i>Alternaria sp.</i>	0%	0%	0%	0%	0%
<i>Fusarium moniliforme</i>	0%	34%	45%	42%	95%
<i>Fusarium oxysporum f. sp. radicis lycopersici</i>	0%	40%	40%	40%	66%
<i>Phoma betae</i>	0%	37%	67%	89%	70%
<i>Penicillium crustosum</i>	0%	8%	12%	12%	20%
<i>Pythium ultimum</i>	0%	95%	55%	87%	100%
<i>Sclerotinia minor</i>	0%	100%	89%	93%	10%
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	0%	79%	80%	89%	98%

Gli estratti delle biotrasformazioni degli acidi biliari hanno dimostrato una buona attività di inibizione della crescita dei funghi fitopatogeni.

Il 9,10-secosteroide **2a** (estratto della biotrasformazione di acido colico con *Rh. ruber*), mostra una spiccata attività nei confronti di *Pythium ultimum* (responsabile dell'avvizzimento e della comparsa di marciume nelle piante infestate) e di *Sclerotinia minor* (patologia che causa la comparsa di muffa bianca e ruggine sulle colture) con rese di inibizione di crescita rispettivamente pari a 95 e 100%. Un buon risultato è stato ottenuto anche con *Sclerotinia sclerotiorum* (79% di inibizione), fungo che provoca la comparsa di muffa bianca soprattutto su ortaggi mentre con gli altri ceppi testati non si sono evidenziate significative attività antifungine (inibizione 8-40%).

Per quanto riguarda il prodotto **2b** (estratto della biotrasformazione di acido desossicolico con *Rh. ruber*), è risultato molto attivo su *Sclerotinia minor* (100% di inibizione) e su *Sclerotinia sclerotiorum* (95% di inibizione). Buoni risultati si sono ottenuti anche con *Botrytis cinerea* (64%) e con *Phoma betae* (67%): questi due fitopatogeni generano due diverse patologie nelle colture contagiate, il primo la comparsa di marciume grigio mentre il secondo provoca una patologia denominata “mal del piede”. Gli altri ceppi invece non si sono dimostrati particolarmente sensibili a **2b** infatti i valori di inibizione di crescita non superano il 55%.

Il 9,10-secosteroide **3c** (estratto della biotrasformazione di acido iocolico con *Rh. ruber*), invece, mostra un'ottima attività su *Phoma betae* con resa di inibizione pari all'89%, su *Sclerotinia minor* (93%) e su *Sclerotinia sclerotiorum* (89%). Anche su *Pythium ultimum* si ottiene un buon risultato (87% di inibizione). Per quanto riguarda gli altri funghi fitopatogeni l'unico ad essere inibito significativamente nella crescita da **3c** è *Botrytis cinerea* (62%), mentre il valore di inibizione per gli altri ceppi non raggiunge il 50%.

Infine la miscela dei 9,10-secosteroidei **4d** e **5d** (estratto della biotrasformazione di acido iodesossicolico con *Rh. ruber*), è in grado di inibire totalmente la crescita di *Pythium ultimum* e di fornire ottimi risultati nell'attività antifungina su *Sclerotinia sclerotiorum* (98% di inibizione) e su *Fusarium moniliforme* (95% di inibizione), ceppo che provoca la comparsa di marciume grigio sul mais. Buoni risultati si ottengono anche con *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum f. sp. radicis licopersici* (responsabile di marciume radicale delle piante infestate) e su *Phoma betae* con rese di inibizione variabili tra il 66% e il 78%. Con gli altri funghi fitopatogeni invece non si sono ottenuti risultati apprezzabili.

La stessa metodologia è stata utilizzata per testare l'attività degli acidi biliari di partenza **1a-d**. Di seguito vengono riportati i risultati dell'attività antimicotica degli acidi biliari **1a-d** nei confronti di funghi fitopatogeni (Tabella 11).

Tabella 11. Attività degli acidi biliari **1a-d** su funghi fitopatogeni.

Ceppo	DMSO	1a	1b	1c	1d
<i>Botrytis cinerea</i>	0%	92%	80%	78%	56%
<i>Neonectria galligena</i>	0%	52%	48%	41%	15%
<i>Alternaria sp.</i>	0%	66%	66%	83%	66%
<i>Fusarium moniliforme</i>	0%	30%	80%	39%	39%
<i>Fusarium oxysporum f. sp. radicis licopersici</i>	0%	22%	70%	48%	37%
<i>Phoma betae</i>	0%	61%	91%	96%	87%
<i>Penicillium crustosum</i>	0%	24%	32%	8%	0%
<i>Pythium ultimum</i>	0%	23%	100%	92%	100%
<i>Sclerotinia minor</i>	0%	98%	85%	56%	52%
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	0%	93%	90%	90%	79%

L'acido colico **1a** ha dimostrato un'ottima attività nell'inibizione della crescita di *Botrytis cinerea* (92%), di *Sclerotinia sclerotiorum* (93%) e un'inibizione quasi totale (98%) nella crescita di *Sclerotinia minor*. Tutti questi ceppi generano la comparsa di marciume e muffe sulle colture infestate.

Buoni risultati sono stati ottenuti con *Alternaria sp.* (66%) che provoca la comparsa di macchie nere sulle piante infestate e con *Phoma betae* (61%). L'acido colico **1a** ha dimostrato modesta attività antifungina anche sugli altri ceppi (22-52%).

Molti fitopatogeni sono risultati sensibilmente inibiti dall'acido desossicolico **1b**. In particolare la crescita di *Pythium ultimum* risulta totalmente inibita (100%) mentre i dati per *Phoma betae* sono pari al 91%, per *Sclerotinia sclerotiorum* al 90%, per *Sclerotinia minor* all'85% e per *Botrytis cinerea* e *Fusarium moniliforme* all'80%.

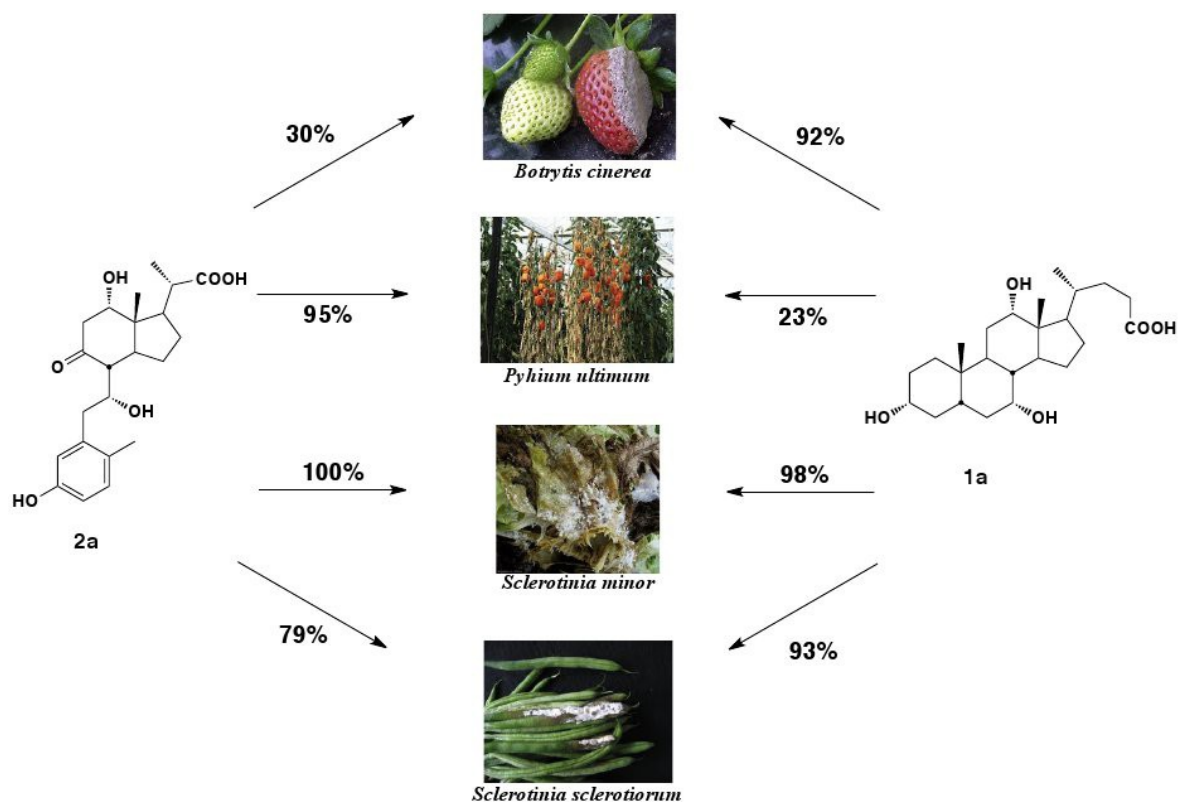
Rese di inibizione di crescita inferiori alle precedenti si hanno con *Alternaria sp.* e *Fusarium oxysporum f. sp. radicis lycopersici* (66% e 70%, rispettivamente) mentre blanda attività è stata riscontrata su *Neonectria galligena* e *Penicillium crustosum* (48% e 32%, rispettivamente).

L'acido iocolico **1c**, è risultato essere molto attivo su *Phoma betae* (96% di inibizione), su *Pythium ultimum* la cui crescita è stata inibita del 92% e su *Sclerotinia sclerotiorum* (90% di inibizione). *Alternaria sp.* e *Botrytis cinerea* sono risultate anch'esse sensibili all'acido biliare **1c** con rese di inibizione di crescita rispettivamente dell'83% e del 78%. Per quanto riguarda gli altri ceppi invece non sono stati ottenuti valori di inibizione di crescita superiori al 50%.

L'ultimo acido biliare testato è l'acido iodesossicolico **1d**. Tale composto è in grado di inibire totalmente la crescita di *Pythium ultimum* (100%) e da un ottimo risultato anche con *Phoma betae* (87% di inibizione). Il test su *Alternaria sp.* e *Sclerotinia sclerotiorum* fornisce invece valori di inibizione di crescita rispettivamente del 66 e 79%, mentre gli altri fitopatogeni non si sono dimostrati particolarmente sensibili all'acido iodesossicolico **1d**.

Confrontando i risultati dell'attività dei nuovi 9,10-secosteroidi **2-5** con quella degli acidi biliari di partenza **1a-d** è emerso che vi sono sia analogie sia differenze nell'attività antifungina.

Nello schema 5 vengono riassunti i risultati migliori in termini di attività antifungina del 9,10-secosteroide **2a** e del rispettivo prodotto di partenza **1a**.



