

I COMPOSTI FENOLICI DI INTERESSE BIOLOGICO.

- 6.1. Classificazione e distribuzione dei composti fenolici.** Definizione e classificazione. Distribuzione e compartimentazione. Proprietà chimico fisiche.
- 6.2. Biosintesi e metabolismo dei composti fenolici.** Il metabolismo prearomatico. Il metabolismo fenilpropanoidico. Biosintesi dei flavonoidi. Turnover e degradazione dei fenoli..
- 6.3. Significato fisiologico ed ecofisiologico dei composti fenolici.** Ruolo fisiologico. Significato ecologico.
- 6.4. Polimeri fenolici.** Tannini. Lignina. Melanine, Suberina.

6.1 Classificazione e distribuzione dei composti fenolici

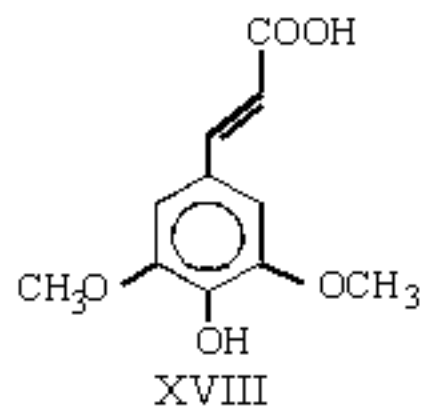
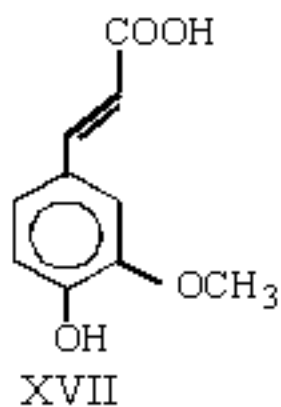
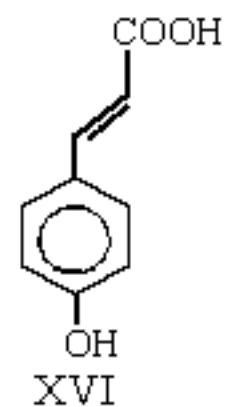
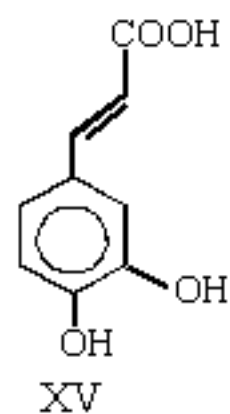
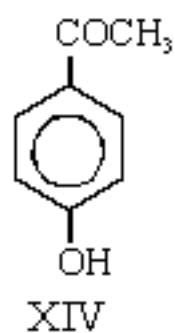
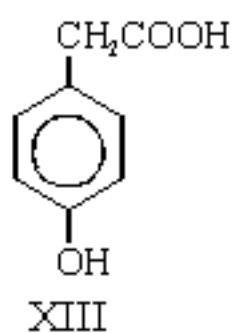
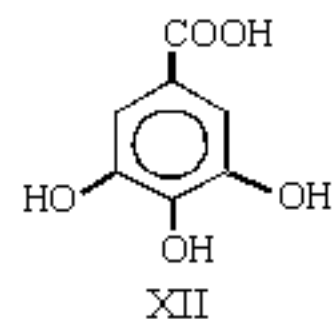
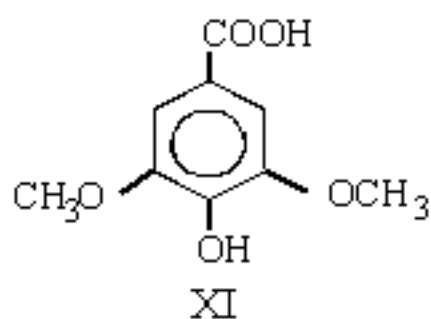
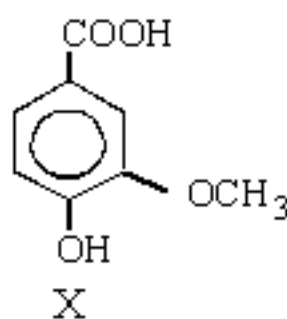
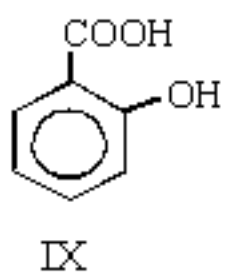
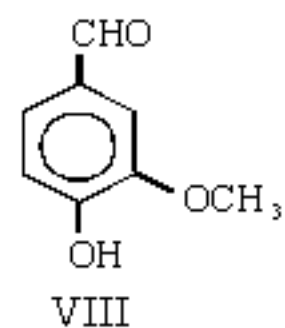
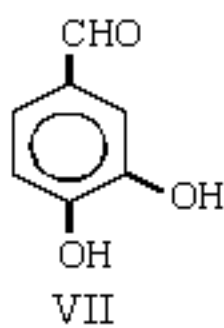
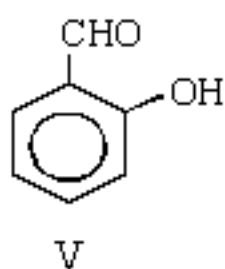
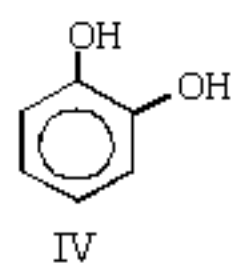
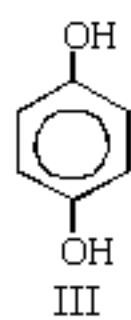
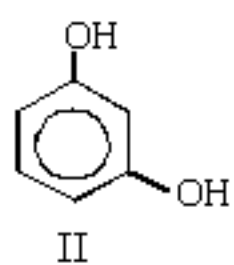
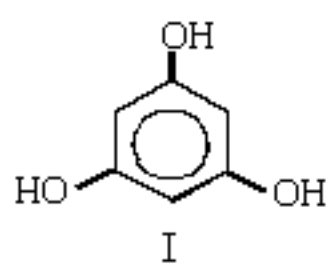
6.1.1 Definizione e classificazione dei composti fenolici

I composti fenolici rappresentano una delle principali classi di metaboliti secondari, la quale comprende un ampio spettro di sostanze molto eterogenee ma tutte caratterizzate dalla presenza di un anello aromatico con uno o più sostituenti ossidrilici. In alcuni casi la funzione ossidrilica può essere mascherata da una O-metilazione o da altro tipo di sostituzione, inoltre, molti composti accanto agli -OH fenolici contengono altri gruppi funzionali che influenzano le loro proprietà chimico-fisiche. Sebbene un cospicuo numero di sostanze fenoliche sia stato ritrovato in organismi animali, la presenza di una frazione fenolica è una caratteristica peculiare dei tessuti vegetali. I fenoli sono particolarmente importanti nei prodotti ortofrutticoli in cui hanno un ruolo preminente nel determinare colore e sapore. In particolare si associa agli acidi fenolici il sapore acidulo, ai tannini l'astringenza, mentre il sapore amaro è spesso associato ad alcuni flavonoidi quali naringenina e neoesperidina, il colore, infine, viene determinato dalla presenza degli antociani e dalle loro caratteristiche reazioni di copigmentazione. Il contenuto dei composti fenolici nei tessuti vegetali varia in funzione della specie, della varietà, dell'organo considerato, dello stadio fisiologico e delle condizioni pedoclimatiche.

In tabella 1.1.1 sono riportate alcune tra le principali classi di sostanze fenoliche di origine vegetale. Accanto alle forme monomere vi sono quattro importanti gruppi di polimeri fenolici: lignine, tannini, melanine e suberina. Attualmente sono state identificate diverse migliaia di strutture fenoliche, tra le quali la classe dei flavonoidi è quella numericamente più consistente (sono stati identificati oltre 4000 glicosidi e più di 1.800 agliconi appartenenti a questa classe

Tabella 1.1.1: Le principali classi di composti fenolici nelle piante.

Numero di atomi di carbonio	Scheletro base	Classe
6	C_6	Fenoli semplici Benzochinoni
7	C_6C_1	Acidi fenolici
8	C_6C_2	Acetofenoni Acidi fenilacetici
9	C_6C_3	Acidi idrossicinnamici Fenilpropeni Cumarine Isocumarine Cromoni
10	C_6C_4	Naftochinoni
13	$C_6C_1C_6$	Xantoni
14	$C_6C_2C_6$	Stilbeni Antrachinoni
15	$C_6C_3C_6$	Flavonoidi Isoflavonoidi
18	$(C_6C)_2$	Lignani Neolignani
30	$(C_6C_3C)_2$	Biflavonoidi
n	$(C_6C)_n$	Lignine
	$(C_6)_n$	Catecol-melanine
	$(C_6C_3C)_n$	Tannini condensati



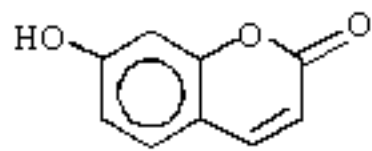
nella quale si fanno rientrare 13 tipi di flavonoidi *sensu stricto* ed almeno 10 tipi di isoflavonoidi).

I fenoli semplici (C_6) [es. cresolo, guaiacolo, floroglucinolo (I), etc.] non si ritrovano frequentemente nei tessuti vegetali, certamente il più raro in natura è il resorcinolo (II), ritrovato in aghi di *Pinus rigida*, mentre il più diffuso sembra essere l'idrochinone (III), identificato in molte famiglie (Ericaceae, Rasaceae, Saxifragaceae) essenzialmente come arbutina, una sua forma monoglucosidica. Il catecolo (IV) lo si può ritrovare come unità strutturale delle catecol-melanine, e la sua presenza in semi di girasole o di cocomero può farsi risalire a processi degradativi di questi pigmenti scuri. Tra i composti C_6 vanno citati alcuni chinoni (plastochinone, ubichinone, etc.) presenti nei cloroplasti e nei mitocondri delle cellule vegetali, i quali sono coinvolti nelle reazioni del metabolismo primario.

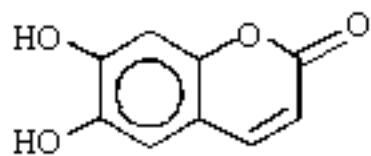
Tra i composti C_6-C_1 , salicilaldeide (V), p-idrossibenzaldeide, p-anisalaldeide (VI) ed aldeide protocatecuica (VII) si ritrovano comunemente come componenti di vari olii essenziali. Ma certamente l'aldeide più frequentemente ritrovata è la vanillina (VIII) (4-idrossi-3-metossibenzaldeide) estratta da baccelli di *Vanilla planifolia*, da tuberi di *Dahlia* e presente in vari altri olii essenziali. Gli acidi fenolici, in particolare gli acidi salicilico (IX), p-idrossibenzoico, protocatecuico, vanillico (X) e siringico (XI), sono universalmente distribuiti nelle piante soprattutto in forma di esteri oglicosidi, ma molto spesso in forma legata come costituenti della frazione alcol-insolubile dei tessuti vegetali, dove sono in parte legati alla lignina tramite legami esteri. L'acido gallico (XII), infine, lo si ritrova preferenzialmente nelle specie legnose, dove può essere presente in forma solubile come estere dell'acido chinico o legato a glucosio nei gallotannini (tannini idrolizzabili).

Acetofenoni ed acidi fenilacetici (C_6-C_2) sono composti poco comuni, ma non va dimenticato che all'acido p-idrossifenilacetico (XIII), ritrovato in forma libera o come glucoside in plantule di bambù, si riconosce un'attività biologica analoga, anche se inferiore, a quella dell'acido 3-indolacetico. Altri composti appartenenti a questa classe sono il p-idrossiacetofenone (XIV), presente in gemme di *Populus balsamifera*, la xantoxilina, ritrovata in specie di *Xanthoxylum*.

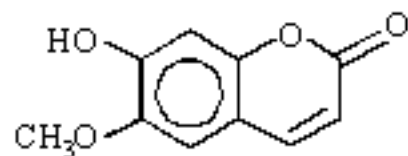
La classe dei fenilpropanoidi (C_6-C_3) rappresenta un gruppo di sostanze ampiamente diffuse nelle piante e caratterizzate dalla presenza di un anello aromatico con una catana alifatica laterale con tre atomi di carbonio. Tra gli acidi idrossicinnamici quelli più frequentemente ritrovati sono gli acidi caffeico (XV), universalmente diffuso nelle piante superiori, p-cumarico (XVI), ferulico (XVII) e sinapico (XVIII). Normalmente questi composti si ritrovano in forma coniugata, e la loro presenza in forma libera, in genere, la conseguenza di un artefatto (idrolisi chimica od enzimatica) verificatosi durante l'estrazione dei tessuti vegetali. Gli acidi idrossicinnamici ed i loro derivato possono esistere sia in forma cis (Z) che in forma trans (E), interconvertibile l'una nell'altra specialmente per effetto della luce UV: la forma prevalente in natura è quella trans, che è la forma più stabile. La riduzione del doppio legame alifatico degli acidi cinnamici è un fenomeno riscontrato in natura che origina gli acidi diidrocinnamici, tra i quali son stati identificati l'acido melilotico nelle leguminose e l'acido diidrocaffeoico nella barbabietola. Anche gli alcoli corrispondenti agli acidi p-cumarico, ferulico e sinapico, sono ampiamente diffusi nelle piante, anche se a concentrazioni molto basse, in quanto costituiscono gli immediati precursori della lignina. Le cumarine, frequentemente ritrovate in natura sotto forma di β -O-D-glucosidi, sono dei composti che, da un punto di vista strutturale, possono essere considerati dei derivati lattonici dell'acido 2-idrossicinnamico caratterizzati da un ampio pattern di ossigenazione sul nucleo benzopironico. Le cumarine più comuni nei tessuti vegetali sono l'umbelliferone (XIX), l'esculetina (XX) e la scopoletina (XXI), corrispondenti strutturalmente agli acidi p-cumarico, caffeico e ferulico. Una variante strutturalmente più complessa delle cumarine è costituita dalle furanocumarine, presenti in natura in un'ampia varietà di strutture. Le furanocumarine derivano, essenzialmente, dall'umbelliferone per condensazione con un'unità isoprenica (C_5) e costituiscono una classe di composti lipofili che spesso si presentano con gli -OH fenolici protetti da O-metilazione [bergaptene (XXII),



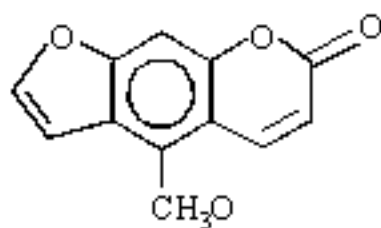
XIX



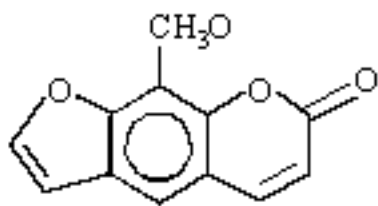
XX



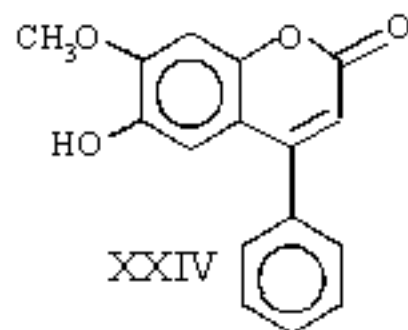
XXI



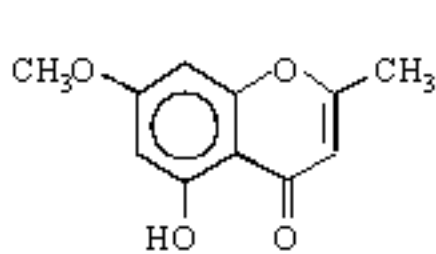
XXII



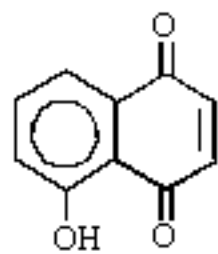
XXIII



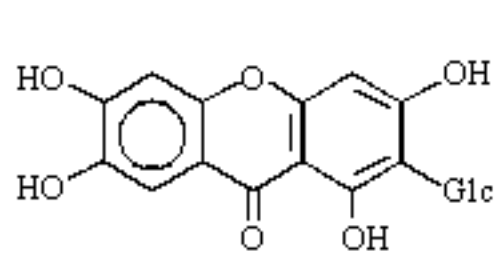
XXIV



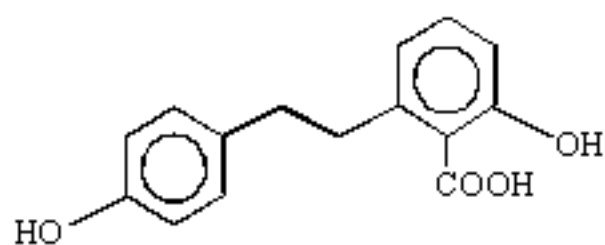
XXV



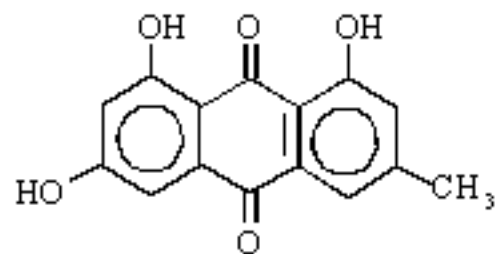
XXVI



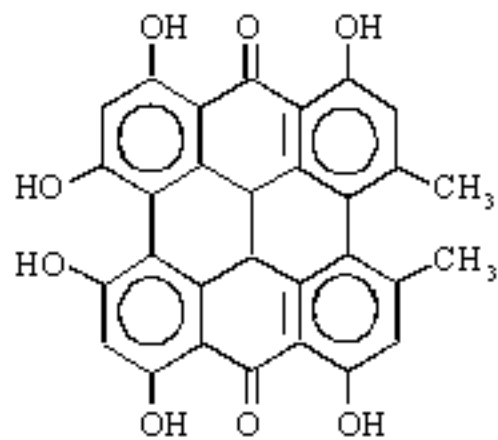
XXVII



XXVIII



XXIX



XXX

xantoxina XXIII)] o da isoprenilazione. Le furanocumarine sono molto interessanti da un punto di vista fisiologico per la loro capacità di inibire la germinazione dei semi: esse possono comportarsi da inibitori esogeni oppure da agenti allelopatici che rilasciati nel terreno possono inibire la germinazione dei semi di altre specie presenti nelle vicinanze. Nella classe delle cumarine si possono anche includere le 4-fenilcumarine [dalbergina (XXIV)] (una classe di composti classificata come neoflavonoidi) le quali sono state identificate quasi esclusivamente nelle Leguminosae e nelle Guttiferae. I cromoni [eugenina(XXV)], infine, sono una forma isomerica delle cumarine, scarsamente diffusi in natura e, generalmente, caratterizzati dalla presenza di un gruppo metilico od alchilico sul C₂ e da gruppi ossidrilici sul C₅ e sul C₇.

I naftochinoni (C₆-C₄) costituiscono una classe di pigmenti chinonici basati sulla struttura del naftalene. Spesso nei tessuti vegetali questi chinoni sono presenti in forma ridotta, incolore, e legati a molecole di zuccheri. La forma chinonica viene prodotta o in seguito ad estrazione dei tessuti vegetali o nel corso della maturazione dei frutti. Un esempio di questo tipo è costituito dallo juglone (5-idrossinaftochinone) (XXVI) un chinone presente nei frutti di noce.

Gli xantoni (C₆-C₁-C₆) sono una classe di fenoli strutturalmente analoghi ai flavonoidi, ma con una distribuzione molto più limitata nei tessuti vegetali. La maggior parte degli xantoni naturali sono stati ritrovati soltanto in due famiglie di piante superiori, Gentianaceae e Guttiferae, ed, in particolare, si ritrovano nelle radici, nelle foglie e nel legno di queste piante. Altre famiglie, in cui è stata rivelata la presenza di questa classe di composti, sono le Logoniaceae, le Podostemaceae, le Polygalaceae e le Moraceae, nonché in alcuni funghi e licheni. La loro struttura si presenta, normalmente, in forma ossigenata (idrossi- e/o metossixantoni): xantoni monoossigenati si ritrovano comunemente in entrambe le famiglie, mentre composti polioossigenati sono più frequenti nelle Gentianaceae. Xantoni prenilati sono stati identificati nelle Guttiferae ma non nelle Gentianaceae, mentre gli O-glicosilxantoni sono comuni nelle Gentianaceae ma poco frequenti nelle Guttiferae. Infine C-glucosilxantoni sono stati identificati in oltre un centinaio di specie di piante superiori ed in questa classe il composto più comunemente ritrovato è la mangiferina (XXVII), un 2-C-glucoside dell'1,3,6,7-tetraidrossixantone identificato per la prima volta in foglie di mango. Accanto alle strutture citate, sono stati ritrovati dei xantolignoidi ed una varietà di strutture poco frequenti.

Al contrario, gli stilbeni (C₆-C₂-C₆) sono ampiamente diffusi in alcune Briofite ed in piante superiori. Sono composti formati da due anelli benzenici separati da un etano o da un ponte etenico, che agiscono, in genere, da fitoalessine e da regolatori di crescita. Ad esempio l'acido lunularico (XXVIII) è un diidrossistilbene, che agisce da inibitore di crescita in maniera analoga all'acido abscissico. Analoga attività biologica presenta la batatasina III, un diidrostilbene in grado di indurre dormienza in bulbi di *Dioscorea batatis*. Al gruppo C₆-C₂-C₆ appartengono anche gli antrachinoni (XXIX = emodina), dei composti tricyclici isolati da foglie, steli, baccelli, tegumenti ed embrioni di diverse specie appartenenti alle famiglie delle Leguminosae, delle Liliaceae, delle Polygonaceae, delle Rhamnaceae, delle Rubiaceae e delle Scrophulariaceae. Questi composti si ritrovano in molte piante officinali utilizzate per le loro caratteristiche purgative (es. il rabarbaro). Esistono forme dimere degli antrachinoni [biantroni (XXX = ipericina)] anch'essi utilizzati per la loro attività purgativa, come la palmidina A estratta da radici di rabarbaro.

I flavonoidi (C₆-C₃-C₆) costituiscono una delle più tipiche classi di composti fenolici presenti nelle piante superiori. La struttura chimica di questi composti, presenti in tutte le parti della pianta, è basata su uno scheletro C₁₅ con un anello cromonico legato ad un secondo anello aromatico (B) in posizione 2, 3 o 4 (Figura 1.1.5). In alcuni casi l'anello eterociclo C può presentarsi in una forma isomerica aperta (calconi) oppure viene sostituito da un anello a 5 atomi di carbonio (auroni). I vari sottogruppi di flavonoidi vengono classificati in base allo stato di ossidazione dell'anello eterociclico ed alla posizione dell'anello B. Molti di questi hanno l'anello B in posizione 2 sull'anello eterociclo (flavanoni, flavoni, flavonoli ed antocianine), negli isoflavonoidi l'anello B è in posizione 3 mentre nelle 4-fenilcumarine (neoflavonoidi) l'anello B è in posizione 4. Esistono, infine, delle strutture oligomeriche, quali i biflavonoidi [(C₆-C₃-C₆)₂],

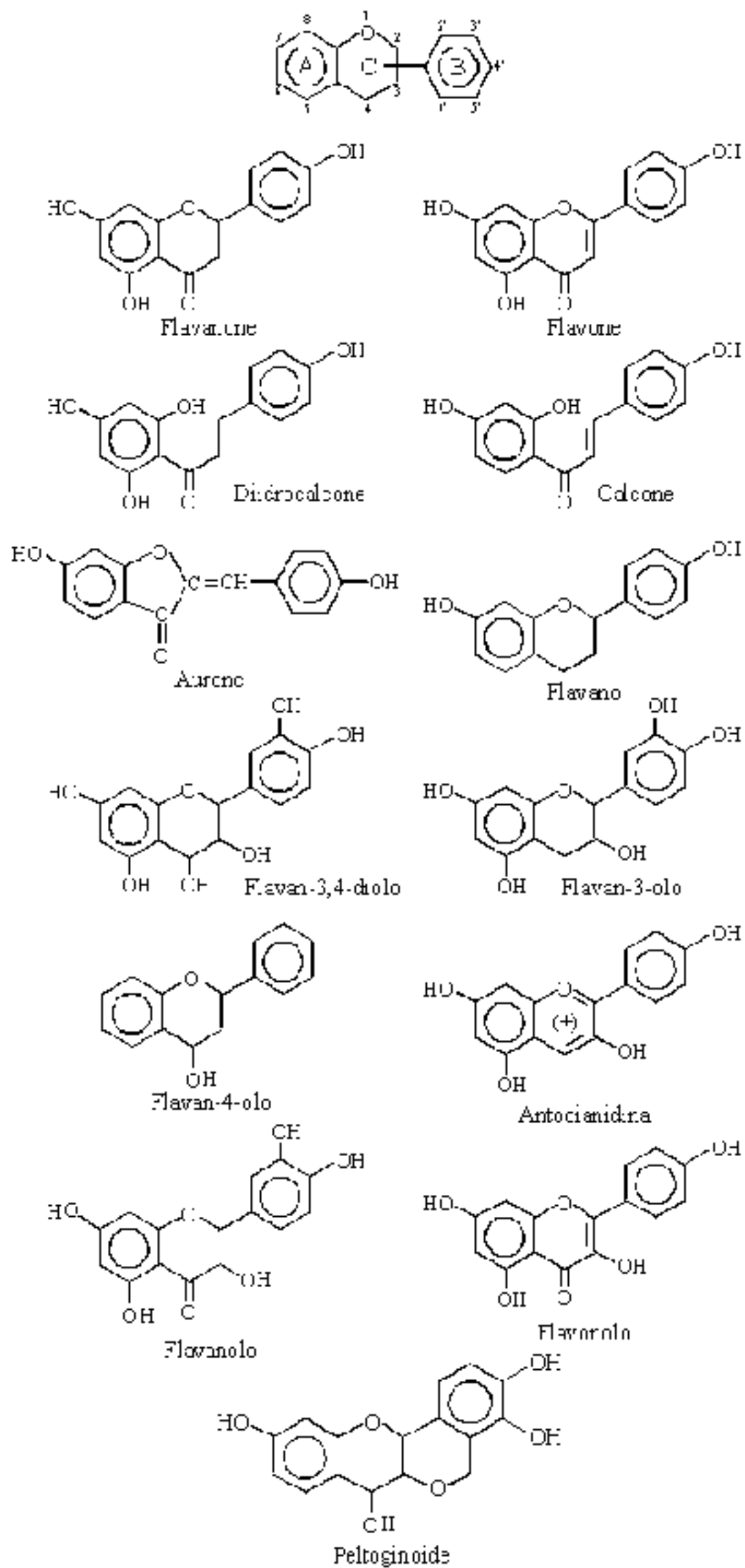


Figura 1.1.5a: Scheletro base dei flavonoidi e strutture rappresentative dei 13 sottogruppi di flavonoidi.

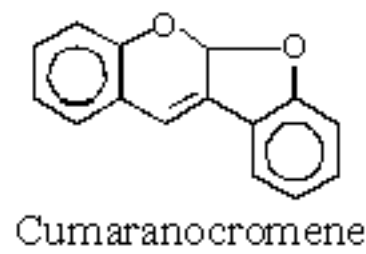
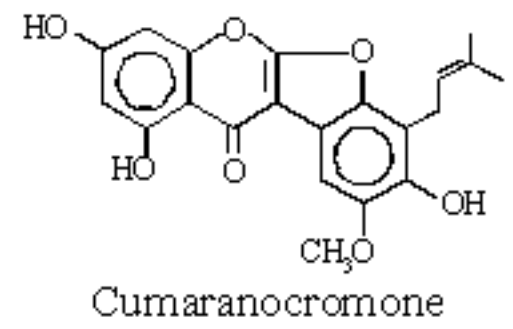
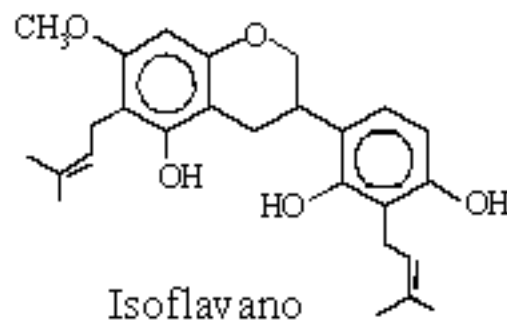
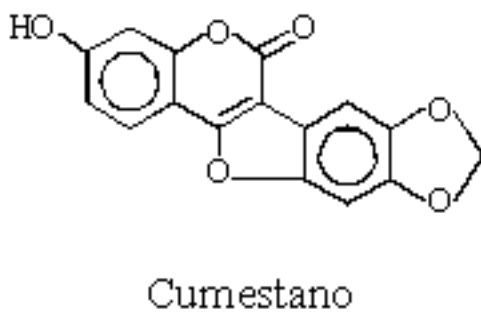
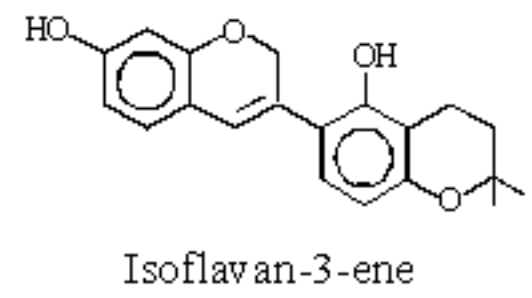
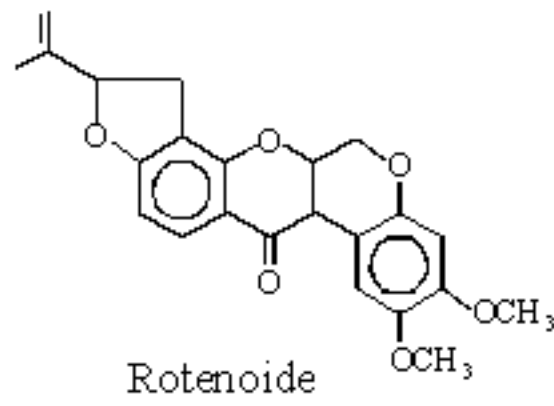
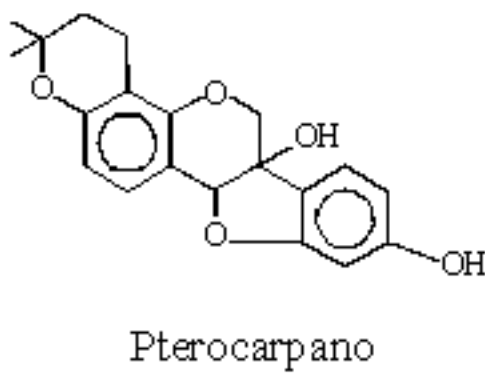
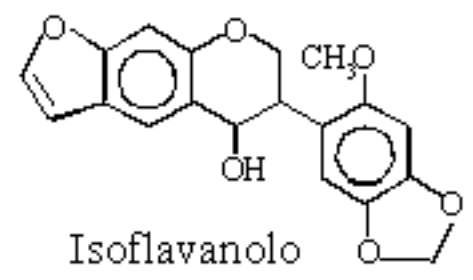
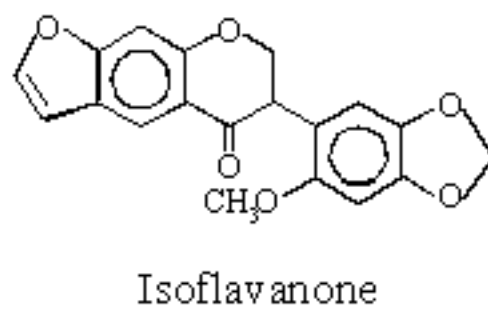
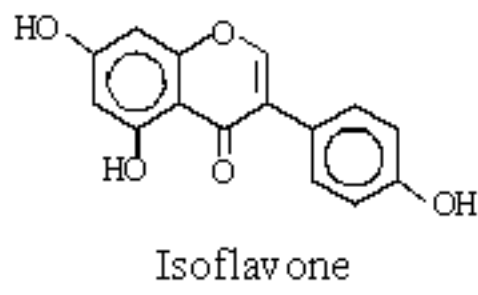
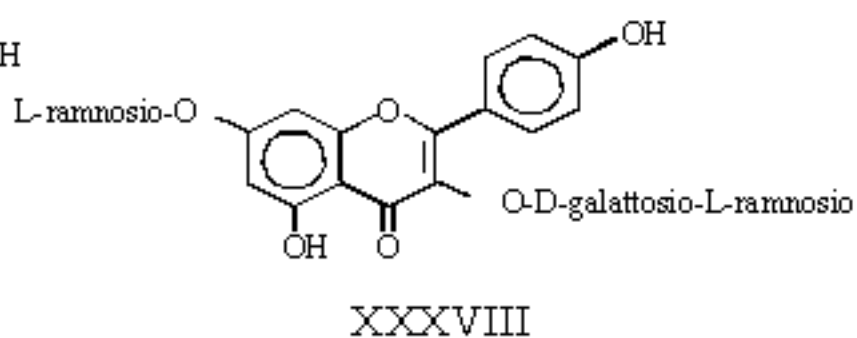
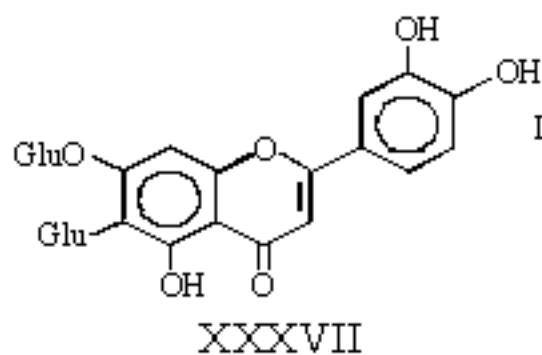
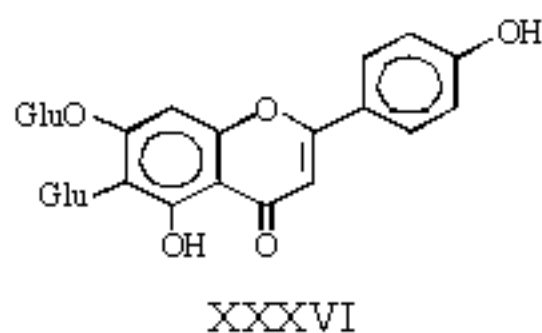
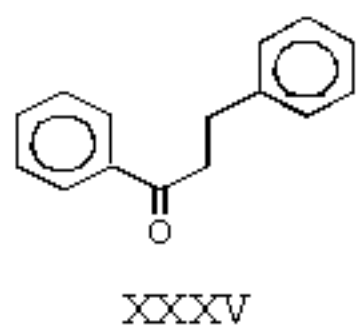
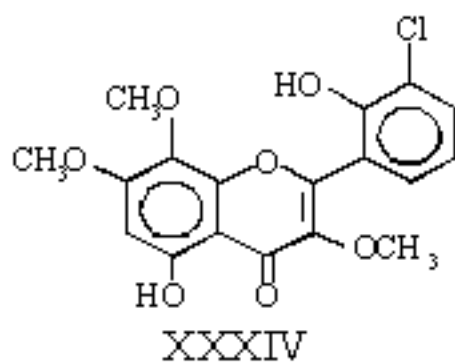
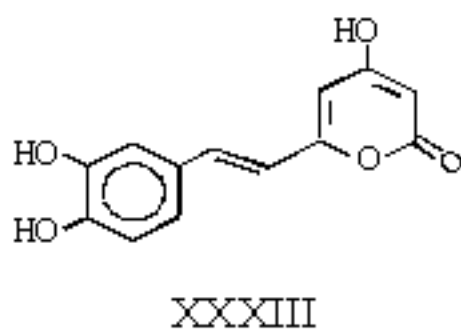
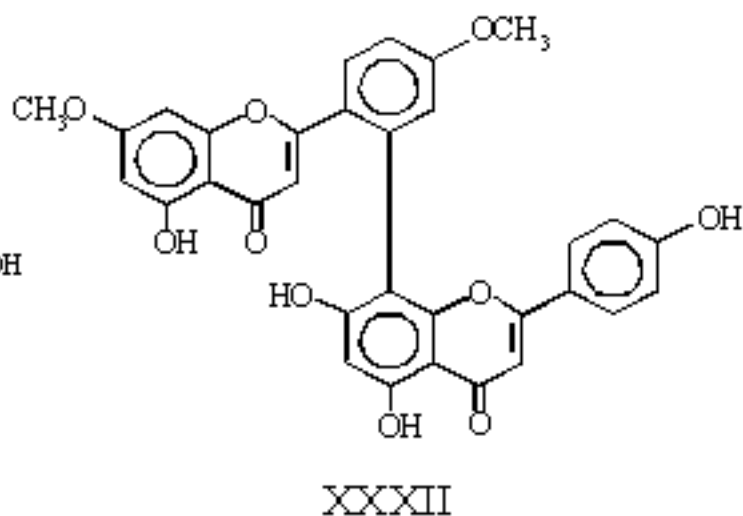
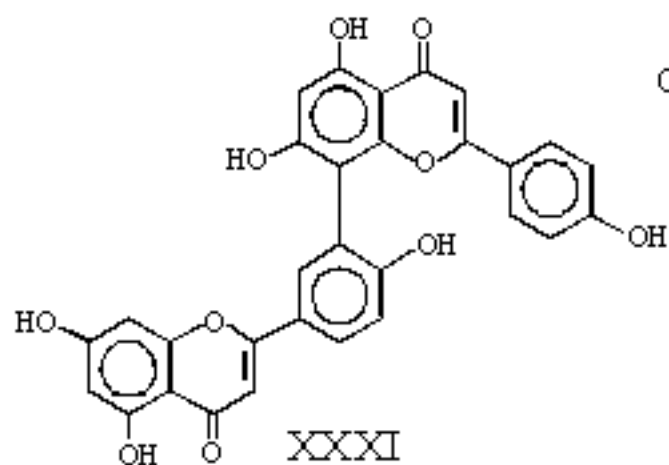