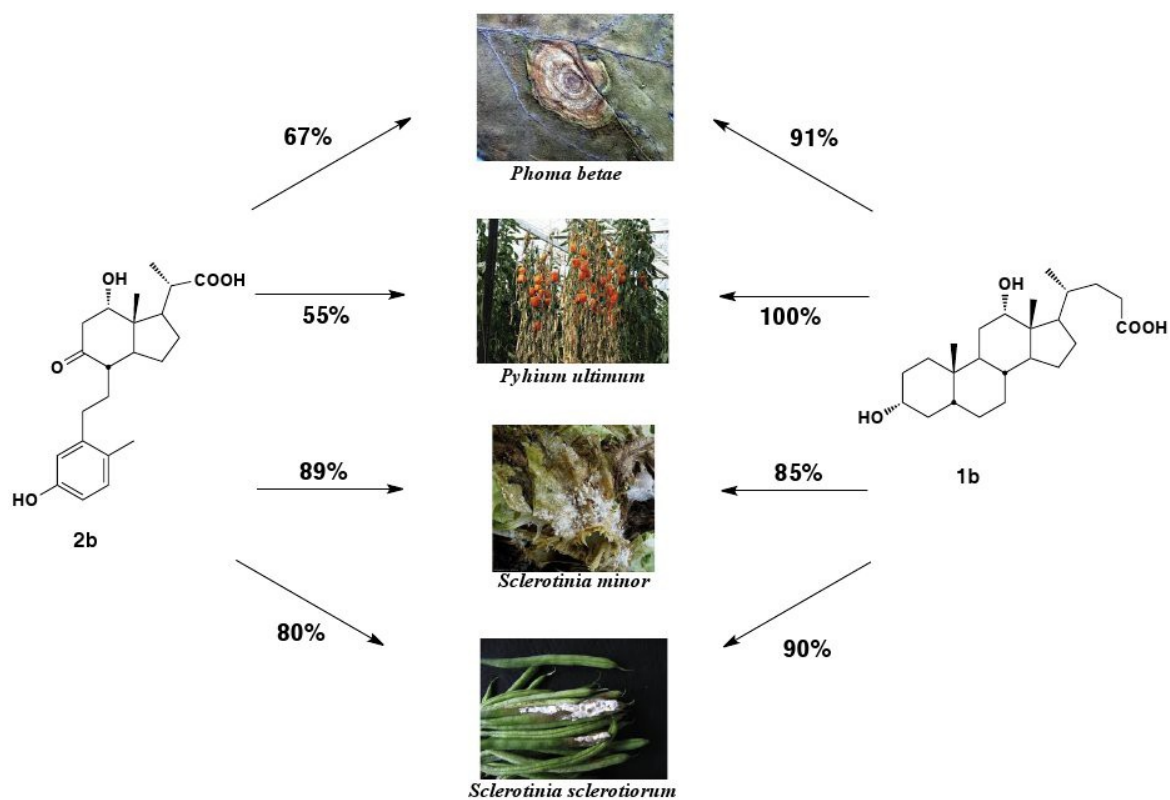
Schema 5.

L'acido colico **1a** è risultato essere molto attivo su *Botrytis cinerea* infatti la resa di inibizione di crescita risulta del 92%, in seguito a biotrasformazione dell'acido colico si ottiene il 9,10-secosteroide **2a** che, in questo caso, presenta un'attività antifungina molto inferiore rispetto a quella del substrato di partenza (30% di inibizione). Per quanto riguarda *Pythium ultimum* si presenta la situazione inversa, mentre con l'acido colico **1a** si ha un'attività antifungina molto bassa (23%), col prodotto derivante da biotrasformazione **2a** l'attività aumenta drasticamente infatti l'inibizione della crescita arriva al 95%.

Con *Sclerotinia minor* entrambi i prodotti **1a** e **2a** presentano un'ottima attività nei confronti di questo fitopatogeno con rese rispettivamente del 98 e 100%.

Da ultimo *Sclerotinia sclerotiorum* risulta essere inibito dall'acido colico **1a** con resa del 93% mentre utilizzando il prodotto di biotrasformazione si nota una lieve diminuzione dell'effetto antifitopatogeno (79% di inibizione).

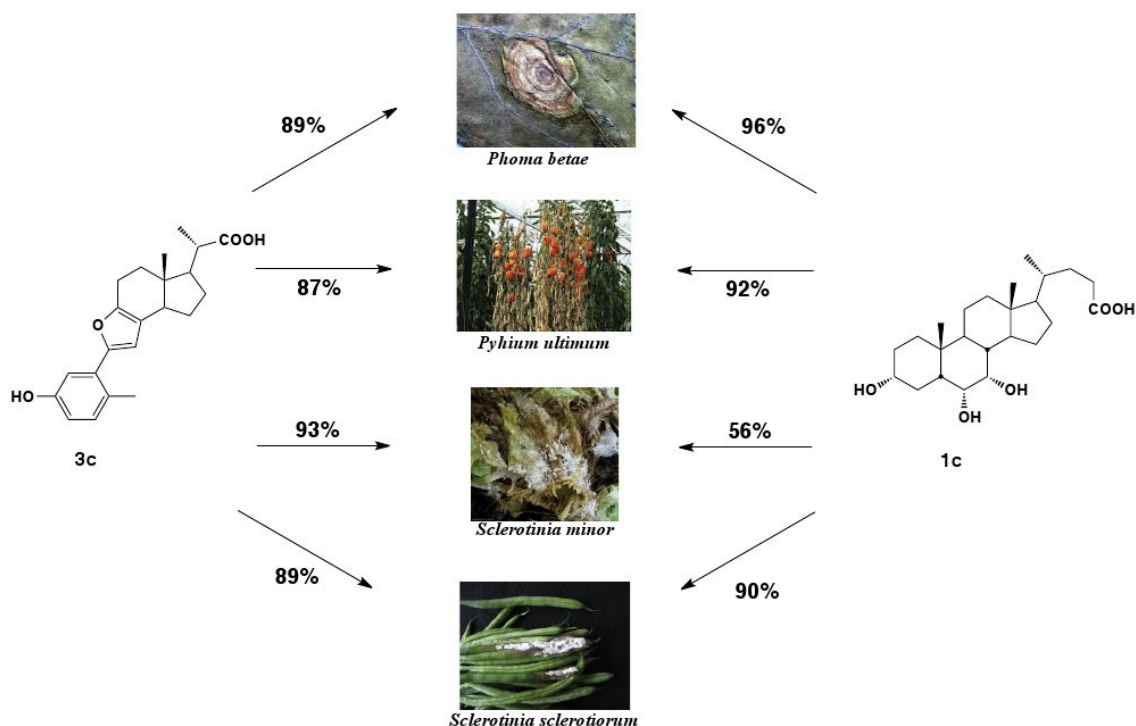
Nello schema 6 vengono riassunti i risultati migliori in termini di attività antifungina del 9,10-secosteroide **2b** e del rispettivo prodotto di partenza **1b**.



Schema 6

Comparando i migliori dati dell'attività antifungina dell'acido desossicolico **1b** e del 9,10-secosteroide **2b** derivante da biotrasformazione è risultato che in tutti casi l'acido desossicolico ha un'attività superiore al prodotto di biotrasformazione. L'unico dato comparabile è quello su *Sclerotinia minor*.

Analogamente per quanto fatto per gli altri prodotti, lo schema 7 riassume i risultati migliori in termini di attività antifungina del 9,10-secosteroide **3c** e del rispettivo prodotto di partenza **1c**.



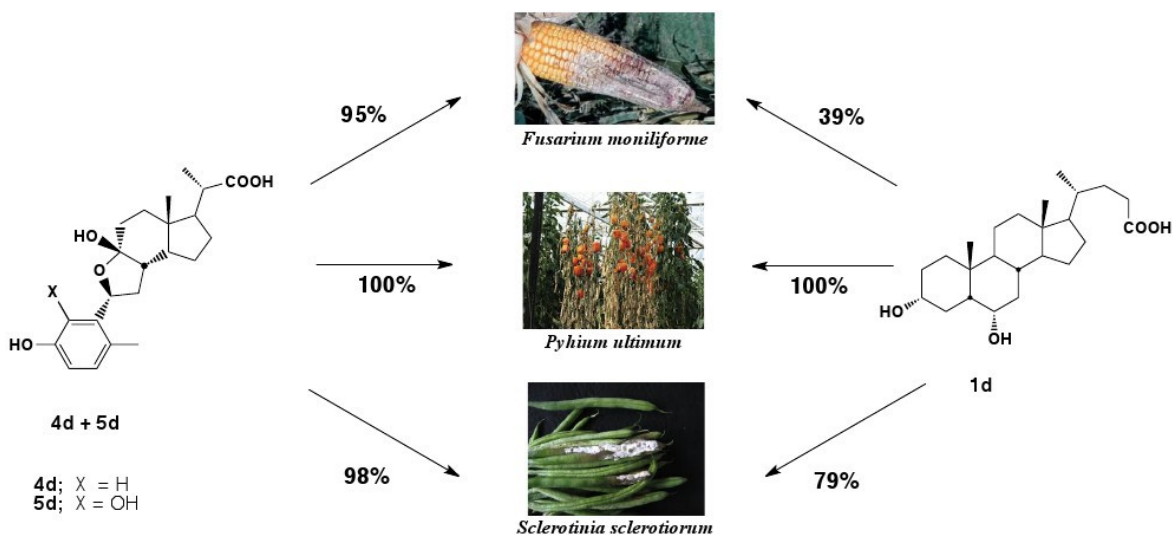
Schema 7

Phoma betae risulta essere inibito quasi totalmente dall'acido iocolico **1c** (resa di inibizione del 96%) mentre utilizzando il prodotto di biotrasformazione **3c** si nota una lieve diminuzione dell'effetto antifitopatogeno (89%). Una situazione analoga si presenta con *Pythium ultimum*, infatti mentre l'acido iocolico **1c** è in grado di inibire la crescita del 92%, col corrispondente 9,10-secosteroide **3c** si ottiene un'inibizione dell'87%.

Andamento opposto si ha nel test di inibizione su *Sclerotinia minor* dove il secosteroide **3c** inibisce quasi totalmente la crescita (93%) mentre l'acido iocolico **1c** ha un'attività antifungina relativamente bassa (56%).

Per quanto riguarda *Sclerotinia sclerotiorum* entrambi i prodotti **1c** e **3c** presentano un'ottima attività nei confronti di questo fitopatogeno con inibizione rispettivamente del 90% e dell'89%.

Infine nello Schema 8 vengono riportati i risultati migliori in termini di attività antifungina della miscela dei 9,10-secosteroidei **4d** e **5d** e del rispettivo prodotto di partenza **1d**.



Schema 8

L'attività antifungina dell'acido iodesossicolico **1d** su *Fusarium moniliforme* risulta essere relativamente bassa (39% di inibizione di crescita), mentre utilizzando la miscela di 9,10-secosteroidi **4d** e **5d** l'attività aumenta infatti si ottiene un valore di inibizione della crescita del 95%. Per quanto riguarda *Pythium ultimum* la capacità dell'acido iodesossicolico **1d** di inibire totalmente la crescita di questo fitopatogeno viene mantenuta anche nell'estratto di biotrasformazione contenente i 9,10-secosteroidi **4d** e **5d**.

Infine con *Sclerotinia sclerotiorum* il substrato di partenza **1d** presenta una buona attività antifungina (79% di inibizione), tale attività subisce un incremento (98%) se viene utilizzata la miscela di secosteroidi **4d** e **5d**.

I risultati dell'attività dei 9,10-secosteroidi **2-5** e degli acidi biliari **1a-d** nel test di inibizione di crescita diametrico su funghi dermatofiti sono riportati rispettivamente nelle Tabelle 12 e 13. La metodologia utilizzata è la stessa adottata per i funghi fitopatogeni.

Tabella 12. Attività dei 9,10-secosteroidi **2-5** su funghi dermatofiti.

Ceppo	DMSO	2a	2b	3c	4d + 5d
<i>Thricophyton mentagrophytes</i>	0%	27%	9%	19%	9%
<i>Nannizia gypsea</i>	0%	45%	0%	14%	10%
<i>Trichophyton tonsurans</i>	0%	0%	30%	40%	90%
<i>Microsporium gypseum</i>	0%	27%	46%	4%	11%

L'inibizione di crescita sui funghi dermatofiti dei 9,10-secosteroidi **2-5** è in generale inferiore al 50%. L'unico risultato degno di nota è quello ottenuto con la miscela di **4d** e **5d** su *Trichophyton tonsurans* (90% di inibizione).

Con gli altri ceppi i risultati migliori sono: 27% di inibizione di *Thricophyton mentagrophytes* e 45% di inibizione di *Nannizia gypsea* con il 9,10-secosteroide **2a**, ottenuto da acido colico, e 46% di inibizione di *Microsporum gypseum* con il 9,10-secosteroide **2b**, ottenuto da acido desossicolico.

Anche per quanto riguarda l'attività antifungina sono stati studiati in parallelo gli acidi biliari da cui si ottengono i nuovi secosteroidi.

Tabella 13. Attività degli acidi biliari **1a-d** su funghi dermatofiti

Ceppo	DMSO	1a	1b	1c	1d
<i>Thricophyton mentagrophytes</i>	0%	0%	22%	0%	22%
<i>Nannizia gypsea</i>	0%	0%	25%	0%	0%
<i>Trichophyton tonsurans</i>	0%	0%	50%	0%	25%
<i>Microsporum gypseum</i>	0%	0%	40%	0%	27%

Gli studi condotti sulla attività su funghi dermatofiti degli acidi biliari **1a-d** ha fornito risultati analoghi a quelli ottenuti con i secosteroidi ottenuti da biotrasformazioni degli stessi acidi (Tabella 12).

Utilizzando questi ceppi dermatofiti, gli acidi colico **1a** e iocolico **1c** non hanno mostrato capacità inibitoria della crescita.

Per quanto riguarda *Thricophyton mentagrophytes* risulta essere inibito del 22% sia dall'acido desossicolico **1b** sia dall'acido iodesossicolico **1d**.

L'unico acido biliare attivo su *Nannizia gypsea* è l'acido desossicolico **1b** anche se con bassa resa di inibizione (25%).

Per ultimo, *Microsporum gypseum* viene inibito del 40% dall'acido desossicolico **1b** e del 27% dall'acido iodesossicolico **1d**.

Confrontando i risultati dell'attività dei nuovi 9,10-secosteroidi **2-5** con quella degli acidi biliari di partenza **1a-d** è emerso che l'unico ceppo risultato particolarmente sensibile ai

prodotti testati è *Trichophyton tonsurans* la cui crescita risulta inibita dalla miscela di 9,10 secosteroidi **4d** e **5d** del 90% mentre se si utilizza il prodotto di partenza **1d** si ottiene solamente un 22% di inibizione.

In conclusione i 9,10-secosteroidi ottenuti da biotrasformazioni di acidi biliari si sono dimostrati buoni o addirittura ottimi inibitori della crescita di ceppi patogeni soprattutto per le piante. Risultati poco apprezzabili sono stati ottenuti in merito all'attività antibatterica e all'attività su funghi dermatofiti ad eccezione di *Trichophyton tonsurans*.

Parte sperimentale

Attività antibatterica: disk diffusion

Ogni battere da testare è stato inoculato in 50 ml di terreno liquido precedentemente sterilizzato: i terreni utilizzati e le condizioni di crescita dei vari ceppi vengono riportati in Tabella 14.

Tabella 14. Condizioni di crescita dei batteri

Ceppo	terreno	t di crescita (giorni)	T di crescita (°C)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	TSB	3	28
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	NB	3	28
<i>Escherichia coli</i>	NB	1	37
<i>Staphylococcus aureus</i>	TSB	1	37
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	TSB	1	37
<i>Micrococcus luteus</i>	TSB	1	37
<i>Candida albicans</i>	YEPD	3	37

I brodi di coltura utilizzati hanno la seguente composizione:

- TSB (Tryptic soy broth): digerito pancreatico di caseina (17 g/l), digerito peptico di farina di soia (3 g/l) destrosio (2.5 g/l), NaCl (5 g/l) e K₂HPO₄ (2.5 g/l);
- NB (Nutrient broth): peptone (5 g/l) ed estratto di carne (3 g/l);
- YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose): estratto di lievito (10 g/l), peptone (20 g/l) e destrosio (20 g/l).

Trascorso il tempo necessario alla crescita vengono effettuate diluizioni seriali (da 1:10⁶ a 1:10⁹) dalla coltura madre e sulla base della conta cellulare, viene stimata la concentrazione batterica presente nella beuta di partenza. Sulla base di tale concentrazione vengono effettuate diluizioni successive mirate ad ottenere una concentrazione di 10⁶ unità formanti colonie (CFU)/ml di sospensione nel caso dei batteri, mentre utilizzando *Candida albicans* tale concentrazione deve essere 10⁵ unità formanti colonie (CFU)/ml di sospensione.

Le conte cellulari delle beute madri e le diluizioni effettuate vengono riportate nella tabella 15.

Tabella 15.

Ceppo	CFU/ml	Diluizione
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	2×10^9	1:2x10 ³
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	1×10^9	1:1x10 ³
<i>Escherichia coli</i>	5×10^9	1:5x10 ³
<i>Staphylococcus aureus</i>	3×10^9	1:3x10 ³
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3×10^8	1:3x10 ²
<i>Micrococcus luteus</i>	6×10^8	1:6x10 ²
<i>Candida albicans</i>	7×10^7	1:7x10 ²

Per ogni battere la diluizione selezionata (100 µl) viene seminata su di una piastra petri (contenente lo stesso terreno dell'inoculo in brodo liquido addizionato di 15 g/l di agar) e la sospensione viene spalmata sull'intera superficie con l'aiuto di una bacchetta di vetro sterile. Sulla piastra vengono posti dei dischetti di carta assorbente (5 per ogni piastra) bagnati con 10 µl di una soluzione (100 mg/ml di DMSO) del composto da testare (i.e. 9,10-secosteroidi o acidi biliari di partenza). Per ogni microrganismo sono preparate piastre gemelle per il controllo negativo (DMSO) ed il controllo positivo (antibiotico di riferimento).

Il controllo negativo viene fatto con dischetti (6 mm) imbevuti di 10 µl di DMSO mentre i controlli positivi, cloramfenicolo (CLF) per i batteri e clotrimazolo (CTZ) per *Candida albicans*, sono fatti bagnando i dischetti con 10 µl di soluzioni aventi concentrazione rispettivamente di 2 mg/ml di acqua e 1 mg/ml di DMSO.

Le piastre vengono poi lasciate incubare nelle medesime condizioni delle colture in terreno liquido e successivamente si passa alla lettura dei risultati misurando l'alone di inibizione (spazio presente dal dischetto alle colonie). Tale parametro permette di definire l'attività antibatterica di una sostanza (Figura 1).

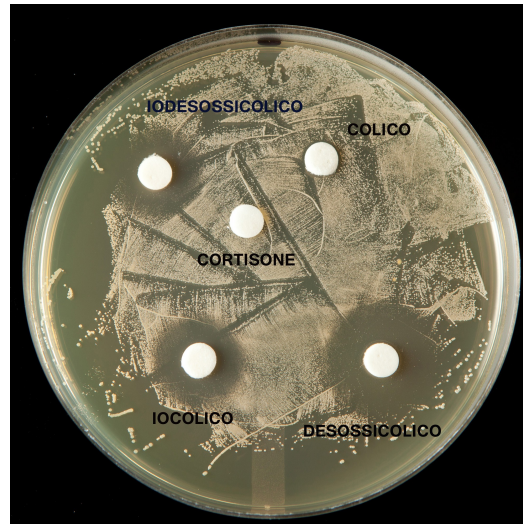


Figura 1. Disk diffusion con *Candida albicans*

I valori di aloni di inibizione (in mm) ottenuti dai test disk diffusion su batteri fitopatogeni e su batteri patogeni per l'uomo e su *Candida albicans* dei 9,10-secoosteroidi **2-5** vengono riportati nelle Tabelle 16 e 17.

Tabella 16. Attività di 9,10-secoosteroidi su batteri fitopatogeni

Ceppo	CLF	DMSO	2a	2b	3c	4d + 5d
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	10	0	2.5	2	1	2.5
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	27	0	0	0	0	0

Tabella 17. Attività di 9,10-secoosteroidi su batteri patogeni per l'uomo e su *Candida albicans*

Ceppo	CLF	DMSO	2a	2b	3c	4d + 5d
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	0	0	0	3	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	17	0	1	1	5	1
<i>Micrococcus luteus</i>	10	0	0	0	0.5	0
	CTZ					
<i>Candida albicans</i>	12	0	0.5	6	5	4

Questi valori sono poi stati convertiti in percentuali di attività (riportati nelle tabelle 4 e 5) tenendo conto della differenza di concentrazione tra gli acidi biliari e gli estratti preparati e gli antibiotici di riferimento.

- per i batteri si utilizza l'equazione:
- per *Candida albicans* si utilizza l'equazione:

dove in entrambi i casi

A1 = alone inibizione sostanza testata in mm

A2 = alone inibizione antibiotico di riferimento in mm

Stessa procedura viene utilizzata sugli acidi biliari **1a-d** utilizzando le medesime concentrazioni dei secosteroidi **2-5**. I valori di aloni di inibizione ottenuti dai test disk diffusion su batteri fitopatogeni e su batteri patogeni per l'uomo e *Candida albicans* degli acidi biliari **1a-d** vengono riportati nelle Tabelle 18 e 19.

Tabella 18. Attività degli acidi biliari **1a-d** su batteri fitopatogeni.

Ceppo	CLF	DMSO	1a	1b	1c	1d
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	25	0	0	0	1	3
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	9	0	2	1	2	3

Tabella 19. Attività degli acidi biliari **1a-d** su batteri patogeni per l'uomo e su *Candida albicans*

Ceppo	CLF	DMSO	1a	1b	1c	1d
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	1	4	1	2	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	14	0	1	4	3	6
<i>Micrococcus luteus</i>	7	0	1	1	0	0
	CTZ					
<i>Candida albicans</i>	3	0	0.5	6	5	4

Anche per questi risultati sono poi stati convertiti in valori percentuali (riportati nelle tabelle 6 e 7) che tengono conto della differenza di concentrazione tra gli acidi biliari e gli antibiotici di riferimento utilizzando le equazioni precedenti.

Attività antifungina: test di inibizione di crescita diametrale

Si prepara il terreno solido PDA (Potato Dextrose Agar) avente la seguente composizione: estratto di patata (5 g/l), glucosio (20 g/l) e agar (15 g/l). Al terreno sterilizzato a 121°C per 15 min., una volta raffreddato a 50°C circa, viene aggiunto il composto da testare in quantità tale da ottenere una concentrazione di 1 g/l. Il terreno così preparato viene versato nelle piastre (20 ml per piastra). Con la stessa metodologia vengono preparate un ugual numero di piastre per il controllo negativo con un terreno contenente DMSO (1 g/l).

Una volta solidificato il terreno si inocula il fungo prelevando un quadrato di micelio di circa 5 mm da una piastra madre e trasferendolo sulla nuova piastra con il micelio rivolto verso il terreno. Su ogni piastra, virtualmente divisa a metà, vengono depositati due inoculi dello stesso fungo. Si passa poi all'incubazione dei funghi nelle condizioni ottimali di crescita riportate in Tabella 20.

Tabella 20. Condizioni di crescita di funghi fitopatogeni e dermatofiti

Funghi fitopatogeni			
Ceppo	Condizioni	T (°C)	t (giorni)
<i>Botrytis cinerea</i>	Buio	28	4
<i>Neonectria galligena</i>	Cicli di luce/buio	24	4
<i>Alternaria sp.</i>	Cicli di luce/buio	24	4
<i>Fusarium moniliforme</i>	Cicli di luce/buio	24	4
<i>Fusarium oxysporum f. sp. radicum lycopersici</i>	Cicli di luce/buio	24	4
<i>Phoma betae</i>	Cicli di luce/buio	24	5
<i>Penicillium crustosum</i>	Cicli di luce/buio	24	5
<i>Pythium ultimum</i>	Buio	24	4
<i>Sclerotinia minor</i>	Buio	24	7
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Buio	24	2
Funghi dermatofiti			
<i>Thricophyton mentagrophytes</i>	Luce	28	7
<i>Nannizia gypsea</i>	Luce	28	7
<i>Trichophyton tonsurans</i>	Luce	28	7
<i>Microsporum gypseum</i>	Luce	28	7

A crescita avvenuta si misurano i diametri (mm) di crescita dei funghi in ogni piastra e tale valore viene rapportato al diametro (mm) massimo di crescita del controllo negativo.