Figura 1.1.5b: Strutture rappresentative dei principali sottogruppi di iso flavonoidi.



come l'amentoflavone (XXXI) e la ginkgetina (XXXII), e le proantocianidine [(C₆-C₃-C₆)_n]. Normalmente i flavonoidi si ritrovano in natura in forma glicosilata, con diversi tipi di zucchero attaccati ai gruppi -OH. Gli zuccheri, a loro volta, possono essere legati ad un sostituente acilico, quali malonato, p-cumarato, caffeato e ferulato. Infine, i flavoni, a differenza da altri tipi di flavonoidi, possono formare dei C-glicosidi impegnando le posizioni 6 ed 8 dello scheletro base.

Vanno, infine, ricordate le quattro principali classi di polimeri fenolici: melanine, lignine e tannini e suberina. Il processo di polimerizzazione può essere visto come parte di una strategia mirante a ridurre la possibilità che le sostanze fenoliche interferiscano con i processi metabolici cellulari. Le melanine sono dei pigmenti scuri, che spesso si formano in seguito a polimerizzazione ossidativa di substrati *orto*-difenolici, normalmente presenti in forma combinata con proteine. La lignina (*lignum* = legno) la si ritrova come costituente integrale della parete cellulare di tutte le piante vascolari, incluse le specie erbacee, associata alla matrice cellulosa tramite ponti idrogeno o legami covalenti. Questo polimero dà un contributo alla tensione esercitata dalla parete sul contenuto cellulare mentre non sembra influenzare le caratteristiche di elasticità della parete stessa. L'attitudine delle piante a formare lignina viene considerato un fattore decisivo nel processo di adattamento delle piante all'habitat terrestre. Soltanto la formazione di pareti cellulari lignificate fa sì che piante legnose ed alberi abbiano un fusto rigido ed elementi conduttori per il trasporto di acqua. I tannini sono polimeri raggruppabili, essenzialmente, in due distinti sottogruppi sulla base delle loro caratteristiche strutturali. I tannini condensati o proantocianidine sono polimeri del flavan-3-olo, normalmente non associati a zuccheri, mentre i tannini idrolizzabili sono polimeri che per idrolisi acida, basica od, in alcuni casi, enzimatica, liberano zuccheri (normalmente D-glucosio) o polioli analoghi ed un acido fenolico. L'importanza della presenza dei tannini nei tessuti vegetali sta nel fatto che questi composti sono efficaci come repellenti nei confronti di predatori e parassiti. Una loro caratteristica peculiare, infatti, è l'astringenza una proprietà, legata alla precipitazione delle proteine salivari, che rende i tessuti vegetali sgradevoli per gli animali, e che impedisce l'invasione dei tessuti vegetali da parte di organismi parassiti immobilizzando gli enzimi extracellulari. La suberina, infine, è un materiale polimerico legato alle pareti cellulari del periderma, che funge da barriera nei confronti di acqua e vari soluti e la cui formazione viene spesso indotta da ferite provocate nei tessuti vegetali da attacchi fungini o danni meccanici.

Questa grande varietà di strutture fenoliche riflette un'altrettanto grande diversificazione delle loro funzioni. I composti fenolici possono fungere da pigmenti floreali a basso peso molecolare, da antibiotici, da schermo nei confronti delle radiazioni UV, da repellenti per gli insetti e da segnali nelle interazioni pianta-microorganismi. I composti fenolici possono fungere, inoltre da complessi costituenti polimerici di strutture superficiali e di supporto: è il caso, ad esempio della lignina, della suberina e di altri costituenti [come l'acido ferulico presente sotto forma di ponti diferuloilici (**isoditrosina**)] presenti nella parete cellulare. Infine, la grande varietà di struttura e di funzioni dei composti fenolici viene riflessa, anche, nella variabilità del loro pattern temporale e spaziale a livello di pianta intera o di singolo organo.

6.1.2 Distribuzione e compartimentazione dei composti fenolici

Composti quali gli acidi idrossicinnamici, i flavonoidi e la lignina sono universalmente diffusi nelle piante superiori, mentre sono praticamente assenti in batteri ed alghe (Tabella 1.2.1). Nei batteri sono presenti, occasionalmente, alcuni derivati polichetidici dei fenoli, mentre in alcune alghe più evolute appartenenti alla classe delle Charophyceae (Chlorophyta) si ritrovano fenoli semplici e chinoni. Alcuni funghi posseggono il corredo enzimatico necessario per sintetizzare i derivati dell'acido cinnamico, pertanto, possono presentare nella loro composizione fenoli semplici, chinoni, propanoidi ed, in alcuni casi, derivati polichetidici dei fenoli, come l'ispidina (XXXIII). Occasionalmente nei funghi si ritrovano flavonoidi (ad esempio la cloroflavonina (XXXIV), isolata da *Aspergillus candidus*, e un α,β -diidrocalcone (XXXV), isolato da *Phallus impudicus*), la cui struttura non è riconducibile a quella dei flavonoidi comunemente

Tabella 1.2.1: Distribuzione delle diverse classi di fenoli nel regno vegetale.

Phylum	Pattern fenolico
Batteri	Derivati polichetidici dei fenoli, occasionale presenza di chinoni
Funghi	Fenoli semplici, chinoni, fenilpropanoidi, occasionale presenza di flavonoidi
Alghe	Derivati del floroglucinolo nelle pareti cellulari
Licheni	Xantoni, antrachinoni
Briofite	Fenilpropanoidi, flavonoidi, stilbeni, fenoli della parete cellulare
Felci, Angiosperme, Gimnosperme	Lignine, fenoli appartenenti alle diverse classi

presenti nelle piante superiori ma sulla cui presenza non sembrano esserci dubbi. Alghe e funghi sono caratterizzati dall'assenza di lignina, probabilmente a causa della mancanza del corredo enzimatico completo per portare avanti le reazioni di polimerizzazione o, più probabilmente, per l'assenza di una parete cellulosica in cui il processo di acilazione della cellulosa precede la formazione della lignina. Anche nelle briofite (con l'eccezione di alcuni muschi) ed in alcune angiosperme acquatiche l'assenza di lignina è da mettere in relazione alla mancanza di una parete cellulare acilata. Nelle briofite, inoltre, cominciano a comparire alcune classi di flavonoidi, la cui complessità aumenta quando si passa alle tracheofite. In alcune tracheofite meno evolute sono presenti dei biflavonoidi e leucoantocianidine, nelle gimnosperme, assieme ai biflavoni, si ritrovano flavoni, flavonoli, flavanoni e flavanoli. Infine, nelle angiosperme la complessità del pattern flavonoidico raggiunge il suo valore massimo con la comparsa di neoflavonoidi, aurononi e cromano-cumarine, mentre contemporaneamente aumenta la complessità del pattern di sostituzione dello scheletro base: idrossilazioni e glicosilazioni più complesse, O-metilazione multipla e prenilazione diventano delle caratteristiche frequentemente incontrate in tutte le classi di flavonoidi.

I composti fenolici si accumulano, in genere, in tutti gli organi della pianta (radici, steli, foglie, fiori e frutti), tale accumulo si realizza in maniera specifica nei vari tessuti a seconda dei vari generi di pianta, con la maggior parte dei fenoli presenti negli strati epidermici e subepidermici dei vari tessuti. In generale, si può affermare che, ad eccezione della lignina, i composti fenolici si accumulano preferenzialmente negli organi aerei della pianta (steli, foglie, fiori e frutti) piuttosto che nelle radici. Questa localizzazione preferenziale viene messa in relazione con l'effetto induttore della luce sul metabolismo fenolico, nonché con il ruolo protettivo esercitato dai composti fenolici nei confronti delle radiazioni ultraviolette.

I composti fenolici, in quanto riflettono l'espressione degli enzimi preposti alla loro biosintesi, possono variare in funzione dell'organo, dello stadio fisiologico e da pianta a pianta all'interno di una popolazione. All'interno di un particolare organo il tenore in composti fenolici varia in funzione dello stadio fisiologico dell'organo stesso (oltre che dalle condizioni pedoclimatiche): in generale, si stabilisce un gradiente decrescente apice-base all'interno di organi dello stesso tipo e tale gradiente può essere messo in relazione ad una variazione di attività degli enzimi legati alla biosintesi e/o al turnover dei composti fenolici. È interessante, infine, notare come alcuni composti fenolici presentino una localizzazione estremamente specifica limitata ad alcuni organi o tessuti della pianta: è il caso di alcune fenolammidi localizzate nei tessuti fiorali della specie analizzate. Per quanto concerne la localizzazione tissulare si è già accennato che sono i tessuti epidermici quelli più ricchi di composti fenolici. In particolare, considerando gli organi vegetativi, si osserva che essi contengono un tenore più elevato di flavonoidi e di tannini negli strati più esterni rispetto a quelli più interni, mentre il tenore dei derivati dell'acido cinnamico e quello delle cumarine non subisce grandi variazioni passando dall'epidermide superiore al mesofillo. Anche la compartimentazione tissulare presenta dei casi di elevata specificità: ad esempio, nelle foglie di orzo la saponarina (6-C-glucosil-7-O-glucosilapigenina) (XXXVI) e la lutonarina (3-idrossisaponarina) (XXXVII), due flavonoidi che differiscono soltanto per un ossidrilico, sono localizzati il primo nell'epidermide e nel mesofillo ed il secondo esclusivamente nel mesofillo, mentre nelle nervature fogliari i due composti sono assenti. Nel caso dei frutti, i tessuti più esterni sono più ricchi di flavonoidi rispetto agli altri tessuti, mentre acido clorogenico e cumarine sono più uniformemente distribuiti. Infine, per quanto concerne la lignina, si può affermare che questo polimero si accumula soprattutto nei tessuti conduttori o di sostegno della pianta, anche se non in maniera esclusiva in quanto, potenzialmente, tutte le cellule vegetali sono in grado di produrre lignina in risposta a situazioni di stress biotico od abiotico.

A livello subcellulare i due principali siti di accumulo dei composti fenolici sono la parete cellulare, dove viene depositata la lignina, ed il vacuolo, dove vengono immagazzinate diverse classi di sostanze fenoliche. Questa segregazione, oltre che ad una strategia di detossificazione dei composti fenolici, ha anche un significato funzionale nella più generale strategia di

adattamento della pianta all'ambiente esterno. In sintesi, si può affermare che sito di accumulo e sito di sintesi dei composti fenolici, contrariamente a quanto accade a livello tissulare, differiscono tra loro. Infatti, a prescindere dal loro eventuale ruolo fisiologico, i composti fenolici presentano una reattività nei confronti dei principali costituenti protoplasmatici, che potrebbe renderli tossici per la stessa cellula che li produce. Tale tossicità può essere prevenuta, oltre che da processi di coniugazione, da una rigida compartimentazione cellulare e/o da fenomeni di secrezione.

Gli enzimi legati alla biosintesi delle unità cinnamiche (C_6-C_3), in particolare fenilalanina ammonio liasi (PAL) e cinnamato-4-idrossilasi (C4H), i primi due enzimi del pathway dei derivati cinnamici, sono associati al reticolo endoplasmatico, mentre l'attivazione dei derivati cinnamici ad opera del Coenzima A si realizza a livello di vescicole (probabilmente vescicole di Golgi). Gli esteri cinnamici del CoA si spostano, successivamente, nei cloroplasti dove vengono prodotti gli esteri chinici dei derivati dell'acido cinnamico. I diversi composti fenolici non si ritrovano in forma diffusibile all'interno del citoplasma, in quanto, come viene indicato da studi sia di tipo biochimico che ultrastrutturali, esiste una rigida compartimentazione nella sintesi e nel trasporto dei composti fenolici all'interno delle cellule. Tale compartimentazione può essere immaginata composta da pathways consistenti di complessi sistemi multienzimatici, formati da enzimi associati a membrana (sia proteine di tipo estrinseco che intrinseco) ed assemblati tra loro in successione tramite forze noncovalenti, la cui funzione è quella di aumentare l'attività catalitica incanalando il flusso di carbonio all'interno del sistema. In prossimità di questi complessi i prodotti finali della sintesi, in forma glicosilata, vengono sequestrati in specifiche regioni del reticolo endoplasmatico, destinate a formare vescicole membranose. Successivamente, tali vescicole possono muoversi in direzione del vacuolo per l'immagazzinamento interno dei composti fenolici (è il caso di flavonoidi, cumarine, derivati dell'acido cinnamico, etc.), oppure possono dirigersi verso la membrana plasmatica per la secrezione all'interno della parete cellulare, dove possono essere utilizzati, ad esempio, nel processo di lignificazione.

6.1.3 Proprietà chimico-fisiche

La presenza di gruppi -OH fenolici influisce notevolmente sulle proprietà chimico-fisiche dei composti fenolici, in quanto aumenta il carattere idrofilico della molecola e le conferisce una natura acida. A differenza degli alcoli alifatici, infatti, i quali hanno un pK_a molto simile a quello dell'acqua ($pK_a \cong 14$), una soluzione acquosa di un composto fenolico presenta una debole acidità ($pK_a \cong 10$): in termini di costante di equilibrio ciò significa che un composto fenolico in soluzione acquosa tende lievemente a dissociarsi in fenossione ed H^+ . Molti glicosidi fenolici sono solubili in acqua mentre i corrispondenti agliconi sono meno solubili, come pure i corrispondenti eteri ed esteri. Con poche eccezioni (resorcinolo e floroglucinolo), la solubilità in acqua degli agliconi fenolici aumenta con l'aumentare del numero di ossidrilici presenti sull'anello benzenico. Se non presenti in forma coniugata, glicosidi od esteri, alcuni composti fenolici sono normalmente solubili in solventi organici polari. I fenoli con pochi gruppi ossidrilici sono solubili in metanolo, etanolo, cloroformio, etere ed etilacetato. Fenoli con una o più catene alifatiche laterali richiedono solventi meno polari per la loro estrazione. Essi sono, inoltre, solubili in sodio idrossido ed in carbonato di sodio (gli acidi fenolici sono solubili anche in bicarbonato di sodio), ma in ambiente alcalino viene favorita la loro ossidazione. Infine, essendo le sostanze fenoliche composti aromatici, presentano un intenso assorbimento nella regione UV e visibile dello spettro elettromagnetico e tale assorbanza viene notevolmente influenzata dal pattern di distribuzione dei gruppi ossidrilici sull'anello aromatico. Di particolare interesse in termini di evoluzione, è l'assorbimento delle radiazioni ultraviolette, che fa sì che i composti fenolici possano agire nelle piante da schermo nei confronti delle radiazioni UV. Sebbene acidi fenolici e derivati fenilpropanoidici siano in grado, sulla base delle loro caratteristiche spettrali, di assolvere a questo ruolo, questi composti presentano un coefficiente di estinzione molare più basso rispetto a quello dei flavonoidi: una miscela di flavanoni, flavoni e

flavonoli nel vacuolo centrale delle cellule epidermiche delle foglie abbassa efficacemente l'incidenza delle radiazioni UV-A ed UV-B contenute nella radiazione incidente sulle foglie, arrivando ad assorbire fino al 90% della radiazione UV-B. Nelle foglie questo effetto schermo viene esercitato a vantaggio delle cellule del mesofillo contenenti i cloroplasti con tutto l'apparato fotosintetico, all'interno del quale il fotosistema II sembra essere il più sensibile alle radiazioni UV.

La presenza di gruppi ossidrilici, inoltre, aumenta la reattività chimica della molecola in quanto questi gruppi possono formare legami idrogeno intramolecolari o con altre molecole, quali proteine ed alcaloidi. I gruppi fenolici, in particolare i gruppi ortodifenolici, vengono facilmente ossidati sotto l'azione catalitica delle polifenolossidasi ed i chinoni formati, a loro volta, possono polimerizzare producendo polimeri complessi (melanine). Gli ortodifenoli sono, anche, in grado di chelare metalli e questa reazione è in grado di modificarne l'azione.

Da un punto di vista biologico le reazioni tra composti fenolici, i loro prodotti di ossidazione e/o i polimeri fenolici, e le proteine sono quelle più importanti in quanto coinvolte nei processi di estrazione e purificazione delle proteine, nell'inibizione od attivazione degli enzimi, nel disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa, nei meccanismi di resistenza dei tessuti vegetali agli attacchi microbici, nel metabolismo post-raccolta dei prodotti ortofruttilicoli.

I fenoli si combinano con le proteine per mezzo di reversibili legami idrogeno od in seguito a reazioni irreversibili di ossidazione seguite da condensazioni covalenti. Nel caso dei tannini sono da prendere anche in considerazione i deboli legami ionici che possono formarsi tra opportuni gruppi anionici presenti sulla molecola fenolica e gruppi cationici presenti nella struttura proteica. Nella formazione dei complessi tannini-proteine un ruolo importante viene svolto dai legami peptidici ed ammidici, in particolare, relativamente ai gruppi peptidici, sembra che nel legame idrogeno sia coinvolto il gruppo carbonilico come accettore di idrogeno dalla molecola fenolica. Nel caso in cui nella formazione di complessi fenoli-proteine vengano coinvolti legami più stabili, questi si realizzano a partire dai chinoni, derivanti dall'ossidazione enzimatica dei fenoli, che reagiscono rapidamente e con un meccanismo non-enzimatico: essi possono polimerizzare, possono essere ridotti oppure possono subire un attacco nucleofilo da parte di molecole che posseggono gruppi amminici, tiolici o gruppi metilenici attivati.

In situazioni diverse i fenoli possono agire da attivatori od inibitori di enzimi purificati. E' noto, ad esempio, che i monofenoli agiscono da attivatori dell'acido indolacetico-ossidasi, mentre i composti ortofenolici si comportano da inibitori. A basse concentrazioni ($5 \cdot 10^{-6}$ M) acido clorogenico ed acido caffeico inibiscono la decarbossilazione ossidativa degli amminoacidi catalizzata da perossidasi, mentre il fenolo funge da attivatore. Anche la respirazione cellulare viene influenzata da composti fenolici e chinoni: ad una concentrazione di 10^{-3} M numerosi composti fenolici si sono rivelati in grado di stimolare il consumo di ossigeno in *Saccharomyces cerevisiae* e *Chlorella vulgaris*, mentre i chinoni, al contrario, si comportano da inibitori. E' interessante osservare, inoltre, che molti composti fenolici naturalmente presenti nei tessuti vegetali sono in grado di agire da disaccoppianti della fosforilazione ossidativa e che, analogamente al dinitrofenolo (DNF), il più classico tra i disaccoppianti, le stesse concentrazioni efficaci nel disaccoppiare la fosforilazione possono stimolare oppure essere inefficaci sulla velocità del processo respiratorio. E' stato ipotizzato che i fenoli e le corrispondenti forme chinoniche possano interferire con il flusso elettronico nella catena respiratoria accettando elettroni dalle flavoproteine ridotte ed interrompendo, così, il flusso di equivalenti riducenti verso il sistema dei citocromi: i chinoni si trasformano in semichinoni ed in tal modo possono interferire con il processo respiratorio. Quest'ultimo composto, il quale possiede un elettrone spaiato ed una natura radicalica, è relativamente stabile potendo esistere in più forme mesomeriche (stabilizzazione per risonanza). Infine, va segnalato che i chinoni, potendo reagire in diversi modi con enzimi e proteine, possono inibire la fosforilazione inibendo l'attività catalitica.

L'attività dei chinoni nei confronti di diversi tipi di enzimi suggerisce, quindi, che essi possano disturbare il metabolismo cellulare in vari modi, e, cioè, reagendo con amminoacidi e proteine,

alterando i potenziali di ossidoriduzione cellulari, interferendo con la sintesi di enzimi oppure inibendo specifici sistemi enzimatici. I chinoni possono inibire gli enzimi complessando gli ioni metallici che partecipano alla catalisi, reagendo con gruppi sulfidrici della catena peptidica (reazioni di addizione 1,4 od ossidazione degli stessi gruppi), reagendo con i substrati o con i cofattori, producendo H₂O₂ durante l'ossidazione dei polifenoli, od, infine, tramite legami non specifici con gli stessi enzimi.

6.2 Biosintesi e metabolismo dei composti fenolici

6.2.1 Il metabolismo fenilpropanoidico

I fenilpropanoidi rappresentano un gruppo molto numeroso di prodotti naturali, derivati dall'acido shikimico, tra i quali le classi di composti più importanti sono gli acidi idrossicinnamici e le cumarine. Il metabolismo fenilpropanoidico comprende una sequenza di reazioni che porta alla formazione di derivati attivati dell'acido cinnamico a partire da fenilalanina e/o tirosina (Figura 2.2.1).

L'enzima chiave di questo pathway biosintetico è la fenilalanina ammonio liasi (PAL), il quale catalizza la deaminazione della L-fenilalanina con conseguente formazione di quantità equimolari di acido *trans*-cinnamico e ione ammonio, il quale fornisce un legame tra metabolismo primario e metabolismo fenilpropanoidico. Lo ione ammonio generato dalla PAL viene incorporato in glutammmina *via* glutammmina sintetasi (GS) e, successivamente, in glutammato *via* glutammmina:2-ossiglutarato ammidotrasferasi (GOGAT). Il glutammato così formatosi funge da donatore di azoto nella biosintesi degli amminoacidi aromatici, in particolare viene utilizzato nella formazione di arogenato a partire da pefenato ed, in seguito, trasformato in fenilalanina e tirosina, viene reimpresso nel metabolismo fenilpropanoidico. In mancanza di un efficiente riciclaggio dello ione ammonio possono osservarsi sintomi di deficienza di azoto e/o di tossicità da ione ammonio. Un enzima analogo alla PAL, la tirosina ammonio liasi (TAL), ritrovato essenzialmente nelle Graminaceae, catalizza in maniera analoga la deaminazione della tirosina con formazione dell'acido *trans*-p-cumarico. La biosintesi dei composti C₆-C₃ ha, quindi, origine a partire da un amminoacido aromatico, la L-fenilalanina o la L-tirosina, e comprende una serie di reazioni in cui, dopo la deaminazione dell'amminoacido, si susseguono una serie di sostituzioni sull'anello aromatico, idrossilazioni e metossilazioni, che portano alla formazione dei vari derivati dell'acido 4-idrossicinnamico (acido p-cumarico).

L'attività PAL è stata purificata e caratterizzata in numerosissime specie vegetali. L'enzima presenta una certa omogeneità nelle diverse preparazioni: l'enzima estratto dalle piante superiori ha un peso molecolare di circa 330.000 Da, più grande di quello estratto da *Streptomyces verticillatus* che ha un peso di 226.000 Da, ed è composto da 4 subunità, probabilmente identiche (PM \cong 83.000 Da). Nel sito attivo, due o quattro per tetramero, è stata identificata una deidroalanina quale costituente essenziale del centro catalitico. Molte preparazioni enzimatiche si sono rivelate in grado di catalizzare l'eliminazione di ammoniaca da diversi derivati o-, m- e p-sostituiti della fenilalanina, inclusa la tirosina. Questi dati hanno sollevato la questione relativa all'esistenza di un unico enzima responsabile di tutte le attività osservate o, alternativamente, di più enzimi responsabili della catalisi nelle diverse reazioni. È stato proposto che PAL e TAL possano essere due distinti enzimi presenti in alcune specie vegetali, ma di fatto non sono stati ritrovati casi di specie vegetali in cui fosse presente la sola attività TAL disgiunta dall'attività PAL. Al contrario, esistono numerosissimi casi di preparazioni enzimatiche in cui è presente la sola attività PAL, pertanto l'unica generalizzazione possibile è che alcune preparazioni di PAL presentano un'attività catalitica nei confronti della tirosina.

Il prodotto della deaminazione della fenilalanina, l'acido *trans*-cinnamico, viene, successivamente, convertito in acido 4-idrossicinnamico sotto l'azione catalitica dell'acido

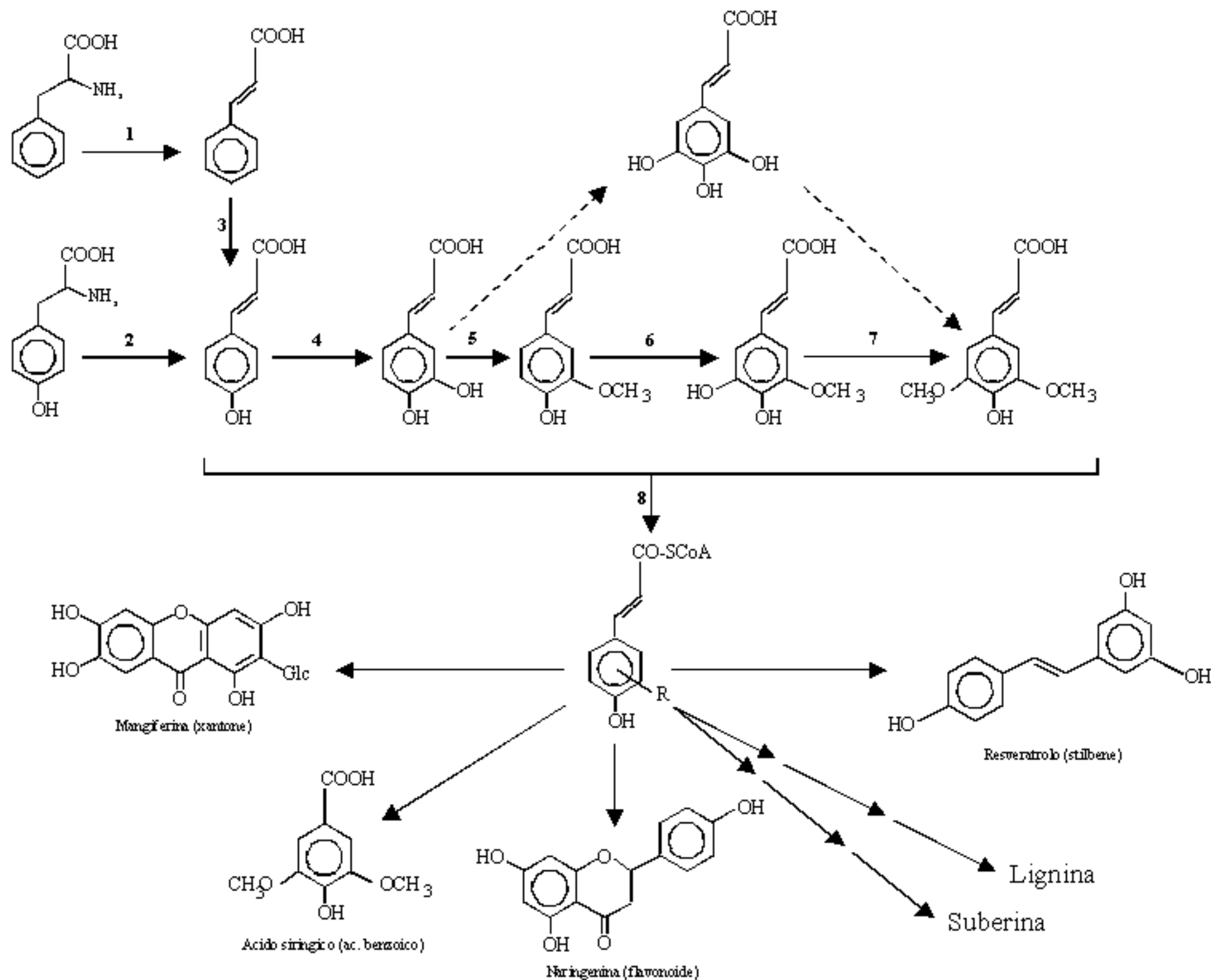


Figura 2.2.1: Metabolismo fenilpropanoidico e principali strutture derivate dagli acidi cinnamici. Gli enzimi sono: **1**= fenilalanina ammonio liasi; **2**=tirosina ammonio liasi; **3**=acido *t*-cinnamico 4-idrossilasi; **4**= *p*-cumarato 3-idrossilasi (fenolasi); **5 e 7**= catecolo *O*-metiltransferasi; **6**=ferulato 5-idrossilasi.

cinnamico 4-idrossilasi (CA4H), un'ossidasi che richiede ossigeno molecolare ed NADPH come cofattori. L'acido p-cumarico, a sua volta, viene convertito nel suo corrispondente derivato attivato, il p-cumaroil-coenzima A tioestere, ad opera di una idrossicinnamato:CoA ligasi (4CL), un enzima con una pronuziata specificità nei confronti dei derivati dell'acido cinnamico caratterizzati dalla presenza di un gruppo -OH libero sull'anello benzenico ed il quale richiede ATP e CoASH come cofattori. Il derivato attivato dell'acido p-cumarico, oltre che da prodotto finale del metabolismo fenolpropanoidico, funge da precursore nella biosintesi di altri composti fenolici.