In Figura 2 vengono riportate le piastre petri di *Botrytis cinerea* cresciuto in presenza di **2a** (a destra) ed il controllo negativo (a sinistra) a scopo esemplificativo.



Figura 2. Test di inibizione di crescita diametrale su *Botrytis cinerea*

I valori di crescita diametrale (mm) dei funghi fitopatogeni in presenza di estratti contenenti i 9,10-secoesteroidi **2-5** sono riportati in Tabella 21 e quelli dei funghi dermatofiti in Tabella 22.

Tabella 21. Attività dei 9,10-secoesteroidi **2-5** su funghi fitopatogeni

Ceppo	DMSO	2a	2b	3c	4d + 5d
<i>Botrytis cinerea</i>	38	26.5	13.5	14.5	8.5
<i>Neonectria galligena</i>	18	11.5	9	11	8
<i>Alternaria sp.</i>	3	3	3	3	3
<i>Fusarium moniliforme</i>	19	12.5	10.5	11	1
<i>Fusarium oxysporum f. sp. radices lycopersici</i>	17.5	10.5	10.5	10.5	6
<i>Phoma betae</i>	13.5	8.5	4.5	1.5	4
<i>Penicillium crustosum</i>	12.5	11.5	11	11	10
<i>Pythium ultimum</i>	10	0.5	4.5	1.25	0
<i>Sclerotinia minor</i>	28.5	0	3	2	0.75
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	52	11	11	6	1

Tabella 22. Attività dei 9,10-secoesteroidi **2-5** su funghi dermatofiti.

Ceppo	DMSO	2a	2b	3c	4d + 5d
<i>Thricophyton mentagrophytes</i>	11	8	10	9	10
<i>Nannizia gypsea</i>	14.5	8	14.5	12.5	13
<i>Trichophyton tonsurans</i>	5	5	3.5	3	0.5
<i>Microsporium gypseum</i>	13	9.5	7	12.5	11.5

Questi valori sono poi stati convertiti in percentuali di inibizione di crescita (riportati nelle Tabelle 10 e 11) comparandoli con il controllo negativo, DMSO, il cui valore di crescita viene considerato il 100% .

dove

C1 = Crescita fungo in presenza della sostanza testata in mm

C2 = Crescita fungo in presenza di DMSO in mm

Con lo stesso metodo sono stati testati gli acidi biliari **1a-d**. Le misurazioni dei diametri raggiunti dai diversi ceppi in presenza dei vari acidi biliari vengono riportate in Tabella 23 (per i funghi fitopatogeni) e in Tabella 24 (per i funghi dermatofiti).

Tabella 23. Attività degli acidi biliari **1a-d** su funghi fitopatogeni

Ceppo	DMSO	1a	1b	1c	1d
<i>Botrytis cinerea</i>	45	3.5	9	10	20
<i>Neonectria galligena</i>	13.5	6.5	7	8	11
<i>Alternaria sp.</i>	3	1	1	0.5	1
<i>Fusarium moniliforme</i>	23	16	4.5	14	14
<i>Fusarium oxysporum f. sp. radicis lycopersici</i>	27	21	8	14	16
<i>Phoma betae</i>	11.5	4.5	1	0.5	1.5
<i>Penicillium crustosum</i>	12.5	9.5	8.5	11.5	12.5
<i>Pythium ultimum</i>	6.5	5	0	0.5	0
<i>Sclerotinia minor</i>	13.5	0.25	2	6	6.5
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	35.5	2.5	3.5	3.5	7.5

Tabella 24. Attività degli acidi biliari **1a-d** su funghi dermatofiti.

Ceppo	DMSO	1a	1b	1c	1d
<i>Thricophyton mentagrophytes</i>	4.5	6.5	3.5	7.5	3.5
<i>Nannizia gypsea</i>	2	5	1	3	3.5
<i>Trichophyton tonsurans</i>	2	2.5	1.5	2.5	1.5
<i>Microsporum gypseum</i>	11	12.5	6.5	12	8

CAPITOLO 6

Attività antiossidante

Nel capitolo precedente sono stati riportati i risultati di attività antibatterica e antifungina dei 9,10-secosteroidi ottenuti dalle biotrasformazioni degli acidi biliari **1a-d** e sono stati confrontati con l'attività degli stessi. In questo capitolo sono stati effettuati test di valutazione dell'attività antiossidante di queste molecole anche in questo confrontando i dati dei nuovi 9,10-secosteroidi con quelli ottenuti degli acidi biliari di partenza.

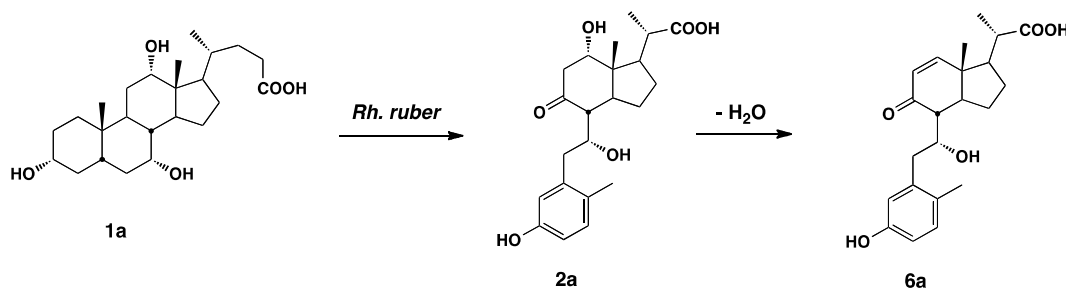
Questi test sono stati fatti in collaborazione col gruppo di ricerca del Prof. Vincenzo Brandolini, presso il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Ferrara.

I test utilizzati per lo studio dell'attività antiossidante sono stati il test DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazile) preliminare al successivo test Photochem che permette di valutare la capacità antiossidante delle molecole testate nei confronti del radicale superossido (O_2^-).

Gli esperimenti sono stati effettuati in parallelo comparando l'attività dei nuovi 9,10-secosteroidi con l'attività degli acidi biliari di partenza.

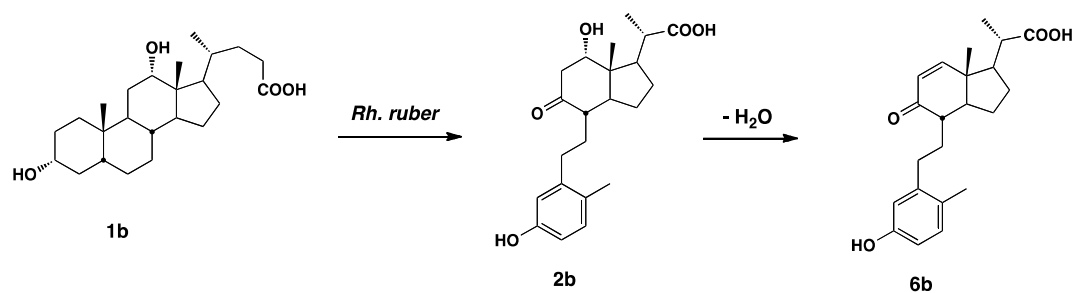
Come nel caso dell'attività antibatterica ed antifungina i prodotti sottoposti a test sono i seguenti:

- L'acido 3,7 α ,12 α -triidrossi-9-osso-9,10-seco-23,24-dinorcolan-1,3,5(10)-trien-22-oico **2a** che deriva dalla biotrasformazione dell'acido colico **1a** con *Rhodococcus ruber* e l'acido 3,7 α -diidrossi-9-cheto-9,10-seco-23,24-dinorcolan-1,3,5(10),11-tetraene-22-oico **6a** si forma durante la purificazione di **2a** per perdita di H₂O (Schema 1);



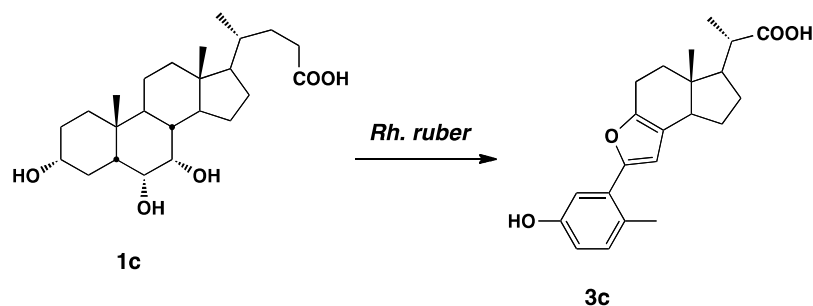
Schema 1

- L'acido 3,12 α -diidrossi-9-osso-9,10-seco-23,24-dinorcolan-1,3,5(10)-trien-22-oico **2b** che deriva dalla biotrasformazione dell'acido colico **1b** con *Rhodococcus ruber* e l'acido 3-idrossi-9-cheto-9,10-seco-23,24-dinorcolan-1,3,5(10)-tetraene-22-oico **6b** derivante dalla purificazione di **2b** per perdita di H₂O (Schema 2);



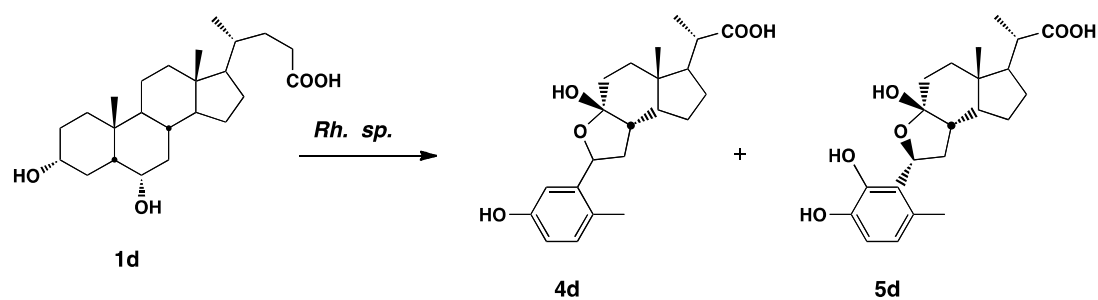
Schema 2

- L'acido 3-idrossi-6,9-epossi-9,10-seco-23,24-dinorcolan-1,3,5(10),6,8-pentaen-22-oico **3c** che deriva dalla biotrasformazione dell'acido iocolico **1c** con *Rhodococcus ruber* (Schema 3);



Schema 3

- L'acido 3,9 β -diidrossi-6 ξ ,9 α -epossi-9,10-seco-23,24-dinorcolan-1,3,5(10)-trien-22-oico **4d** e l'acido 3,4,9 β -triidrossi-6 β ,9 α -epoxy-9,10-seco-23,24-dinorcolan-1,3,5(10)-trien-22-oico **5d** che derivano dalla biotrasformazione dell'acido iodesossicolico **1d** con *Rhodococcus sp.* (Schema 4).