Oltre alla CA4H, una mono-ossigenasi citocromo P-450-dipendente legata a membrana, che utilizza NADPH come agente riducente mentre il ferro del citocromo si combina con l'O₂ prima che questo si combini con il substrato, nel pathway C₆-C₃ sono coinvolte altre idrossilasi: la cinnamato-2-idrossilasi, un enzima non ben caratterizzato il quale produce acido o-cumarico, ed una fenolasi che catalizza la conversione dell'acido p-cumarico in acido caffeico (acido 3,4-diidrossicinnamico) con l'introduzione di un secondo gruppo -OH in un monofenolo in posizione orto rispetto al gruppo -OH preesistente ed, usualmente, in posizione meta rispetto alla catena laterale di atomi di carbonio (C₃). Quest'ultimo enzima, una mono-ossigenasi contenente rame in grado di accettare equivalenti riducenti da un ampio raggio di donatori di idrogeno, presenta una specificità piuttosto bassa per il substrato ma molto elevata per quanto concerne la posizione dell'idrossilazione. Alcune preparazioni enzimatiche, infatti, sono in grado di catalizzare l'idrossilazione in posizione 3' dei flavonoidi naringenina, diidro Kempferolo e kempferolo, utilizzando come cofattori NADPH ed O₂. Molte fenolasi, inoltre, oltre a partecipare alla reazione di idrossilazione, sono in grado di catalizzare una successiva ossidazione degli orto-difenoli ad orto-chinoni (quest'attività viene chiamata in vari modi a seconda del substrato utilizzato: polifenolossidasi, o-difenolossidasi, DOPA-ossidasi, catecolossidasi, attività catecolasica). L'accumulo dei chinoni può essere soppresso aggiungendo dei riducenti, tra i quali l'acido ascorbico è uno dei più efficaci, in assenza dei quali i chinoni possono subire una serie di reazioni di polimerizzazione.

Altre idrossilasi coinvolte nel pathway fenilpropanoidico sono quelle che portano alla sintesi dell'acido sinapico a partire dall'acido caffeico. La figura 2.2.1 mostra le due vie biosintetiche possibili, l'ossidrilazione dell'acido caffeico e l'ossidrilazione dell'acido ferulico: risultati basati sulla specificità delle metiltransferasi coinvolte in questo pathway fanno ritenere più probabile la via che passa attraverso la metilazione dell'acido 5-idrossiferulico, anche se la via dell'acido triidrossicinnamico non può essere esclusa. Sono state ipotizzate due attività idrossilasiche citocromo P₄₅₀-dipendenti in grado di catalizzare, rispettivamente, l'ossidrilazione dall'acido caffeico ad acido 3,4,5-triidrossicinnamico e l'ossidrilazione dell'acido ferulico ad acido 5-idrossiferulico. Finora, comunque, non sono state identificate inequivocabilmente le proteine responsabili di tali attività. Sono state, invece, identificate un'acido caffeico-O-metiltransferasi (COMT), che utilizza S-adenosilmetionina come donatore di un gruppo metilico, in grado di metilare l'ossidrile in posizione meta dell'acido caffeico con formazione dell'acido ferulico, ed un'analoga O-metiltransferasi (OMT) in grado di catalizzare la metilazione dell'ossidrile in posizione meta dell'acido 5-idrossiferulico con formazione dell'acido sinapico. Queste reazioni di metilazione rivestono una particolare importanza nella biosintesi della lignina: nelle angiosperme sono state identificate O-metiltransferasi in grado di catalizzare la metilazione sia dell'acido caffeico che dell'acido 5-idrossiferulico e, conseguentemente i precursori guaiacilico e siringilico della lignina, mentre la metiltransferasi estratta dalle gimnosperme è attiva con l'acido caffeico e scarsamente attiva con l'acido 5-idrossiferulico. La scarsità di residui siringilici nella lignina delle gimnosperme può essere, pertanto, almeno in parte attribuita alla scarsa affinità di questa metiltransferasi nei confronti del 5-idrossiferulato. Va, infine, detto che queste catecolo-O-metiltransferasi sono degli enzimi distinti da quelli coinvolti nella metilazione dei flavonoidi.

L'ultimo stadio nel metabolismo fenilpropanoidico è l'attivazione dei derivati dell'acido cinnamico con conseguente formazione dei CoA tioesteri. In particolare, i cinnamoil-CoA

tioesteri vengono proposti come precursori nella biosintesi di lignina, flavonoidi, acidi benzoici e vari esteri ed ammidi. Attualmente sono stati identificati almeno due tipi di idrossicinnamato:CoA ligasi: un isoenzima cosiddetto di tipo I, inizialmente identificato in soia, con un'affinità più elevata nei confronti di acido *p*-cumarico, acido ferulico ed acido sinapico, i cui CoA tioesteri sono coinvolti nel pathway della lignina, ed un isoenzima di tipo II, inizialmente purificato da prezzemolo e soia, con una maggiore affinità nei confronti di acido *p*-cumarico ed acido caffeico, implicato nella biosintesi dei flavonoidi. In alcuni casi il numero di isoenzimi isolati è stato più elevato, ma tutte le isoforme presentano caratteristiche di specificità piuttosto differenziate nei confronti del substrato e, pertanto, si ritiene che presiedano a differenti vie biosintetiche.

Molto diffusi nel regno vegetale sono gli esteri dell'acido cinnamico, derivati in cui il gruppo alcolico viene fornito da una grande varietà di composti ossidrilati, inclusi zuccheri, alcoli alifatici ed aromatici ed idrossiacidi. La biosintesi di questi composti coinvolge la partecipazione di derivati attivati dell'acido cinnamico. Ad esempio, l'esterificazione del caffeil-CoA con acido chinico porta alla formazione di acido clorogenico (acido 5-O-caffeilchinico). Questa reazione viene catalizzata da una idrossicinnamoil-CoA:chinato idrossicinnamoil transferasi., un enzima in grado di utilizzare substrato, anche, il *p*-cumaroil-CoA: in effetti l'acido clorogenico può formarsi direttamente da acido caffeico oppure via acido *p*-cumaroilchinico.

Della riduzione del gruppo carbossilico degli acidi cinnamici con formazione dei corrispondenti alcoli, via aldeide, si parlerà in seguito trattando la biosintesi della lignina. Un'altra reazione importante è l'allungamento della catena laterale dei derivati cinnamici tramite reazioni di condensazione, con simultanea liberazione di CO₂, dei derivati attivati dell'acido cinnamico con malonil-CoA. Questo tipo di reazione è coinvolta nella biosintesi, oltre che dei flavonoidi, degli stilbeni e degli xantoni. Al contrario, la degradazione della catena riveste un significato importante nella biosintesi degli acidi benzoici, il cui pattern di sostituzione dell'anello benzenico può riflettere quello del corrispondente acido cinnamico, oppure può essere determinato da reazioni di ossidrilazione e metilazione analoghe a quelle che si verificano nello scheletro degli acidi cinnamici. La formazione degli acidi benzoici può avvenire per allontanamento di una unità acetato ovvero con una sequenza di reazioni analoghe a quelle coinvolte nella β -degradazione degli acidi grassi. Esistono indicazioni che la formazione degli acidi benzoici può partire anche da derivati non-attivati degli acidi cinnamici ovvero direttamente dal pathway dell'acido shikimico per aromatizzazione, ad esempio, dell'acido deidroshikimico (figura 2.2.2).

Altra classe di composti, la cui biosintesi può essere in senso lato collegata al generale metabolismo fenilpropanoico, è quella degli acidi fenilacetici (C₆-C₂) i quali si formano per decarbossilazione ossidativa degli α -chetoacidi derivanti da fenilalanina e tirosina. Infine, le cumarine sono dei composti C₆-C₃ che da un punto di vista strutturale vengono visti come dei derivati lattonici dell'acido *o*-idrossicinnamico e che, fatta eccezione per le fenil-cumarine, vengono considerate un prodotto del metabolismo fenilpropanoico. La formazione dell'anello lattonico a partire dall'acido *trans*-cinnamico viene preceduta dall'introduzione di un gruppo ossidrilico in posizione *orto*, segue una isomerizzazione *trans-cis* del doppio legame α - β nella catena laterale e quindi si verifica un processo di lattonizzazione, il quale avviene spontaneamente, probabilmente con un meccanismo fotochimico catalizzato dal lunghezza d'onda al di sotto dei 360 nm. In molti casi la formazione dell'acido *o*-cumarico viene preceduta dall'introduzione di un ossidrilico in posizione *para*, ricavando in tal modo la serie delle cumarine ossigenate in posizione 7, come nel caso dell'umbelliferone (XIX). Spesso il nucleo cumarinico è caratterizzato dalla presenza di sostituenti ossigenati sia sull'anello lattonico che, molto più spesso, sull'anello benzenico. Allo stato attuale non esistono prove definitive che un tale pattern di sostituzione dell'anello benzenico si possa formare prima della reazione di lattonizzazione, anche se in alcuni casi è stato dimostrato che l'acido ferulico può fungere da precursore della scopoletina (XXI) nel tabacco, presumibilmente in seguito ad una *orto* ossidrilazione analoga a quella che si verifica con l'acido *p*-cumarico, o che l'acido caffeico

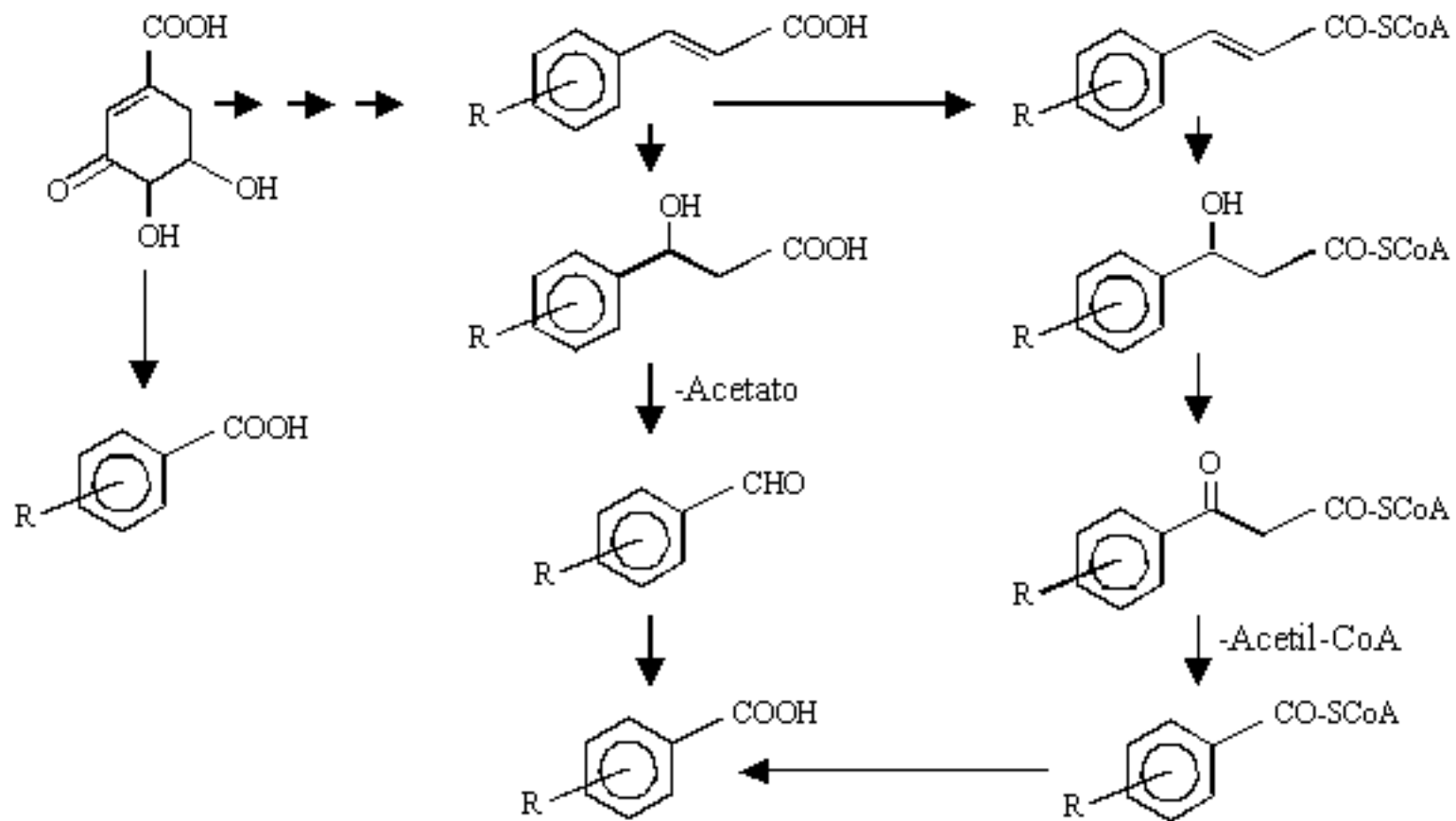


Figura 2.2.2: Vie biosintetiche degli acidi benzoici nelle piante e nei micro-organismi.

possa essere trasformato in esculetina (XX) dall'attività di una fenolasi estratta da *Saxifraga stolonifera*.

6.2.2 Biosintesi dei flavonoidi

Tutti i flavonoidi, normalmente, posseggono uno scheletro base $C_6-C_3-C_6$, composto da una unità C_6 (anello A) e da una unità C_6-C_3 (anello B ed atomi di carbonio 2, 3 e 4). Gli atomi di carbonio all'interno dello scheletro base vengono originati da due distinti pathways. L'anello B, con gli atomi di carbonio 2, 3, e 4, viene fornito da un derivato dell'acido cinnamico, mentre l'anello A è il risultato della condensazione testa-coda di 3 unità acetato. Alcune classi di flavonoidi (calconi, diidrocalconi ed auron) differiscono strutturalmente dal tipico scheletro base che contraddistingue le altre classi di flavonoidi, ma da un punto di vista biosintetico sono strettamente correlate alle altre classi di flavonoidi. L'enzima chiave nella biosintesi dei flavonoidi catalizza la formazione dello scheletro C_{15} dei flavonoidi a partire da malonil-CoA e p-cumaroil-CoA (derivato attivato dell'acido p-cumarico). I precursori dei flavonoidi derivano entrambi dai carboidrati: il malonil-CoA si forma a partire da acetil-CoA e CO_2 , una reazione catalizzata da acetil-CoA carbossilasi (ACC), il p-cumaroil-CoA e gli analoghi esteri idrossicinnamici del CoA vengono forniti dal metabolismo fenilpropanoico. Il prodotto di questa condensazione dovrebbe essere un calcone, mentre normalmente si è osservato l'accumulo del flavanone naringenina: pertanto, l'enzima chiave di questo primo step nella biosintesi dei flavonoidi è stato chiamato, in un primo tempo, flavanone sintasi (FS). Una tale conclusione non è, comunque, coerente con i risultati di alcuni esperimenti fatti con l'ausilio di calconi marcati, nè è in grado di spiegare il ruolo di un altro enzima coinvolto nella biosintesi dei flavonoidi, la calcone isomerasi (CHI). Ulteriori ricerche condotte con l'ausilio di mutanti di fiori di *Callistephus chinensis* e di *Dianthus caryophyllus*, che accumulano il calcone a spese di antocianine ed altri flavonoidi, hanno dimostrato che: i) il primo prodotto nella biosintesi dei flavonoidi è un calcone, ii) la CHI catalizza la ciclizzazione del calcone in maniera stereospecifica con conseguente formazione del flavanone.

E', pertanto, la calcone sintasi (CHS) l'enzima chiave nella biosintesi dei flavonoidi. Questo enzima catalizza la condensazione in più stadi di tre unità acetato, derivanti da malonil-CoA, con un opportuno derivato attivato dell'acido cinnamico, normalmente il p-cumaroil-CoA, con conseguente formazione di un calcone, 4,2',4',6'-tetraidrossicalcone, dal quale si originano tutte le strutture dei flavonoidi (Figura 2.3.1). La CHS, in cooperazione con una riduttasi NADPH-dipendente, la polichetide riduttasi (PKR), catalizza anche la formazione del 4,2',4'-triidrossicalcone (6'-deossicalcone = isoliquiritigenina) e del corrispondente 5-deossiflavanone (liquiritigenina), sempre utilizzando malonil-CoA e p-cumaroil-CoA. Sia il tetraidrossicalcone che il 6'-deossicalcone possono essere utilizzati come precursori diretti nella sintesi degli auron. Negli stadi successivi della biosintesi calconi, flavanoni, diidroflavonoli e flavan-3,4-dioli fungono da precursori nella biosintesi degli antociani, mentre i pathways che portano alla formazione di flavoni e flavonoli rappresentano delle ramificazioni degli stadi iniziali della biosintesi dei flavonoidi.

La tipica struttura dei flavonoidi si forma in seguito ad una conversione stereospecifica del calcone a 2S-flavanone (naringenina, liquiritigenina), una reazione catalizzata dall'enzima calcone isomerasi (CHI). Il flavanone rappresenta uno dei principali punti di ramificazione nella biosintesi dei flavonoidi. La naringenina (un 5-idrossiflavanone) funge da intermedio per la biosintesi di isoflavoni, flavoni, diidroflavonoli e flavan-4-oli. La liquiritigenina (un 5-deossiflavanone) funge da precursore nel pathway degli isoflavoni, mentre resta da dimostrare la sua conversione in altri 5-deossiflavanoidi (flavonoidi mancanti dell'ossidrilico sul C_5 , particolarmente comuni nelle Leguminosae).

La formazione degli isoflavoni a partire dai flavanoni coinvolge il riarrangiamento ossidativo del flavanone, comprendente uno shift (migrazione) 2 \rightarrow 3 del gruppo arilico. La reazione viene catalizzata da una 2-idrossiflavanone sintasi (IFS), in cooperazione con una deidratasi che elimina una molecola di acqua. Substrati della IFS possono essere sia i 5-idrossiflavanoni che i

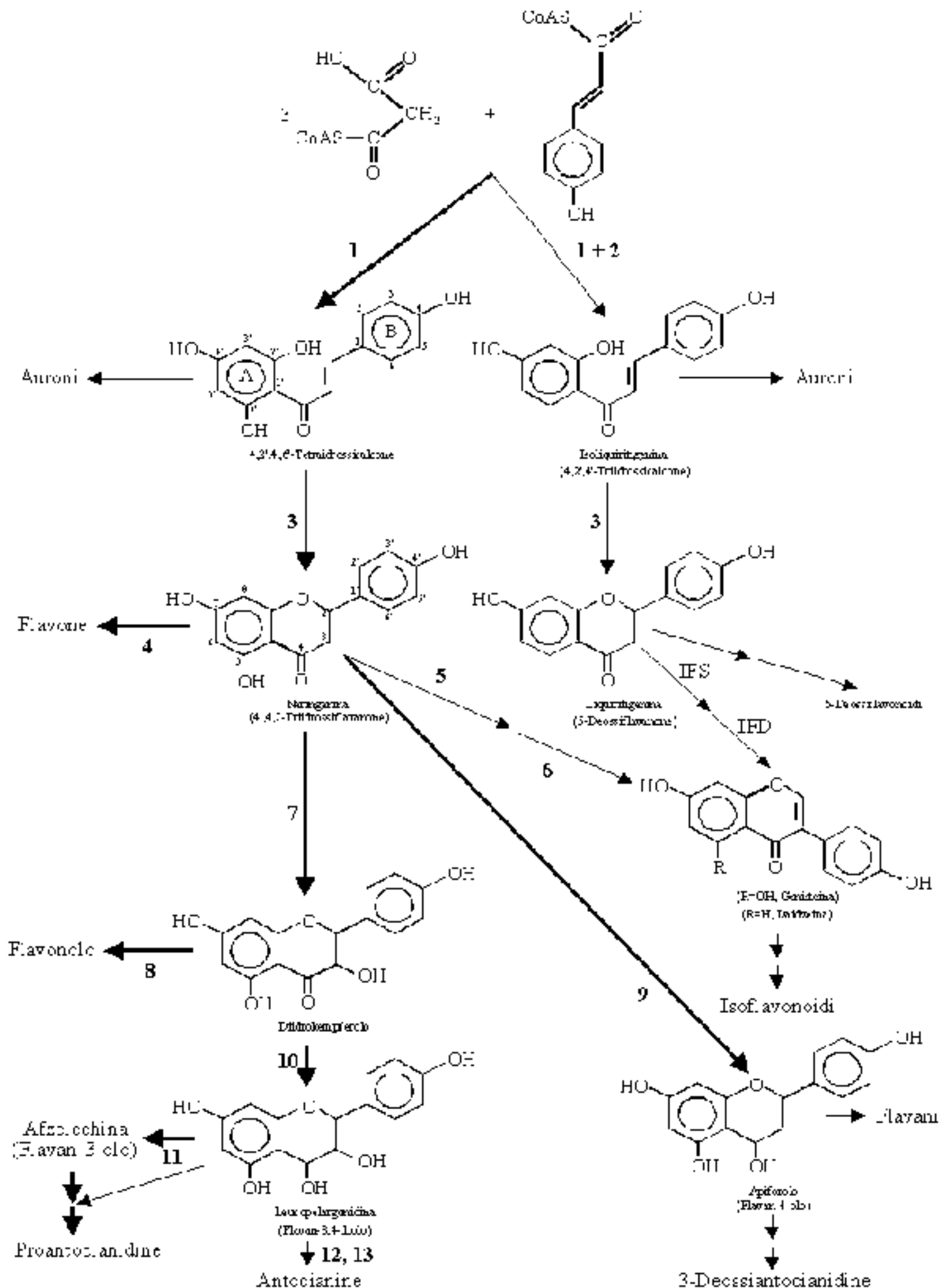


Figura 2.3.1: Rappresentazione schematica della biosintesi delle principali classi di flavonoidi. Gli enzimi sono: **CHS**=calcone sintasi; **PKR**=policetide riduttasi; **CHI**=calcone isomerasi; **FNS**=flavanone sintasi; **IFS**=2-idrossiflavanone sintasi; **IFD**=2-idrossiflavanone deidratasi; **F3H**=flavanone 3-idrossilasi; **FLS**=flavonolo sintasi; **FNR**=flavanone 4-reduttasi; **DFR**=dihydroflavonolo 4-reduttasi; **LAR**=leucoantocianidina (flavan-3,4-diolo) 4-reduttasi; **ANS**=antocianidina sintasi; **FGT**=flavonoide 3-O-glucosiltransferasi.

5-deossiflavanoni. Genisteina e daidzeina, a loro volta, sono intermedi nella biosintesi di tutti gli altri isoflavonoidi, inclusi i pterocarpani.

L'introduzione di un doppio legame tra il C₂ ed il C₃ del flavanone porta alla formazione dei flavoni, una classe di flavonoidi quantitativamente molto importante nei tessuti vegetali. La reazione viene catalizzata da due differenti flavone sintasi (FNA I ed FNS II), la prima ritrovata in colture cellulari di prezzemolo richiede come cofattori 2-ossiglutarato, Fe⁺⁺ ed ascorbato, la seconda, FNS II; richiede per esplicare la sua azione catalitica NADPH ed ossigeno molecolare ed viene ritrovata comunemente negli altri tessuti vegetali.

L'idrossilazione del flavanone sul C₃ porta alla formazione dei diidroflavonoli, una reazione catalizzata dalla flavanone-3-idrossilasi (FHT), che, analogamente alla FNS I, è una diossigenasi 2-ossiglutarato-dipendente. I diidroflavonoli sono i substrati diretti nella sintesi dei flavonoli, catalizzata da una flavonolo sintasi (FLS), ancora una diossigenasi 2-ossiglutarato-dipendente, e dei flavan-3,4-dioli (leucoantocianidine), nonché intermedi nella formazione di catechine (flavan-3-oli), proantocianidine (dimeri ed oligomeri di flavan-3-oli) ed antocianidine. La riduzione stereospecifica in posizione 4 dei diidroflavonoli, catalizzata da una diidroflavonolo-4-riduttasi (DFR) con NADPH come cofattore, porta alla formazione delle leucoantocianidine. Un enzima analogo alla DFR, la flavanone-4-riduttasi (FNR) catalizza la riduzione NADPH-dipendente del gruppo carbonilico in posizione 4 del flavanone con conseguente formazione dei flavan-4-oli, un tipo di leucoantocianidine, che costituiscono i precursori immediati di apigeninidina e luteolinidina, delle 3-deossiantocianidine rispettivamente di colore giallo-arancio e arancio-rosso. Le leucoantocianidine sono i precursori immediati nella sintesi di catechine e proantocianidine. Le catechine vengono prodotte in seguito ad una reazione di riduzione in posizione 4 della leucoantocianidina catalizzata da una leucoantocianidina-4-riduttasi (LAR). Esistono, infine, prove evidenti che le leucoantocianidine sono dei precursori nella sintesi delle antocianine. È possibile che, nell'ambito di una sequenza di reazioni ancora da elucidare, una diossigenasi introduca un doppio legame tra il C₂ ed il C₃ della leucoantocianidina. Il composto risultante, il 2-flaven-3,4-cis-diolo, può isomerizzare a formare un composto termodinamicamente più stabile, il 3-flaven-2,3-diolo, che probabilmente si disidrata spontaneamente formando l'antocianidina. La glicosilazione in posizione 3 dell'antocianidina, o di un suo intermedio, dovrebbe essere parte integrante della sequenza completa di reazioni, in quanto le comuni antocianidine sono instabili nelle normali condizioni fisiologiche della cellula vegetale.

Agli enzimi finora citati vanno aggiunti numerosi altri enzimi, i quali catalizzano delle reazioni che portano ad una modificazione dello scheletro base dei flavonoidi: reazioni di idrossilazione, glicosilazione, acilazione, importanti nel conferire caratteristiche di stabilità ed idrofilicità alle molecole, mentre reazioni di metilazione e prenilazione, conferiscono ai flavonoidi caratteristiche di lipofilicità ed attività antimicrobica. In questo contesto una questione molto dibattuta è stata: in quale stadio viene definito il pattern di sostituzione dell'anello B. Esistono due possibilità: incorporazione dei sostituenti a livello di derivato dell'acido cinnamico prima della formazione dello scheletro C₁₅, ovvero determinazione del pattern di sostituzione a livello di C₁₅, che è l'ipotesi attualmente prevalente, mentre la produzione di flavonoidi con un alto grado di sostituzione nell'anello B derivante dal corrispondente derivato cinnamico è una via secondaria osservata soltanto in poche specie vegetali. L'introduzione di gruppi -OH in 3' e 5' viene catalizzata da specifiche ossigenasi, flavonoide 3'-idrossilasi (F3'H) e flavonoide-3',5'-idrossilasi (F3',5'H), che utilizzano flavonoidi come substrato. La successiva metilazione di questi ossidrili viene catalizzata da specifiche metiltrasferasi. Quanto sopra porta, quindi, alla conclusione che il p-cumaroil-CoA rappresenta il principale substrato fisiologico per la reazione catalizzata da CHS, il cui prodotto sono dei 4'-idrossi flavonoidi.

Negli ultimi anni sono stati fatti notevoli progressi nell'elucidazione della biosintesi dei flavonoidi. Restano, però, ancora da chiarire alcuni aspetti relativi agli ultimi stadi della sintesi delle antocianine, alla sintesi dell'epicatechina e delle proantocianidine ed, infine, relativamente alla sintesi di alcune classi di flavonoidi numericamente meno consistenti, quali auron e

diidrocalconi. Restano, infine, da chiarire anche alcuni aspetti relativi alla localizzazione subcellulare dei flavonoidi ed al meccanismo con cui i flavonoidi vengono trasportati nel vacuolo.

6.2.4 Turnover e degradazione dei fenoli

I composti fenolici non debbono essere considerati dei semplici prodotti di stoccaggio metabolicamente inattivi, i quali si accumulano nelle cellule vegetali durante l'intero ciclo vitale della pianta, ma sono soggetti ad un turnover relativamente rapido e ad un processo di degradazione. Ciò implica che vari composti fenolici presenti nei semi o nelle plantule scompaiono del tutto al termine del processo di germinazione e che fasi di rapida crescita si accompagnano a sostanziali variazioni qualitative e/o quantitative della composizione della frazione fenolica. Quest'ultimo aspetto viene determinato non soltanto da fenomeni di tipo catabolico ma anche dalle relative velocità dei processi di sintesi e turnover. Pertanto, il metabolismo fenolico all'interno della pianta deve essere visto come un sistema dinamico che coinvolge delle concentrazioni di equilibrio dei prodotti finali dei vari step metabolici. Il turnover dei composti fenolici viene determinato da quattro tipi di reazioni: reazioni di interconversione coinvolte nelle sequenze biosintetiche, reazioni di coniugazione, reazioni cataboliche e reazioni ossidative, che portano alla formazione di polimeri insolubili ad elevato peso molecolare. La velocità delle reazioni di sintesi e turnover dei fenoli varia in funzione dello stadio fisiologico, della stagione e delle condizioni pedoclimatiche dell'ambiente.

Le reazioni di interconversione rappresentano degli stadi del processo biosintetico nel corso dei quali un particolare composto, che apparentemente sembra accumularsi in quantità apprezzabili, funge da intermedio biosintetico. Le reazioni di coniugazione sono importanti in quanto alterano in maniera drastica le proprietà chimico-fisiche (solubilità, valori di pK) e fisiologiche (attività biologica, trasporto attraverso cellule e membrane) dell'aglicone, permettono il trasporto dell'aglicone nel sito di accumulo grazie all'aumentata solubilità, fanno sì che il prodotto risultante possa entrare in un pathway metabolico differente da quello cui partecipa l'aglicone, determinano, infine, la misura in cui un dato composto può essere convertito in un prodotto di detossificazione metabolicamente inattivo. Nelle piante vengono sintetizzate grosse quantità di acidi cinnamici, i quali fungono sia da precursori di altre classi di composti fenolici (cfr biosintesi) che da prodotti finali di uno stadio biosintetico i quali si accumulano come esteri, ammidi o, meno frequentemente, come glicosidi. Le reazioni di coniugazione dei composti fenolici possono realizzarsi sia partendo dal cinnamil-CoA tioestere che da un diverso derivato attivato dell'acido cinnamico, l'1-O-cinnamil glucosio. La formazione di quest'ultimo viene catalizzata da una glucosiltrasferasi UDP-glucosio dipendente, analoga alle glucosiltrasferasi coinvolte nella biosintesi dei flavonoidi. Una interessante caratteristica delle reazioni catalizzate dalla glucosiltrasferasi è la loro reversibilità, un aspetto che può svolgere un ruolo molto importante nel turnover dei derivati fenilpropanoidici consentendo l'immagazzinamento di energia in forma di UDP-glucosio.

La maggior parte delle sostanze fenoliche sono presenti in natura in forma coniugata, principalmente con residui zuccherini legati ad uno o più residui fenolici. I monosaccaridi comunemente associati ai fenoli sono glucosio, ramnosio, galattosio, arabinosio, mannosio, apiosio e gli acidi glucuronico e galatturonico. Un ulteriore elemento di complessità è costituito dal fatto che questi zuccheri possono legarsi agli agliconi fenolici sotto forma di di-, tri- e tetrasaccaridi. I derivati dell'acido cinnamico presentano una varietà di forme coniugate più ampia di qualsiasi altra classe di sostanze fenoliche. Essi, infatti, oltre che a zuccheri, possono ritrovarsi legati all'acido chinico, ad acidi organici (malico e tartarico), ad ammine (triptamina, putrescina, lupinina) a lipidi ed a terpenoidi (borneolo). In alcuni casi possono ritrovarsi legati con un legame estere ad altre sostanze fenoliche od al residuo zuccherino dei glicosidi flavonoidici, oppure formare un legame pseudopeptidico in cui il gruppo carbossilico dell'acido ferulico si lega all'-NH₂ dell'amminoacido N-terminale di una catena polipeptidica. Nel caso dei flavonoidi gli zuccheri possono legarsi all'aglicone tramite i gruppi fenolici (O-

glicosidi) oppure legarsi direttamente all'atomo di carbonio dell'anello aromatico in posizione 6 e/o 8 (C-glicosidi). Altre forme coniugate dei flavonoidi sono i glicosidi con lo zucchero acilato con acidi alifatici od aromatici, ed i solfati, i più diffusi sono basati sulla struttura dei flavoni piuttosto che dei flavonoli, con il gruppo bisolfato legato all'-OH fenolico (O-solfati). Quest'ultimo tipo di coniugazione sembra non essere limitata esclusivamente ai flavonoidi e sembra svolgere un ruolo nell'assorbimento e nel metabolismo degli ioni inorganici, nonché nel sequestro di cationi come il potassio.

Il tipo di coniugazione influenza le caratteristiche di solubilità dei composti fenolici, che possono ritrovarsi in una forma solubile od in una forma legata insolubile. Questo è particolarmente vero per gli acidi idrossicinnamici, che si ritrovano come composti idrofili a basso peso molecolare associati ai vacuoli, in una forma solubile lipofila associata alla superficie dei tessuti vegetali, all'interno di materiale ceroso e di essudati, od, infine in una forma legata, esterificata all'interno della parete cellulare a formare legami incrociati tra i costituenti polisaccaridici della matrice in modo da insolubilizzarli. Recentemente si è osservato che anche i flavonoidi, oltre che nei vacuoli, nelle cere fogliari e negli essudati delle gemme, possono ritrovarsi associati alle pareti cellulari, almeno nei tessuti delle gimnosperme.