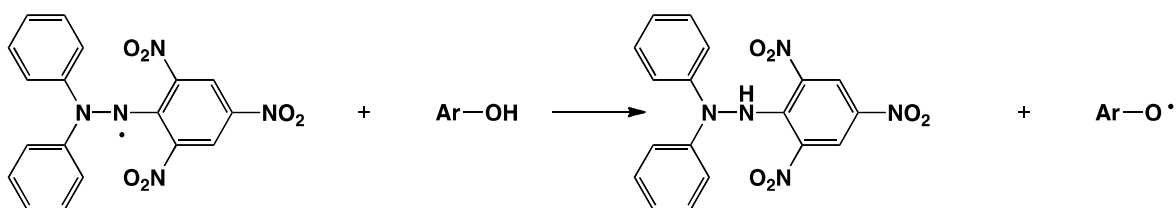
Schema 4

Innanzitutto sono state effettuate le biotrasformazioni degli acidi biliari (Schema 1-4) per ottenere i 9,10-secosteroidi da testare secondo le metodiche riportate nei Capitoli 3 e 4. Tali reazioni sono state effettuate in doppio in modo da poter confrontare il risultato ottenuto dal grezzo di reazione con quello dei prodotti **2-6** purificati (Capitoli 3 e 4).

Al fine di verificare quale diluizione fosse la più opportuna per l'analisi con Photochem è stato effettuato un test DPPH preliminare.

Metodo DPPH

Il saggio DPPH prevede l'utilizzo del radicale organico 2,2-difenil-1-picrilidrazile (DPPH[•]). Questa metodica consente di valutare l'attività riducente di molecole antiossidanti nei confronti del radicale DPPH[•], caratterizzato da un'intensa colorazione viola con un massimo di assorbimento a 515 nm. In presenza di molecole antiossidanti in grado di donare un atomo di idrogeno, il radicale DPPH[•] si trasforma nell'idrazina corrispondente, debolmente colorata di giallo [87] (Schema 1).



Schema 5. Reazione del DPPH[•] con un fenolo generico.

La reazione viene monitorata per via spettrofotometrica e si segue attraverso una diminuzione di assorbanza proporzionale alla quantità di antiossidanti presenti nel campione.

La percentuale di inibizione dell'assorbanza misurata con lo spettrofotometro entro un certo periodo di tempo (15 minuti), è calcolata come funzione della concentrazione del campione nei confronti di uno standard di riferimento. Lo standard utilizzato è il Trolox (analogo sintetico della vitamina E) ed i risultati vengono espressi in unità equivalenti di Trolox.

Sono stati quindi preparati campioni degli acidi biliari (acido colico **1a**, acido desossicolico **1b**, acido iocolico **1c** e acido iodesossicolico **1d**) e degli estratti delle biotrasformazioni

contenenti i 9,10-secosteroidi **2-5** (ottenuti secondo le metodiche riportate nei capitoli 3 e 4) sciogliendo i campioni in metanolo (concentrazione 50 mg/ml). I campioni vengono poi diluiti e successivamente estratti. I risultati di questo test preliminare sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1. Risultati del test DPPH

Campioni	Diluizione	$\mu\text{Mol/g}$	Media	DS
1a	1	1.30	1.33	0.04
1a	1	1.36		
1b	1	0.22	0.28	0.08
1b	1	0.34		
1c	1	0.34	0.52	0.25
1c	1	0.70		
1d	1	1.08	1.10	0.03
1d	1	1.12		
Estratto 2a	10	81.20	81.80	0.85
Estratto 2a	10	82.40		
Estratto 2b	10	47.60	47.20	0.57
Estratto 2b	10	46.80		
Estratto 3c	10	77.80	77.00	1.13
Estratto 3c	10	76.20		
Estratto 4d + 5d	10	91.00	91.30	0.42
Estratto 4d + 5d	10	91.60		

Già dal test DPPH si può notare che tutti gli estratti di biotrasformazione **2-5**, contenenti i 9,10-secosteroidi come prodotti maggioritari, presentano una capacità antiossidante nettamente superiore a quella posseduta dagli acidi biliari di partenza (**1a-d**).

L'estratto **2a** mostra una capacità antiossidante circa 60 volte superiore a quella dell'acido colico **1a**, infatti i valori di capacità antiossidante sono rispettivamente di 1.33 e 81.20 μMoli di Trolox equivalente per grammo di prodotto. L'estratto **2b** presenta una capacità antiossidante di 47.20 μMoli di Trolox equivalente per grammo di prodotto, valore 168 volte superiore al prodotto di partenza **1b** (0.28 $\mu\text{Moli/g}$). Per quanto riguarda l'estratto contenente il 9,10-secosteroide **3c** l'attività antiossidante (77.00 μMoli di Trolox equivalente per grammo di prodotto) risulta 148 volte maggiore di quella dell'acido iocolico **1c** (0.52 $\mu\text{Moli/g}$). Per ultimo, l'estratto contenente i secosteroidi **4d** e **5d** mostra una capacità antiossidante di 91.30 μMoli di Trolox equivalente per grammo di prodotto,

valore 83 volte superiore a quella dell'acido iodesossicolico **1d** (1.10 μ Moli di Trolox equivalente per grammo di prodotto).

Questo test, oltre a fornire risultati sulla capacità antiossidante delle molecole testate nei confronti del radicale sintetico DPPH risulta utile per avere un'idea indicativa delle diluizioni da effettuare nel test di foto-chemiluminescenza (Photochem).

Photochem[®]

Il metodo della foto-chemiluminescenza (PCL) consente la quantificazione sia dell'attività antiossidante di sostanze pure idrofile e/o lipofile, sia la misurazione della capacità antiossidante in fase lipidica (ACL, Antioxidant Capacity Lipid soluble) e in fase acquosa (ACW, Antioxidant Capacity Water soluble), di matrici complesse di origine sintetica, vegetale, animale e umana. Il metodo PCL è basato su un'accelerazione delle reazioni ossidative *in vitro* di circa 1000 volte rispetto alle condizioni normali, grazie alla presenza di un opportuno fotosensibilizzatore. La metodologia sfrutta le caratteristiche di Photochem[®], uno strumento recentemente commercializzato da Analytic Jena AG e basato sull'autossidazione fotoindotta del luminol, accompagnata da un'intensa chemiluminescenza. Per esposizione di una sostanza fotosensibile (presente nel kit di lavoro) ad una radiazione UV, vengono generati dei radicali liberi, i quali reagendo con la sostanza chemiluminescente (luminol), emettono fotoni misurati da un fotomoltiplicatore che quantifica la produzione di radicali liberi.

La presenza di antiossidanti inibisce l'autossidazione del luminol, dovuta all'interazione con il radicale O_2^- generato per via fotochimica. In presenza di sostanze che reagiscono come trappole per radicali, l'intensità della fotochemiluminescenza viene attenuata in funzione della loro concentrazione. In questo modo le proprietà antiradicaliche della sostanza analizzata possono essere realmente quantificate [88]. Questa metodica prevede la costruzione di una curva di taratura con un antiossidante di riferimento. I risultati sono espressi come unità equivalenti di acido ascorbico per sostanze idrosolubili o unità equivalenti di Trolox per sostanze liposolubili. Ogni singola misura richiede da 1 a 3 minuti.

Il test di fotochemiluminescenza è stato eseguito secondo la metodica descritta da Popov e Lewin [89]. La composizione della miscela di reazione per il metodo PCL-ACL è riportata

in Tabella 1 dove X rappresenta le diverse quantità di standard per la retta di taratura ed Y la quantità di campione da analizzare.

Tabella 2. Composizione della miscela di reazione in μl .

Reagente	R1	R2	R3	R4	Campione
Bianco	2300	200	25	0	0
Calibrazione	2300-X	200	25	X	0
Misure	2300-Y	200	25	0	Y

Una volta selezionate le diluizioni opportune si è passati con le analisi dell'attività antiossidante dei 9,10-secoosteroidi **2-5** e degli acidi biliari **1a-d**. Tali test vengono effettuati in modalità ACL utilizzando come solvente il metanolo.

Il kit dello strumento contiene i seguenti componenti:

- R1 = metanolo ultrafiltrato;
- R2 = stabilizzante necessario per mantenere le condizioni fisse;
- R3 = luminol (si lega ai radicali O_2^- emettendo luminescenza);
- R4 = trolox (analogo sintetico della vitamina E).

Come primo step occorre effettuare la calibrazione dello strumento creando una retta di taratura utilizzando R1, R2, R3 ed una sostanza antiossidante di riferimento (R4, trolox) a diverse concentrazioni (0.5, 1 e 2 nM) utilizzando i volumi riportati in Tabella 2. Successivamente si passa all'analisi dei campioni (opportunamente diluiti sulla base del test DPPH) utilizzando le medesime quantità dei vari reagenti e 10 μl di campione (50 mg/ml MeOH).

Il tempo di analisi è di 180 secondi e come output lo strumento genera una curva di inibizione dell'effetto dei radicali liberi. Per garantire l'affidabilità del risultato è necessario che le curve dei campioni siano comprese tra quelle di calibrazione, nel caso contrario occorre variare la diluizione.

In Tabella 3 vengono riportati i risultati del test PCL-ACL condotto sugli acidi biliari, sugli estratti delle biotrasformazioni e sui prodotti purificati.

Tabella 3. Risultati del test di fotochemiluminescenza

Campioni	diluizione	µmol/g	Media	SD
1a	1	0.14	0.25	0.16
1a	1	0.36		
1b	1	0.88	0.86	0.03
1b	1	0.84		
1c	1	0.32	0.31	0.01
1c	1	0.30		
1d	1	0.82	0.82	0.00
1d	1	0.82		
Estratto 2a	20	77.60	80.60	4.24
Estratto 2a	20	83.60		
Estratto 2b	30	126.60	128.40	2.55
Estratto 2b	30	130.20		
Estratto 3c	30	117.60	121.20	5.09
Estratto 3c	30	124.80		
Estratto 4d + 5d	30	127.80	126.90	1.27
Estratto 4d + 5d	30	126.00		
2a	50	185.00	184.50	0.71
2a	50	184.00		
6a	100	272.00	286.00	19.80
6a	100	300.00		
2b	100	328.00	330.00	2.83
2b	100	332.00		
6b	200	240.00	254.00	19.80
6b	200	268.00		
3c	200	384.00	366.00	25.46
3c	200	348.00		
4d	50	140.00	139.50	0.71
4d	50	139.00		
5d	500	600.00	605.00	7.07
5d	500	610.00		

Anche i risultati del test di foto-chemiluminescenza mostrano come gli estratti di biotrasformazioni (estratti **2-5**) ed i relativi prodotti purificati (**2-5**) presentino una capacità antiossidante nettamente superiore a quella degli acidi biliari **1a-d**.

In particolare l'estratto **2a** presenta una capacità antiossidante di 80.6 µMoli di Trolox equivalente per grammo di prodotto, circa 300 volte superiore al prodotto di partenza **1a** (0.25 µmol/g), mentre testando il prodotto purificato **2a** (184.50 µMoli di Trolox equivalente per grammo di prodotto) l'attività aumenta di 738 volte. Il prodotto **6a**,

derivante dalla purificazione di **2a**, presenta una capacità antiossidante di 286 μMoli di Trolox equivalente per grammo di prodotto, 1144 volte superiore a **1a**.

Per quanto riguarda l'estratto della biotrasformazione **2b** l'attività antiossidante (128.40 μMoli di Trolox equivalente per grammo di prodotto) risulta 148 volte superiore a quella dell'acido desossicolico **1b** (0.86 $\mu\text{Moli/g}$). Nel caso del secosteroide purificato **2b** (330 $\mu\text{Moli/g}$) l'attività aumenta di 383 volte mentre con **6b** (derivante dalla purificazione di **2b**) l'attività risulta 295 volte superiore (254.00 $\mu\text{Moli/g}$).

L'acido iocolico **1c** presenta un'attività antiossidante di 0.31 μMoli di Trolox equivalente per grammo di prodotto, l'estratto derivante da biotrasformazione **3c** genera una capacità antiossidante di 121.20 $\mu\text{Moli/g}$ (390 volte superiore). Se si considera il secosteroide purificato **3c** si ottiene un valore di 366 $\mu\text{Moli/g}$ (1180 volte superiore).