Le reazioni di coniugazione dei composti fenolici, mascherandone i gruppi reattivi e realizzando una compartimentalizzazione cellulare di queste sostanze, hanno un importante significato fisiologico in quanto impedisce che i fenoli liberi possano interagire con gli altri costituenti cellulari, in particolare con gli enzimi, nei confronti dei quali molte sostanze fenoliche esplicano un'attività inibitrice. Ad esempio, la glicosilazione dei flavonoidi aumenta la solubilità e, quindi, la mobilità di questi composti favorendo così il loro accumulo nel vacuolo, cioè in una forma ed in un sito dove non possono interferire con i processi enzimatici vitali del metabolismo cellulare. La stessa reazione ha un significato funzionale nel caso di quei flavonoidi che contribuiscono alla colorazione dei tessuti florali, in quanto produce variazioni significative del colore dei fiori. Ma, più in generale, la glicosilazione influisce su tutte le attività fisiologiche correlabili ai flavonoidi ed alle altre classi di sostanze fenoliche. Va, infine, citato il significato ecologico della coniugazione, ricordando, ad esempio, che il ruolo svolto da alcune classi di sostanze fenoliche nei meccanismi di difesa delle piante nei confronti di microrganismi (funghi, batteri e virus) e di insetti dipende, oltre che dalla struttura dell'aglicone, anche dal tipo di glicosilazione. Od ancora, che fenoli semplici ed acidi fenolici, poco diffusi nei tessuti vegetali, nella forma legata solubile, a causa della loro fitotossicità, quando vengono rilasciati nell'ambiente in forma libera dai tessuti vegetali possono esercitare un'attività inibitoria sulla germinazione dei semi e sulla crescita delle piante presenti nel suolo circostante.

Spesso i composti fenolici si ritrovano nei tessuti vegetali in una forma insolubile in alcol legati ad una matrice proteica o polisaccaridica, in seguito a reazioni di polimerizzazione ossidativa catalizzate da perossidasi o polifenolossidasi. La polifenolossidasi, o catecolo ossidasi, è un enzima contenente rame che catalizza due distinte reazioni: l'introduzione di un gruppo ossidrilico in posizione *orto* rispetto ad un gruppo ossidrilico preesistente, reazione che richiede ossigeno molecolare ed un donatore di di elettroni (attività cresolasica), e l'ossidazione dell'*orto*-difenolo ad *orto*-chinone ad opera di ossigeno molecolare (attività catecolasica). L'enzima che catalizza l'ossidazione dei *para*-difenoli a *para*-chinoni viene, convenzionalmente, chiamato laccasi. Le perossidasi sono enzimi che catalizzano differenti reazioni (con o senza H₂O₂, con o senza ossigeno) che vanno dall'ossidazione di substrati con acqua ossigenata (reazioni perossidasiche) all'introduzione di ossigeno in un substrato (reazione ossigenasica), al trasferimento di elettroni (reazione ossidasica), alla transalchilazione ed, infine, all'alogenazione. Le reazioni di polimerizzazione ossidativa danno spesso conto della scomparsa di alcuni metaboliti senza che si osservi una conseguente formazione od accumulo di altri metaboliti. La formazione dei polimeri dipende dal pattern di sostituzione dell'anello benzenico. Ad esempio, isoflavonoidi con un gruppo -OH in posizione 4' oppure con due ossidrilici in posizione 3', 4' sull'anello B polimerizzano facilmente, mentre la presenza di un metossile in 4' o di due ossidrilici in posizione 6,7 non dà luogo alla formazione di polimeri.

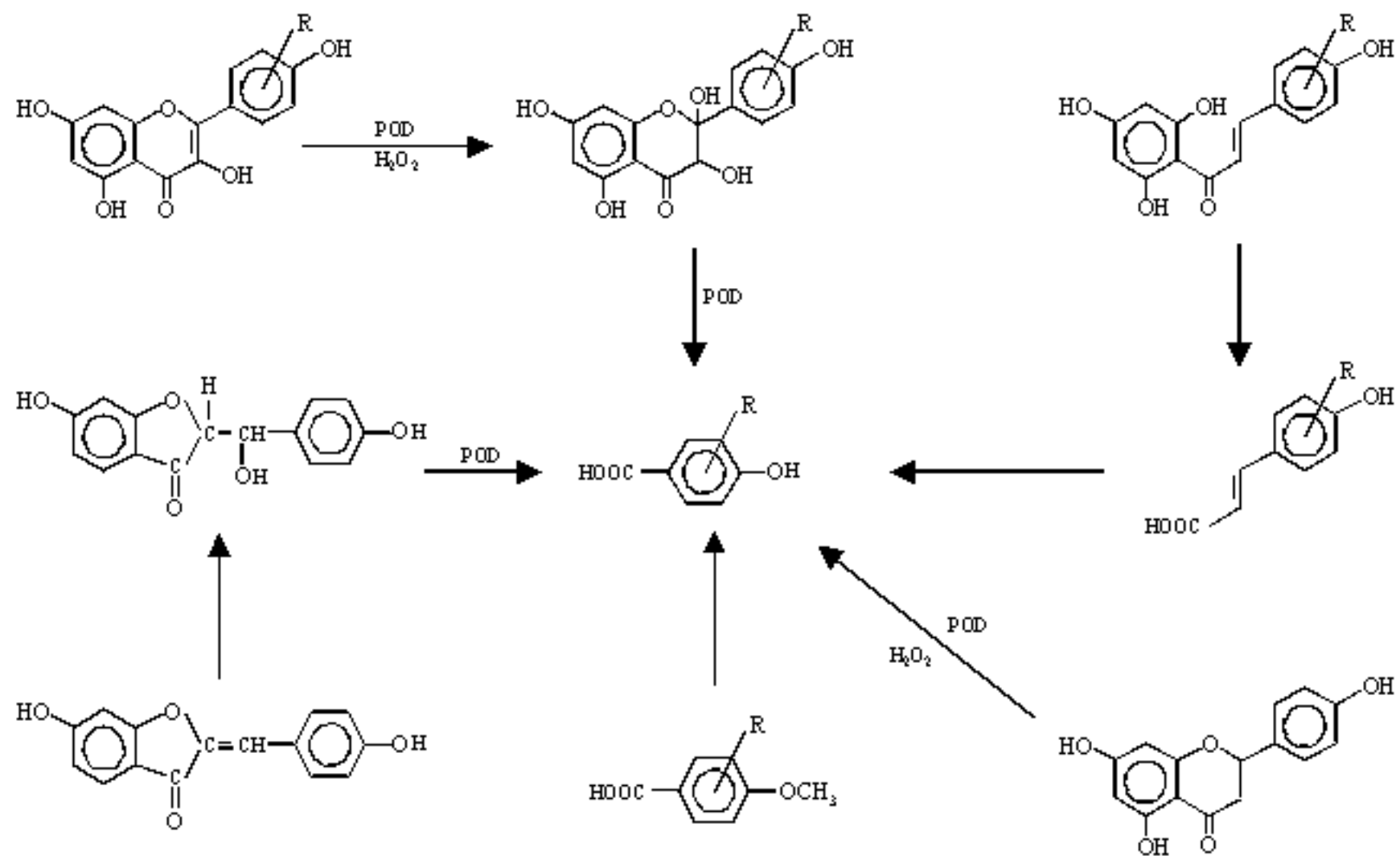


Figura 2.4.1: Metabolismo degradativo di flavonoidi, acidi cinnamici ed acidi *p*-metossibenzoici.

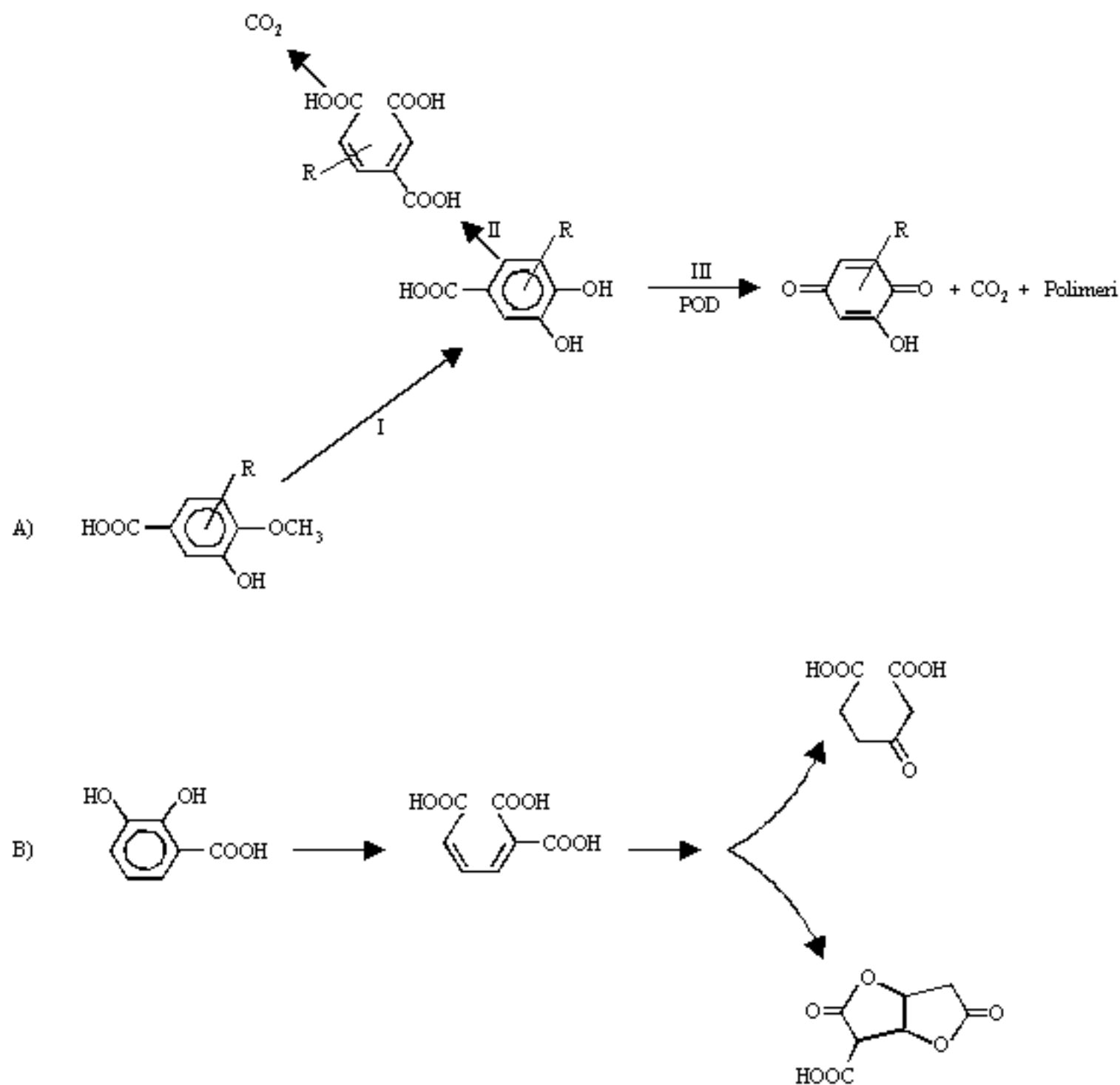


Figura 2.4.2: Catabolismo degli acidi benzoici. **A:** Reazioni di *p*-O-demetilazione (I), di fissione degli 1,2-difenoli (II) e di decarbossilazione perossidativa degli acidi *p*-idrossibenzoici (III). **B:** Via dell'acido β -ossi-adipico nel catabolismo dell'acido 2,3-diidrossibenzoico.

Queste reazioni di polimerizzazione possono essere considerate parte integrante del meccanismo di detossificazione dei composti fenolici all'interno della cellula. Il sito preferito di queste reazioni di polimerizzazione sembrano essere la parete cellulare ed il sistema di membrane, in quanto la presenza di polisaccaridi e/o proteine fornisce la matrice sulla quali i polimeri possono formarsi.

Infine, va considerata la capacità delle piante superiori di degradare i composti fenolici attraverso una serie di reazioni che vanno dall'ossidrilazione, alla O- ed N-dealchilazione, alla rottura dei legami C-C, all'idrolisi ed alla fissione dell'anello aromatico. Esperimenti condotti con varie classi di flavonoidi, flavonoli, flavanoni, calconi ed auronni, hanno mostrato che tutte queste strutture in presenza di perossidasi vengono degradate, liberando l'anello B sotto forma del corrispondente derivato benzoico (figura 2.4.2), il quale, a sua volta, può essere ulteriormente degradato. La degradazione dei flavonoli procede attraverso un primo stadio che vede l'aggiunta di ossigeno al doppio legame 2,3, con conseguente formazione di 2,3-diidrossiflavanoni. Successivamente si ha la rottura dell'anello centrale e la formazione di un derivato cinnamico, successivamente degradato a derivato benzoico, proveniente dall'anello B e di un derivato del floroglucinololo, un catabolita dell'anello A. Questa sequenza di reazioni, che richiede gruppi ossidrilici liberi in posizione 3' e 4', viene catalizzata da perossidasi in presenza di H₂O₂ e porta alla produzione finale di CO₂ e di numerosi cataboliti derivanti dagli anelli A e B e dagli atomi di carbonio 2 e 3, la cui struttura non è stata completamente chiarita. Anche i flavanoni vengono degradati da perossidasi in presenza di acqua ossigenata con una sequenza di reazioni che vede tra i vari prodotti intermedi l'acido p-cumarico, il 5,7-diidrossicromone e la CO₂, derivante sia dall'anello A che dagli atomi di carbonio 1 e 2. Acido p-cumarico viene prodotto anche in seguito a degradazione dei calconi, i quali nei tessuti vegetali sono interconvertibili con i corrispondenti flavanoni sotto l'azione catalitica della calcione-flavanone isomerasi, successivamente il derivato cinnamico, derivante dall'anello B può essere incanalato nel pathway biosintetico dei flavonoidi oppure viene ulteriormente degradato nel corrispondente acido benzoico.

Fenoli semplici, acidi idrossibenzoici ed acidi cinnamici sono anch'essi soggetti ad un attivo metabolismo nei tessuti vegetali, metabolismo che comprende sia reazioni di polimerizzazione che reazioni di degradazione. La β -ossidazione della catena laterale dei derivati cinnamici viene considerata una via biosintetica degli acidi benzoici, il cui pattern di sostituzione sull'anello benzenico viene determinato a livello di derivato cinnamico. In figura 2.4.3 sono schematizzate alcune delle principali reazioni cataboliche a carico degli acidi benzoici. Le reazioni di demetilazione sono particolarmente importanti nel caso di sostituenti metossilici in posizione para (reazione I), cui può seguire una fissione dell'anello aromatico con produzione finale di CO₂ (reazione II). Gli acidi p-idrossibenzoici possono essere soggetti ad una decarbossilazione ossidativa catalizzata da perossidasi, ed, a seconda del pattern di sostituzione dell'anello aromatico, possono dare origine sia a p-chinoni che a dimeri e polimeri (reazione III). In presenza di un opportuno riducente questa reazione di decarbossilazione potrebbe rappresentare una via biosintetica nella formazione degli idrochinoni. Il meccanismo base della reazione di fissione, dipendente da ossigeno, sia dei meta ed orto diidrossi derivati, che dei para diidrossi derivati si realizza sia nelle piante che nei microorganismi. La reazione B mostra un esempio di fissione dell'anello benzenico con formazione di acido β -ossi-adipico, che è stato ritrovato quale intermedio della degradazione dell'acido 2,3-diidrossibenzoico sia nelle piante che in microorganismi.

6.3 Significato fisiologico ed ecofisiologico

6.3.1 Ruolo fisiologico

La grande variabilità di strutture e la distribuzione non uniforme dei composti fenolici tra le

diverse famiglie vegetali e/o all'interno della stessa famiglia suggerisce che a questa classe di composti non può essere ascritto un unico ruolo fisiologico. Infatti, la presenza di ossidrili fenolici fa sì che i composti fenolici possano reagire con specifici gruppi recettori principalmente per mezzo di legami idrogeno, ma anche con la formazione di esteri, tioesteri ed anidridi, od, infine, partecipando a reazioni di ossidazione, seguite da condensazione covalente. Queste reazioni fanno sì che i composti fenolici svolgano delle precise funzioni fisiologiche all'interno della pianta, che vanno ben al di là di una semplice azione di detossificazione e di accumulo nel vacuolo (in quanto prodotti secondari del metabolismo cellulare), in una forma ed in un sito dove i fenoli non possano interferire con i processi vitali del metabolismo vegetale. Al contrario, i composti fenolici presentano un ampio spettro di attività biologiche, che vengono influenzate dal numero e dalla natura dei gruppi sostituenti presenti sulla struttura base. Così i pigmenti fenolici, oltre a contribuire al colore di fiori e frutti, influenzano l'attrazione degli insetti impollinatori e la dispersione dei semi conseguente all'attrazione esercitata sugli animali erbivori. Sostanze fenoliche, come la vanillina, possono fungere da odori che attirano sui fiori gli impollinatori. I fiori, infatti, rappresentando il sito della riproduzione sessuale nelle piante da fiore, esercitano la loro attrazione sugli impollinatori anche ricorrendo a segnali odorosi, che molto spesso sono costituiti da una complessa miscela di composti appartenenti a diverse classi chimiche. L'analisi di queste miscele ha rivelato la presenza di derivati degli acidi grassi, isoprenoidi, vari composti azotati e solforati, benzenoidi e fenilpropanoidi. Molti fenoli, inoltre, hanno un effetto significativo sui processi di crescita quando vengono esogenamente forniti alla pianta in concentrazioni fisiologiche, anche se ciò non significa necessariamente che le stesse sostanze endogene esercitino lo stesso ruolo. Essi vengono definiti metaboliti secondari nel senso che non possono svolgere un ruolo essenziale nei processi vitali primari all'interno delle cellule, in quanto non sono presenti in tutte le piante (ogni specie vegetale ha un suo caratteristico pattern fenolico).