Effettuando il test PCL sull'estratto derivante dalla biotrasformazione dell'acido iodesossicolico (estratto **4d** e **5d**) si ottiene un valore di 126.9 μMoli di Trolox equivalente per grammo di prodotto mentre il prodotto di partenza **1d** ha una capacità antiossidante di 0.82 $\mu\text{Moli/g}$. Ciò significa che l'estratto presenta una capacità antiossidante 154 volte superiore al prodotto di partenza. Se si considerano i prodotti purificati **4d** e **5d** si ottengono valori antiossidanti rispettivamente pari a 139.5 e 605 μMoli di Trolox equivalente per grammo di prodotto, per cui il prodotto purificato **4d** presenta una capacità antiossidante 170 volte superiore a **1d** (0.82 $\mu\text{Moli/g}$), mentre nel caso del prodotto **5d** l'attività aumenta di 737 volte.

È stata effettuata la comparazione dei risultati ottenuti dai prodotti purificati utilizzando le due tecniche (PCL-ACL e DPPH) al fine di verificare quale metodologia risultasse più sensibile (Figura 1).

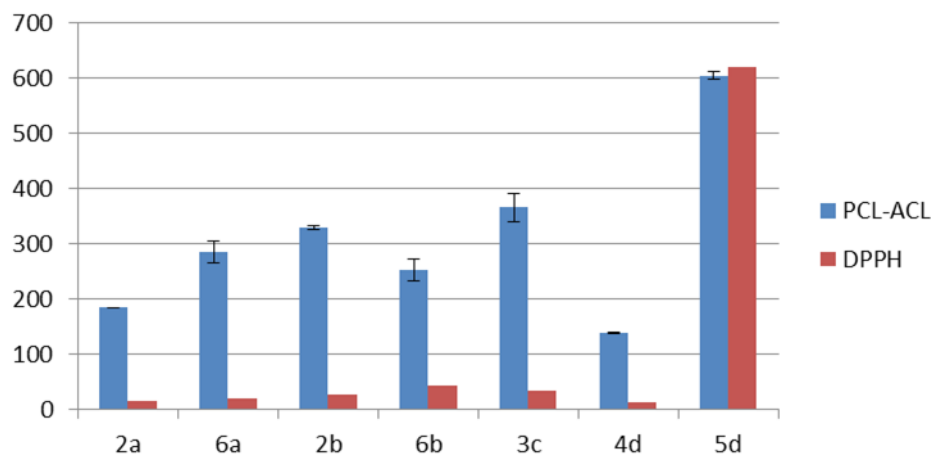


Figura 1. Comparazione dei test PCL-ACL e DPPH

Con quasi tutti i prodotti (**2a**, **6a**, **2b**, **6b**, **3c**, **4d** e **5d**) la metodologia PCL-ACL è risultata essere molto più sensibile su questo tipo di molecole rispetto al DPPH. In un unico caso, **5d**, le due tecniche hanno fornito risultati molto simili, probabilmente a causa della maggior affinità di questa molecola col radicale sintetico DPPH.

L'attività antiossidante dei nuovi 9,10-secosteroidi (**2-5**) è stata poi messa in relazione con quella posseduta dall'acido ascorbico (vitamina C) e dalla quercetina, noti antiossidanti. Per quanto riguarda la comparazione col Trolox è stato fatto un confronto diretto (in quanto standard di riferimento della metodologia utilizzata) mentre per l'acido ascorbico e la quercetina è stato effettuato un confronto indiretto valutando la loro attività rispetto al Trolox e poi rapportando i risultati ai campioni di 9,10-secosteroidi. In Figura 2 sono riportati i risultati di tale comparazione.

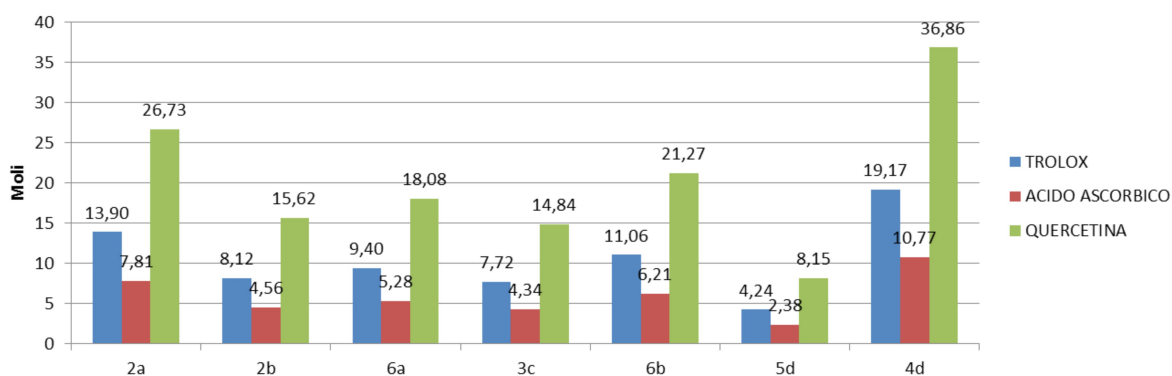


Figura 2. Comparazione dell'attività antiossidante dei 9,10-secosteroidi con molecole antiossidanti di riferimento

I dati del grafico riportano il numero di moli necessarie per ottenere lo stesso effetto antiossidante di 1 mole rispettivamente di trolox, acido ascorbico e quercetina.

Il miglior risultato è stato ottenuto col prodotto **5d** che da lo stesso effetto dell'acido ascorbico con un rapporto molare di 2.38 moli di **5d** ad una 1 mole d di vitamina C. Per quanto riguarda gli altri risultati, la quantità di prodotti necessaria per ottenere lo stesso effetto antiossidante dei composti di riferimento è troppo elevata per poterli considerare buoni antiossidanti.

Parte sperimentale

DPPH

Sono stati inizialmente preparati i campioni relativi agli acidi biliari (acido colico **1a**, acido desossicolico **1b**, acido iocolico **1c** e acido iodesossicolico **1d**) e agli estratti delle biotrasformazioni contenenti i 9,10-secosteroidi **2-5** (secondo le metodiche riportate nei capitoli 3 e 4) sciogliendo i campioni in metanolo (concentrazione 50 mg/ml). Si è poi passati alle diluizioni degli stessi (Tabella 4) e alla preparazione dei reagenti per il test DPPH.

- Radicale DPPH': si prepara una soluzione 0.06 mM di DPPH in metanolo. Il radicale preparato è stabile per 12 ore a temperatura ambiente e protetto dalla luce.
- Standard di riferimento Trolox: si prepara una soluzione madre 2 mM di Trolox in metanolo. Dalla soluzione madre si preparano diluizioni da 0.05 a 0.5 mM in metanolo, per effettuare la retta di taratura che relaziona la percentuale di inibizione con le concentrazioni di Trolox.

Un'aliquota pari a 1.45 mL di radicale DPPH' è posta in cuvette di quarzo di 10 mm di cammino ottico e si effettua la lettura a 515 nm, ottenendo così il valore della assorbanza al tempo zero. Si aggiungono 50 µL delle differenti concentrazioni di standard e si misura l'assorbanza dopo 15 minuti. Si ottiene così il valore di assorbanza utilizzata per calcolare la % di inibizione secondo la formula riportata di seguito:

$$\% \text{ inibizione DPPH}' =$$

dove

A₀ = l'assorbanza prima dell'aggiunta di standard o campione al tempo 0

A₁₅ = l'assorbanza dopo 15 minuti dall'aggiunta di standard o campione.

Allo stesso modo si procede aggiungendo alla soluzione di DPPH 50µL di campione sciolto in metanolo (50 mg/ml) opportunamente diluito. Ottenuta la percentuale di inibizione si risale alla capacità antiossidante dei campioni nei confronti del radicale DPPH', espressa in mM di Trolox equivalenti. Nella Tabella 4 vengono riportati i dati sperimentali di ogni campione analizzato ed i valori di capacità antiossidante di tutti i

campioni analizzati. Le misurazioni sono state effettuate in doppio al fine di ridurre l'errore sperimentale.

Tabella 4. Dati sperimentali del test DPPH

Campioni	g	MeOH (ml)	diluizione	mMol/L	μMol/g	Media	DS
1a	0.05	1	1	0.065	1.30	1.33	0.04
1a	0.05	1	1	0.068	1.36		
1b	0.05	1	1	0.011	0.22	0.28	0.08
1b	0.05	1	1	0.017	0.34		
1c	0,05	1	1	0.017	0.34	0.52	0.25
1c	0.05	1	1	0.035	0.70		
1d	0.05	1	1	0.054	1.08	1.10	0.03
1d	0.05	1	1	0.056	1.12		
Estratto 2a	0.05	1	10	0.406	81.20	81.80	0.85
Estratto 2a	0.05	1	10	0.412	82.40		
Estratto 2b	0.05	1	10	0.238	47.60	47.20	0.57
Estratto 2b	0.05	1	10	0.234	46.80		
Estratto 3c	0.05	1	10	0.389	77.80	77.00	1.13
Estratto 3c	0.05	1	10	0.381	76.20		
Estratto 4d + 5d	0.05	1	10	0.455	91.00	91.30	0.42
Estratto 4d + 5d	0.05	1	10	0.458	91.60		
2a	0.05	1	5	0.165	16.5		
2b	0.05	1	5	0.269	26.9		
6a	0.05	1	5	0.212	21.2		
3c	0,05	1	5	0.335	33.5		
6b	0.05	1	5	0.433	43.3		
5d	0.05	1	50	0.62	620		
4d	0.05	1	5	0.141	14.1		

Photochem

I reagenti R1, R2, R3 e R4 sono forniti in originale dalla ditta Analytic Jena (Germania).

Il reagente R3 (Luminol Work Solution) è preparato addizionando 750 μL di reagente 2 al reagente 3. Tale soluzione è sufficiente per 40 misurazioni.

Il reagente R4 (Trolox Work Solution) è preparato aggiungendo 500 μL di reagente 1 al reagente 4. La soluzione è poi diluita 1:100. 10 μL di 4-WS contengono 1 nmole dello standard di calibrazione (Trolox).

Viene innanzitutto effettuata la calibrazione dello strumento utilizzando R1, R2, R3 ed una sostanza antiossidante di riferimento (R4, trolox) a diverse concentrazioni (0.5, 1 e 2 nM) utilizzando i volumi riportati in Tabella 1.

Sono stati poi preparati i campioni da analizzare: gli acidi biliari (acido colico **1a**, acido desossicolico **1b**, acido iocolico **1c** e acido iodesossicolico **1d**), gli estratti delle biotrasformazioni contenenti i 9,10-secosteroidi **2-5** (secondo le metodiche riportate nei capitoli 3 e 4) ed infine i 9,10-secosteroidi purificati (**2-6**) sciogliendo i campioni in metanolo (concentrazione 50 mg/ml). Successivamente si passa alla diluizione dei campioni (Tabella 5) sulla base dei risultati forniti dal test DPPH e all'analisi dei campioni (opportunamente diluiti sulla base del test DPPH) utilizzando le medesime quantità dei vari reagenti e 10 μl di campione (50 mg/ml MeOH).

La durata della corsa di ogni campione è di 180 secondi e la capacità antiossidante viene misurata dall'integrale al di sotto della curva ed è espressa in nmol di Trolox equivalenti.

Nella tabella 5 vengono riportate le condizioni sperimentali di ogni campione analizzato ed i valori di capacità antiossidante di tutti i campioni analizzati. Per garantire una maggior affidabilità dei risultati ogni campione è stato analizzato in doppio. Viene poi calcolata la media delle due misurazioni.

Tabella 5. Dati sperimentali del test di fotochemiluminescenza

Campioni	g	ml	Dil.	µL	nmol lette	nmol/g	µmol/g	Media	SD
1a	0.05	1	1	10	0.07	140	0.14	0.25	0.16
1a	0.05	1	1	10	0.18	360	0.36		
1b	0.05	1	1	10	0.44	880	0.88	0.86	0.03
1b	0.05	1	1	10	0.42	840	0.84		
1c	0.05	1	1	10	0.16	320	0.32	0.31	0.01
1c	0.05	1	1	10	0.15	300	0.30		
1d	0.05	1	1	10	0.41	820	0.82	0.82	0.00
1d	0.05	1	1	10	0.41	820	0.82		
Estr. 2a	0.05	1	20	10	1.94	77600	77.60	80.60	4.24
Estr. 2a	0.05	1	20	10	2.09	83600	83.60		
Estr. 2b	0.05	1	30	10	2.11	126600	126.60	128.40	2.55
Estr. 2b	0.05	1	30	10	2.17	130200	130.20		
Estr. 3c	0.05	1	30	10	1.96	117600	117.60	121.20	5.09
Estr. 3c	0.05	1	30	10	2.08	124800	124.80		
Estr. 4d + 5d	0.05	1	30	10	2.13	127800	127.80	126.90	1.27
Estr. 4d + 5d	0.05	1	30	10	2.1	126000	126.00		
2a	0.05	1	50	10	1.85	185000	185.00	184.50	0.71
2a	0.05	1	50	10	1.84	184000	184.00		
2b	0.05	1	100	10	1.64	328000	328.00	330.00	2.83
2b	0.05	1	100	10	1.66	332000	332.00		
6a	0.05	1	100	10	1.36	272000	272.00	286.00	19.80
6a	0.05	1	100	10	1.5	300000	300.00		
3c	0.05	1	200	10	0.96	384000	384.00	366.00	25.46
3c	0.05	1	200	10	0.87	348000	348.00		
6b	0.05	1	200	10	0.6	240000	240.00	254.00	19.80
6b	0.05	1	200	10	0.67	268000	268.00		
5d	0.05	1	500	10	0.6	600000	600.00	605.00	7.07
5d	0.05	1	500	10	0.61	610000	610.00		
4d	0.05	1	50	10	1.4	140000	140.00	139.50	0.71
4d	0.05	1	50	10	1.39	139000	139.00		

La valutazione dell'attività antiossidante mediante i test DPPH e Photochem ha evidenziato in entrambe le metodologie (che valutano l'attività antiossidante nei confronti di due diversi radicali, DPPH e anione superossido rispettivamente) che gli estratti di biotrasformazione e i 9,10-secosteroidi purificati presentano un'attività antiossidante nettamente superiore ai prodotti di partenza della biotrasformazioni (acidi biliari **1 a-d**).

CAPITOLO 7

Conclusioni

Il progetto di questo lavoro di tesi è stato finanziato dalla ditta ICE srl di Reggio Emilia, azienda leader nella produzione di acido ursodesossicolico (UDCA). Questo principio attivo, che viene utilizzato nel trattamento della calcolosi biliare, viene sintetizzato a partire da acido colico e acido chenodesossicolico presenti, rispettivamente, nella bile bovina e suina.

Lo screening biotrasformativo effettuato su diversi ceppi appartenenti al genere *Rhodococcus* ha in parte disatteso lo scopo primario del progetto (C-7 idrossilazione e C-6 ossidazione) in quanto non sono stati trovati microrganismi in grado di effettuare reazione di idrossilazione in posizione C-7. Per quanto riguarda l'ossidazione in C-6 un unico ceppo, *Rhodococcus globerulus*, testato sull'acido iodesossicolico è risultato in grado di effettuare tale reazione generando il 3,6-dicheto derivato (34%).

È stato inoltre isolato un prodotto non ancora noto in letteratura corrispondente all'acido 3,6-dicheto-colan-1-ene-24-oico (40%) ancora in fase di caratterizzazione.

Per la prima volta sono stati ottenuti da biotrasformazione di acido iodesossicolico con *Rhodococcus spp.* due nuovi 9,10-secosteroidi (acido 3,9 β -diidrossi-6 ξ ,9 α -epossi-9,10-seco-23,24-dinorcolan-1,3,5(10)-triene-22-oico e acido 3,4,9 β -triidrossi-6 β ,9 α -epossi-9,10-seco-23,24-dinorcolan-1,3,5(10)-triene-22-oico) in forma emiacetalica con parziale degradazione della catena in C₁₇. Tali risultati sono stati oggetto di pubblicazione [S. Costa, P. P. Giovannini, G. Fantin, A. Medici, P. Pedrini, *Helvetica Chimica Acta*, 96, 1062-1071 (2013).].

Ampliando la ricerca su altri acidi biliari (acido colico e acido desossicolico) e focalizzando l'attenzione sul ceppo *Rhodococcus ruber* sono stati isolati altri nuovi 9,10-secosteroidi (acido 3,7 α -diidrossi-9-cheto-9,10-seco-23,24-dinorcolan-1,3,5(10),11-tetraene-22-oico e acido 3,12 α -diidrossi-9-cheto-9,10-seco-23,24-dinorcolan-1,3,5(10)-triene-22-oico, rispettivamente) anche in questo caso con una parziale degradazione della catena in C₁₇ oltre ad avere il gruppo ossidrile in C₁₂ in posizione α . L'inversione di configurazione di tale gruppo funzionale sembra non essere necessaria per la successiva rottura dell'anello B come proposto negli processi di degradazione degli acidi biliari. Anche nella biotrasformazione di acido iocolico con *Rhodococcus ruber* si ha la formazione di un nuovo 9,10-secosteroido che riarrangia in forma emiacetalica e dopo la perdita di due molecole d'acqua porta alla formazione del derivato furanico (acido 3-idrossi-6,9-epossi-9,10-seco-23,24-dinorcolan-1,3,5(10),6,8-pentaene-22-oico). Anche

questi risultati sono stati oggetto di pubblicazione [S. Costa, P. P. Giovannini, G. Fantin, A. Medici, P. Pedrini, *Helvetica Chimica Acta*, 96, 2124-2133 (2013)].

Dal momento che molecole simili presentano attività biologica, sono stati condotti studi mirati alla valutazione dell'attività antimicrobica e dell'attività antiossidante dei 9,10-secosteroidi isolati in questo lavoro.

La valutazione dell'attività antibatterica su batteri fitopatogeni e su batteri patogeni per l'uomo dei nuovi 9,10-secosteroidi non ha fornito risultati interessanti. Risultati negativi sono stati ottenuti anche su *Candida albicans*.

Per quanto riguarda l'attività antifungina, in generale i 9,10-secosteroidi sono stati in grado di inibire la crescita di funghi fitopatogeni. Tali risultati, comparati con quelli ottenuti con gli acidi biliari di partenza, hanno dimostrato che su *Pythium ultimum* l'acido 3,7 α ,12 α -triidrossi-9-osso-9,10-seco-23,24-dinorcolan-1,3,5(10)-trien-22-oico, ottenuto dalla biotrasformazione dell'acido colico, inibisce la crescita di questo patogeno del 95% mentre il prodotto di partenza presenta attività antifungina molto bassa (23%).

Con *Sclerotinia minor* il prodotto derivante da biotrasformazione dell'acido iocolico (acido 3-idrossi-6,9-epossi-9,10-seco-23,24-dinorcolan-1,3,5(10),6,8-pentaene-22-oico) inibisce quasi totalmente la crescita mentre con l'acido iocolico si ottiene un'inibizione del 56%. Anche nel caso di *Fusarium moniliforme* alcuni 9,10-secosteroidi presentano attività antimicotica superiore a quella dell'acido biliare corrispondente infatti la miscela di 9,10-secosteroidi ottenuti dalla biotrasformazione dell'acido iodesossicolico inibisce la crescita di tale patogeno del 95% mentre l'acido biliare di partenza presenta una resa di inibizione del 39%.

Gli stessi test, effettuati su funghi dermatofiti, hanno evidenziato che la crescita di *Trichophyton tonsurans* risulta essere inibita dalla miscela di 9,10-secosteroidi ottenuti dalla biotrasformazione dell'acido iodesossicolico con valori nettamente superiori a quelli forniti dall'acido biliare di partenza.

La valutazione dell'attività antiossidante, effettuata mediante le metodiche DPPH e Photochem, ha evidenziato che tutti i nuovi 9,10-secosteroidi prodotti da biotrasformazione hanno una capacità antiossidante di gran lunga superiore a quella posseduta dagli acidi biliari. La comparazione di questi risultati con quelli forniti da molecole antiossidanti di riferimento ha dimostrato che la quantità di 9,10-secosteroidi

necessaria per ottenere lo stesso effetto antiossidante dei composti di riferimento è troppo elevata per poterli considerare dei buoni antiossidanti.

CAPITOLO 8

Bibliografia

1. A. F. Hofman, in *Enterohepatic circulation of bile acids. Handbook of Physiology, Section of Gastrointestinal System*, S.G. Schultz, G. J. Forte, Eds: The American Physiological Society (1988).
2. L. Gallone, in *Patologia Chirurgica*, Ambrosiana Editore, Milano, Volume 2, pp. 1483.
3. J. L. Thistle *Seminars in liver disease*. **3**, 146-156 (1983).
4. H. Fromm, J. W. Roat, V. Gonzalez, R. P. Sarva, S. Farivar, *Gastroenterology*, **85**, 1257-1264 (1983).
5. A. Stiehl, *InPharma*, **167**, 10 (1978).
6. www.faostat.fao.org.
7. L. F. Fieser, S. Rajagopalan, *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 5530-5536 (1950).
8. A. F. Hofmann, *Acta Chem. Scand.* **17**, 173-186 (1963).
9. B. Samuelson, *Acta Chem. Scand.* **14**, 17-20 (1960).
10. J.P. Coleman, L. L. Hudson, *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2514-2520 (1995).
11. A. K. Batta, G. Salen, S. Shefer, *J. Biol. Chem.* **259**, 15036-15039 (1984).
12. M. Dean, C. Cervellati, E. Casanova, M. Squerzanti, V. Lanzara, A. Medici, P. Polverino de Laureto, C. M. Bergamini, *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3126-3128 (2002).
13. M. T. Liong, N. P. Shah, *Internat. Dairy Journal* **15**, 391-398 (2005).
14. H. Christiaens, R. J. Leer, P. H. Pouwels, W. Verstraete, *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3792-3798 (1992).
15. K. Drauz, H. Waldmann, Eds VCH, in *Enzyme Catalysis in Organic Syntesis*, Weinheim, Vol 1, 2 (1995).
16. C. H. Wong, G. M. Whitesides, in *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Tetrahedron Organic Chemistry Series, Pergamon, Vol 12, 159 (1994).
17. O. Bortolini, A. Medici, S. Poli, *Steroids* **62**, 564 (1997).
18. G. Fantin, S. Ferrarini, A. Medici, P. Pedrini, S. Poli, *Tetrahedron* **54**, 1937 (1998).
19. E. Bianchini, N. Chinaglia, M. Dean, P. P. Giovannini, A. Medici, P. Pedrini, S. Poli, *Tetrahedron* **55**, 1391-1398 (1999).
20. R. Edenharder, K. Mielek, *System. Appl. Microbiol.* **5**, 287-298 (1984).
21. S. Hirano, N. Masnuda, H. Oda, T. Imamura, *Microbiol. Immunol.* **25**, 271-282 (1981).
22. S. Hirano, N. Masnuda, H. Oda, *J. Lipid Res.* **22**, 735-743 (1981).

23. R. Edenharder, S. Stubenrauch, J. Slemrova, *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. I Abt. Orig. Reihne B* **162**, 506-518 (1976).
24. J. D. Sutherland, C. N. Williams, D. M. Hutchinson, L. V. Holdeman, *Can. J. Microbiol.* **33**, 663-669 (1987).
25. E. Mukherjee, S. Banerjee, S. B. Mahato, *J. Chem. Res. (Synop)*, 416-417 (1993).
26. Kurakay Co Ltd (Japan), 1981, *JP Patent* 81-24585.
27. Kurakay Co Ltd (Japan), 1981, *JP Patent* 81-24586.
28. Showa Denko K. K. (Japan), 1982, *JP Patent* 82-227487.
29. Showa Denko K. K. (Japan), 1983, *JP Patent* 83-131813.
30. P. P. Giovannini, A. Grandini, D. Perrone, P. Pedrini, G. Fantin, M. Fogagnolo, *Steroids* **73**, 1385-1390 (2008).
31. H. Sawada, S. Kinoshita, T. Yoshita, H. Taguchi, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **10**, 107-112 (1980).
32. H. Sawada, S. Kinoshita, H. Taguchi, *Advan. Biotech.* **3**, 495-500 (1981).
33. H. Sawada, S. Kinoshita, T. Yoshita, H. Taguchi, *J. Ferment. Technol.* **59**, 37-41 (1981).
34. R. Edenharder, T. Knafllic, *J. Lipid Res.* **22**, 652-658 (1981).
35. I. A. Macdonald, J. P. Rochon, D. M. Hutchinson, L. V. Holdeman, *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 1187-1195 (1982).
36. S. Riva, R. Bovara, P. Pasta, G. Carrea, *J. Org. Chem.* **51**, 2902-2906 (1986).
37. H. Sawada, S. Kulprecha, N. Nilubol, T. Yoshita, S. Kinoshita, H. Taguchi, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **44**, 1249-1252 (1982).
38. K. Castroem, D. N. Kirk, J. Sjoevall, *J. Lipid Res.* **22**, 1225-1234 (1981).
39. V.V. Kollerov, D. Monti, N. O. Deshcherevskaya, T. G. Lobastova, E. Ferrandi, A. Larovere, S.A. Gulevskaya, S. Riva, M. V. Donova, *Steroids* **78**, 370-378 (2013).
40. Yacult Honsha Co Ltd (Japan), 1982, *JP Patent* 82-37116.
41. Nisshin Shokuhin Co Ltd (Japan), 1984, *JP Patent* 84-75505.
42. Toyo Rubber Industry Co Ltd (Japan), 1985, *JP Patent* 85-179810.
43. R. Edenharder, *J. Steroid Biochem.* **21**, 413-420 (1984).
44. Intellectual Property Development Corp (USA). *FR Patent*, 1976, 76-5263.
45. Intellectual Property Development Corp (USA). *US Patent*, 1975, 75-550082.
46. M. J. Hill, B. S. Drasar, *Gut.* **9**, 22-27 (1968).

47. S. Hayakawa, *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie* **22**, 309-326 (1982).
48. M. Horinouchi, T. Kurita, T. Hayashi, T. Kudo, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **122**, 253-263 (2010).
49. A. Birkenmaier, J. Holert, H. Erdbrin, H. M. Moeller, A. Friemel, R. Schoenenberger, M. J. Suter, J. Klebensberger, B. Philipp, *J. Bacteriol.* **189**, 7165-7173 (2007).
50. R. A. Leppik, *Biochem. J.* **202**, 747-751 (1982).
51. B. Philipp, H. Erdbrin, M. J. Suter, B. Schink, *Arch. Microbiol.* **185**, 192-201 (2006).
52. B. Philipp, *Appl. Microbiol. Biotech.* **89**, 903-915 (2011).
53. C. Florin, T. Kohler, M. Grandguillot, P. Plesiat, *J. Bacteriol.* **178**, 3322-3330 (1996).
54. S. Morii, C. Fujii, T. Miyoshi, M. Iwami, E. Itagaki, *J. Biochem.* **124**, 1026-1032 (1998).
55. M. E. Tennesson, J. D. Baty, R.F. Bilton, A. F. Mason, *Biochem. J.* **184**, 613-618 (1979).
56. J. K. Capyk, I. D'Angelo, N. C. Strynadka, L. D. Ellis, *J. Biol. Chem.* **284**, 9937-9946 (2009).
57. M. Petrusma, L. Dijkhuizen, R. van der Geize, *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 5300-5307 (2009).
58. Y. Hu, R. van der Geize, G. S. Besra, S. S. Gurcha, A. Liu, M. Rohde, M. Singh, A. Coates, *Mol. Microbiol.* **75**, 107-121 (2010).
59. M. Horinouchi, T. Kurita, T. Hayashi, T. Kudo, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **122**, 253-263 (2010).
60. N. Fusetani, H. Nagata, H. Hirota, T. Tsuyuki, *Tetrahedron Lett.* **30**, 7079-7082 (1989).
61. M. Ochi, K. Yamada, H. Kotsuki, K. Shibata, *Chem. Lett.* **3**, 427-430 (1991).
62. Y. Seo, J. Shin, J. I. Song, *J. Nat. Products* **58**, 1291-1296 (1995).
63. Y. Seo, K. W. Cho, H. Chung, H. S. Lee, J. Shin, *J. Nat. Products* **61**, 1441-1443 (1998).
64. D. Lai, S. Yu, L. van Ofwegen, F. Totzke, P. Proksch, W. Lin, *Bioorg. & Med. Chem.* **19**, 6873-6880 (2011).
65. J. Tong, H. Trapido-Rosenthal, J. Wang, Y. Wang, Q. X. Li, Y. Lu. *Marine Drugs* **10**, 521-538 (2012).
66. M. H. Wilbrink, M. Petrusma, L. Dijkhuizen, R. van der Geize, *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 4455-4464 (2011).

67. K. C. Yam, R. van der Geize, L. D. Eltis, *Microbiol. Monographs* **16**, 133-169 (2010).
68. M. P. McLeod, R. L. Warren, W. W. L. Hsiao, N. Araki, M. Myhre, C. Fernandes, D. Miyazawa, W. Wong, A. L. Lillquist, D. Wang, M. Dosanjh, H. Hara, A. Petrescu, R. D. Morin, G. Yang, J. M. Stott, J. E. Schein, H. Shin, D. Smailus, A. S. Siddiqui, M. A. Marra, S. J. M. Jones, R. Holt, F. S. L. Brinkman, K. Miyauchi, M. Fukuda, J. E. Davies, W. W. Mohn, L. D. Eltis, *Proceed. Nat. Acad. Sci.* **103**, 15582-15587 (2006).
69. T. Lichtinger, G. Reiss, R. Benz, *J. Bacteriol.* **182**, 764-770 (2000).
70. M. A. Patrauchan, C. Florizone, M. Dosanjh, W. W. Mohn, J. Davies, L. D. Eltis, *J. Bacteriol.* **187**, 4050-4063 (2005).
71. M. J. Larkin, L. A. Kulakov, C. Allen, *Curr. Op. Biotechnol.* **16**, 282-290 (2005).
72. R. Van der Geize, L. Dijkhuizen, *Curr. Op. Biotechnol.* **7**, 255-261 (2004).
73. A.-T. Li, J.-D. Zhang, J.-H. Xu, W.-Y. Lu, G.-Qi. Lin, *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 551-556 (2009).
74. J. P. Toussaint, T. T. Pham, D. Barriault, M. Sylvestre, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **95**, 1589-1603 (2012).
75. H. Curragh, O. Flynn, M. J. Larkin, T. M. Stafford, J. T. Hamilton, D. B. Harper, *Microbiol.* **140**, 1433-1442 (1994).
76. J. D. Van Hamme, O. P. Ward, *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 4874-4879 (2001).
77. M. S. Nawaz, S. M. Billedeau, C. E. Cerniglia, *Biodegrad.* **9**, 381-387 (1998).
78. T. Iwasaki, H. Takeda, K. Miyauchi, T. Yamada, E. Masai, M. Fukuda, *Biosci., Biotech. & Biochem.* **4**, 993-1002 (2007).
79. H. W. Thompson, R. A. Lalancette, A. P. J. Brunskill, *Acta Crystallographica, Section C: Crystal Structure Communications*, **C57**, 632-633 (2001).
80. R. W. Owen, R. F. Bilton, *J. Steroid Biochem.* **19**, 1355-1362 (1983).
81. D. Kritchevsky, P. P. Nair, in *The Bile Acid Chemistry, Physiology and Metabolism*, Eds, Plenum Press: New York, 1971, vol. 1.
82. R.A. Leppik, *Biochem. J.* **210**, 829-836 (1983).
83. J. C. Knight, M. C. Novcha, *Steroids*, **46**, 789-796 (1985).
84. M. E. Tenneson, J. D. Baty, R. F. Bilton, A. N. Mason, *Journal of Steroid Biochemistry*, **11**, 1227-1232 (1979).
85. R. J. Park *Steroids*, **44**, 175-193 (1984).

86. S. Costa, P. P. Giovannini, G. Fantin, A. Medici, P. Pedrini, *Helvetica Chimica Acta*, **96**, 1062-1071 (2013).
87. P. Molyneux Songklanakarin *J. Sci. Technol.* **26**, 211-219 (2004).
88. V. Buzzoni, S. Vertuani, E. Braccioli, S. Manfredini, *Piante medicinali*, **1**, 107-110 (2002).
89. I. Popov, G. Lewin, [*Methods Enzymology*](#), **300**, 437-456 (1999).

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare coloro che hanno reso possibile la realizzazione di questo progetto:

Un immenso grazie...

alla *Prof.ssa Paola Pedrini* che in questi tre lunghi anni mi ha sempre supportata ed aiutata a raggiungere questo ambito traguardo e per tutto l'aiuto fornito per la stesura di questa tesi,

al *Prof. Alessandro Medici* per aver creduto in me sin dall'inizio,

all'azienda ICE s.r.l. per aver finanziato questo progetto,

al *Dott. Pier Polo Giovannini* per avermi insegnato fin dalla tesi triennale a lavorare in laboratorio e per essere sempre stato disponibile nei momenti in cui necessitavo di un confronto scientifico,

al *Dott. Giancarlo Fantin* per avermi pazientemente insegnato ad interpretare gli spettri NMR e per aver risposto a tutte le mie infinite domande,

al gruppo di ricerca del *Prof. Sacchetti*, per il supporto nei test antibatterici e antimicotici, in particolare al *Dott. Alessandro Grandini* che ha lavorato al mio fianco,

al gruppo di ricerca del *Prof. Brandolini*, in particolare alla *Dott.ssa Paola Tedeschi* e al *Dott. Gianpiero Bonetti*, per avermi dato la possibilità di realizzare i test sulla capacità antiossidante,

alla *Dott. Tatiana Bernardi* per le analisi di spettroscopia di massa,

al *Dott. Paolo Formaglio* per le analisi NMR,

alla mia collega *Irene Rugiero*, per avermi sopportata e supportata in questo periodo di stesura della tesi,

alle mie ex colleghe *Valentina Venturi* e *Chiara Useli* per avermi sempre incoraggiata anche nei momenti più difficili e soprattutto perché anche al di là del rapporto lavorativo si sono dimostrate vere e proprie amiche.

Ci sono poi persone che mi hanno permesso di arrivare fino a qua semplicemente grazie al loro amore, per cui non smetterò mai di ringraziare:

I miei genitori *Daniela* e *Roberto* per avermi sempre sostenuta in tutte le scelte che ho fatto, giuste o sbagliate e per avermi insegnato a credere in me stessa.

Il mio compagno *Simone* per essermi sempre e comunque vicino, in qualsiasi situazione, per farmi vedere le soluzioni quando i miei occhi non sono in grado di vederle e per riuscire a sorreggermi tutte le volte che mi sembra di cadere.