E' stato suggerito che alcuni composti fenolici possano avere un ruolo nel processo di crescita della pianta agendo, ad esempio, da cofattori enzimatici: l'inibizione dell'enzima acido indolacetico ossidasi (una perossidasi) ad opera di composti o-difenolici ovvero la sua stimolazione ad opera di monofenoli suggerisce un'interazione tra composti fenolici ed azione ormonale, anche se *in vivo* quest'azione richiede ulteriori approfondimenti. Oltre che come cofattori della perossidasi, mono- e diidrossifenoli possano agire da inibitori del trasporto polare dell'auxina attraverso la membrana plasmatica legandosi ad una proteina di membrana, nota come recettore dell'acido naftilftalamico (NPA). E' stato, infatti, sperimentalmente dimostrato che molti flavonoidi, tra cui quercetina, kempferolo ed apigenina, comunemente presenti nei tessuti vegetali e con particolari requisiti strutturali inibiscono il trasporto dell'auxina non competendo direttamente con l'ormone ma legandosi allo stesso recettore dell'NPA. Poichè i fenoli attivi sono ampiamente diffusi nel mondo vegetale ed esercitano il loro effetto a concentrazioni micromolari, molto simili a quelle naturalmente esistenti nei tessuti vegetali, si ritiene che essi possano agire da regolatori naturali del trasporto polare delle auxine. Inoltre, la presenza di acidi idrossicinnamici, in particolare acido ferulico ed acido p-cumarico, come costituenti delle pareti cellulari di varie monocotiledoni e di alcune dicotiledoni legati a polisaccaridi della matrice, oltre a fornire precursori per la biosintesi della lignina, può influenzare il processo di espansione cellulare. Ad esempio, le pareti cellulari primarie isolate da colture cellulari di spinacio in fase di rapido accrescimento rivelano la presenza di acido ferulico ed acido cumarico, i quali formano legami esteri con i loro gruppi -COOH esterificati con residui di galattosio ed arabinosio della matrice polisaccaridica. L'accoppiamento ossidativo, catalizzato da perossidasi, di questi residui fenolici porta alla formazione di legami incrociati (spesso sono stati identificati dimeri dell'acido ferulico) tra catene adiacenti della matrice polisaccaridica, legami che influenzano notevolmente le caratteristiche di solubilità ed estensibilità della parete cellulare. La GA₃ nelle stesse colture cellulari si è rivelata efficace nel promuovere l'espansione cellulare e, contemporaneamente, nell'inibire il rilascio dei perossidasi da parte della cellula: Pertanto le cellule trattate con gibberellina risultano meno rigide in

quanto la perossidasi non è più in grado di catalizzare la formazione di ponti diferulato all'interno della parete.

Molto spesso si è riscontrato che diverse classi di sostanze fenoliche endogene agiscono da inibitori della crescita, probabilmente, a causa della loro particolare reattività che li porta ad interagire con enzimi e metalli. Ricerche sulla natura chimica del β -inibitore o della dormina (come sono state di volta in volta definite la sostanza od il gruppo di sostanze in grado di indurre la dormienza in gemme, semi ed organi di riserva) ha portato spesso all'identificazione di diverse strutture fenoliche, quali cumarina, acido salicilico, acido ferulico, acido o-cumarico ed acido m-idrossibenzoico. La presenza di questi composti nei tegumenti e negli embrioni di molti semi pone, quindi la questione se queste sostanze possono agire da regolatori naturali della germinazione. Si è osservato, ad esempio, che semi di *Melilotus alba* non in grado di germinare contengono quantità elevate di cumarina libera: l'allontanamento o la degradazione della cumarina fa scomparire l'effetto inibitore. Molte delle informazioni relative all'attività inibitrice delle sostanze fenoliche provengono da esperimenti in cui si valuta l'effetto della loro applicazione esogena alla pianta od a parti di pianta, od in cui si modificano le condizioni ambientali e si correla la risposta della pianta al livello di fenoli endogeni. Molto studiato è l'effetto delle sostanze fenoliche sulla germinazione dei semi: composti appartenenti alle classi dei fenoli semplici, degli acidi fenolici, degli acidi cinnamici, delle cumarine e dei flavonoidi possono funzionare da inibitori del processo di germinazione. Spesso si è, comunque, osservato che una stessa sostanza, come ad esempio la cumarina o l'acido ferulico, funziona da inibitore o da stimolatore a seconda della concentrazione usata. Inoltre, l'effetto osservato per un composto aggiunto esogenamente non porta automaticamente a concludere che quella sostanza possa essere considerata un regolatore del processo di germinazione, in quanto, oltre a valutarne la presenza all'interno del tessuto vegetale, è necessario che essa sia presente a concentrazioni idonee per indurre l'effetto inibitore. Quest'ultimo aspetto solleva anche la questione del meccanismo con il quale le sostanze fenoliche esplicano la loro attività inibitoria. E' stato suggerito che queste sostanze agiscano da disaccoppianti della fosforilazione ossidativa e che quindi gli inibitori della crescita o della germinazione possano produrre i loro effetti, almeno in parte, riducendo la produzione di ATP. Il fatto che alcune sostanze come l'acido caffeico siano in grado di agire da disaccoppianti ma nello stesso tempo stimolano il processo di germinazione ovvero che inibitori della germinazione, come la cumarina e l'acido ferulico, non abbiano alcun effetto sulla fosforilazione ossidativa, suggerisce che non è questo l'unico meccanismo da prendere in esame. E' possibile che l'attività inibitoria di alcune sostanze fenoliche si esplichi tramite una inibizione del trasporto di amminoacidi e della formazione di proteine nel seme.

Un altro ruolo proposto per questi acidi idrossicinnamici esterificati all'interno della parete cellulare è quello legato alla natura del fotorecettore(i) della luce UV-A e della luce blu ed al meccanismo di trasduzione del segnale luminoso nelle risposte fototropiche delle piante superiori. Le pareti cellulari di coleoptili eziolati di graminacee contengono residui fenolici esclusivamente in forma trans. L'esposizione alla luce di tali coleoptili induce una fotoisomerizzazione trans/cis, un fenomeno reversibile in cui la proporzione tra le due forme isomeriche dipende dalla qualità della radiazione luminosa. 15 minuti di esposizione di coleoptili di orzo a radiazioni UV-A porta ad uno stato di equilibrio con un rapporto tra gli isomeri trans e quelli cis pari a 1 : 0,4. Variazioni nella geometria di una significativa popolazione di molecole presenti nella parete cellulare possono alterarne la struttura e, conseguentemente, influenzare la pressione di turgore ed il flusso di acqua, influenzando in tal modo il processo di crescita. Gli acidi idrossicinnamici non assorbono la luce blu (400-450 nm), ma in tal caso la loro isomerizzazione potrebbe realizzarsi per trasferimento di energia dallo stato eccitato di tripletto di un opportuno fotorecettore della luce blu (carotenoide o flavina) al derivato cinnamico.

Ancora, studi molto recenti hanno dimostrato il coinvolgimento di alcuni composti fenolici nei movimenti nastici delle foglie, cioè quei movimenti indotti da uno stimolo fisico esterno ma nei quali lo stimolo non determina la direzione del movimento. Ricerche, mirate all'isolamento ad

all'identificazione di composti che attivano i pulvini delle foglie, hanno dimostrato che in *Acacia* due dei cosiddetti *fattori di movimento periodico delle foglie* sono dei β -glicosidi dell'acido gallico (XII), nei quali il legame glucosidico impegna il gruppo ossidrilico in posizione *para*. In estratti di altre piante sono stati identificati parecchi altri composti aventi strutture affini: tra questi derivati dell'acido gallico i più attivi si sono rivelati il β -D-glucoside-6-solfato ed il β -D-glucoside-3,6-disolfato dell'acido gallico. In altre specie, quali l'*Oxalis stricta*, accanto ad un derivato dell'acido gallico è stato identificato un derivato dell'acido 3,4-diidrossi-benzoico. Nella *Mimosa pudica* è stato identificato un glicoside (5-O- β -L-apio-L-furanoside) dell'acido gentisico, il quale è il responsabile della chiusura e del successivo ripiegamento verso il basso delle foglie in risposta ad uno stimolo esterno. E' stato ipotizzato che questi derivati dell'acido gallico, dell'acido 3,4-diidrossi-benzoico e dell'acido gentisico, i quali rappresentano degli esempi di metaboliti secondari che facilitano un movimento fisico, piuttosto che sostituirsi ad esso, formino una nuova classe di ormoni vegetali, denominati turgorine, attivi sulle cellule del pulvino. Questi composti, analogamente agli altri ormoni vegetali, sono attivi a basse concentrazioni (10^{-5} - 10^{-7} M) e, almeno in alcuni casi, soddisfano il criterio della traslocazione. Infine, numerosi dati sperimentali fanno ritenere che i composti fenolici svolgano un ruolo importante nelle interazioni tra la pianta e l'ambiente circostante e che spesso il loro significato debba, quindi, essere visto in relazione ad altri organismi presenti nello stesso habitat. Ad esempio, è stato recentemente osservato che i flavonoidi svolgono un ruolo importante nel processo di azotofissazione nelle piante superiori. Infatti, i batteri appartenenti ai generi *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* ed *Azorhizobium* (chiamati collettivamente rhizobia) rispondono positivamente ad essudati degli apparati radicali della pianta ospite, in particolare, i rhizobia mostrano una forte specificità nei confronti di alcuni flavonoidi rilasciati dalle radici delle leguminose. I flavonoidi presenti negli essudati radicali inducono, in un modo altamente specifico, la trascrizione di un'importante serie di geni batterici della nodulazione (geni *nod*) e questa interazione viene mediata dal *nodD*, l'unico gene *nod* costitutivamente espresso nel batterio. Il prodotto di questo gene, la proteina *NodD* associata alla membrana citoplasmatica del batterio, interagisce con il flavonoide, la molecola segnale prodotta dall'ospite negli essudati radicali: ogni specie di leguminosa essuda un caratteristico spettro di flavonoidi ed ogni proteina *NodD* presente nelle diverse specie di rhizobia riconosce preferenzialmente particolari flavonoidi. Questa ricognizione molecolare è importante nel determinare la specificità ospite-*Rhizobium*, ed allo stesso tempo nell'indurre la trascrizione dei geni *nod*. In una seconda fase del processo di nodulazione si verifica la produzione e la secrezione, indotta dai geni *nod*, da parte del batterio di lipo-oligosaccaridi (*NodRm*), dei segnali molecolari che sono delle forme acilate di piccoli frammenti di chitina in grado di avviare il processo di avvolgimento a spirale del pelo radicale e di divisione cellulare nella corteccia radicale della zona infetta (figura 3.1.1). Alcuni esempi di flavonoidi in grado di agire da segnali molecolari, prodotti dall'ospite nel processo di nodulazione, sono l'eriodictiolo e l'apigenina-7-glucoside, ritrovati in essudati di pisello ed in grado di agire a concentrazioni inferiori a 10 nM, la luteolina ed il crisoiolo (3'-metossi-luteolina), presenti in essudati radicali di erba medica. Altre classi di flavonoidi in grado di agire da segnali molecolari coinvolti nel processo di azotofissazione sono dei flavanoni, quali esperitina, eriodictiolo e naringenina, calconi, nonché alcuni isoflavonoidi, come la daidzeina e la genisteina: è interessante notare che questi ultimi composti si sono rivelati capaci di inibire l'espressione dei geni della nodulazione, ma la concentrazione richiesta per l'inibizione è di due ordini di grandezza più elevata di quella richiesta per l'attivazione.

6.3.2 Significato ecologico

Non c'è motivo di ritenere che alcuni caratteri biochimici della pianta come la presenza di sostanze fenoliche, in generale, e di flavonoidi, in particolare, che sono stati usati dal tassonomo come supporto nella classificazione delle specie, non possano aver avuto, in alcuni casi, un ruolo di adattamento della pianta al fine di attivare una strategia di sopravvivenza nel corso della selezione naturale. Ad esempio si è, spesso, osservato che nel corso del processo di

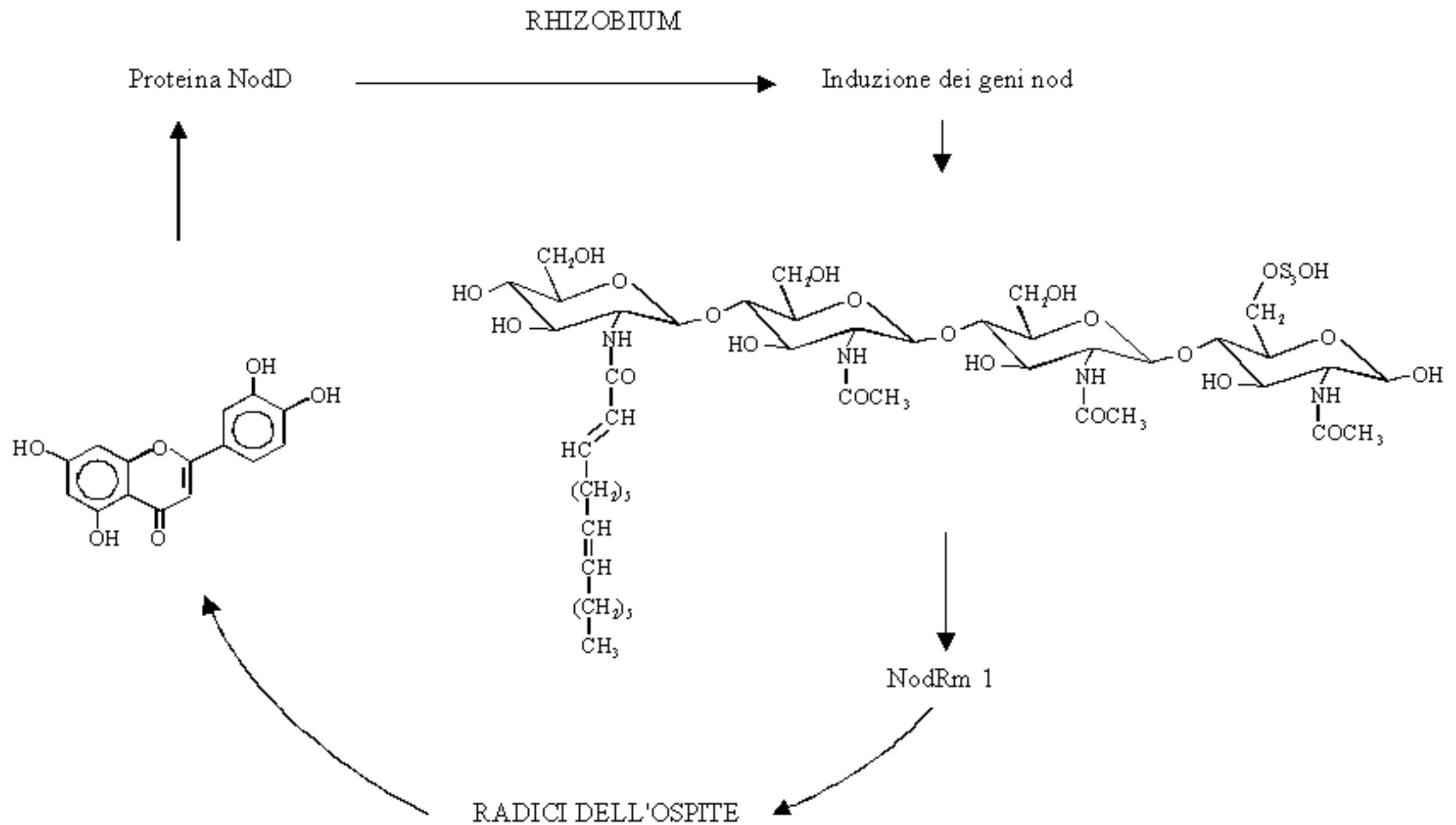


Figura 3.1.1: Segnali molecolari coinvolti nella simbiosi *Rhizobium*-legume: la luteolina secreta dalle radici di alfalfa agisce insieme alla proteina NodD, da co-induttore nella trascrizione di tutti gli altri geni *nod* del batterio che, a loro volta, inducono il processo di nodulazione.

domesticazione delle piante alcuni caratteri morfologici (pubescenza, presenza di spine, durezza ed ispessimento dei tessuti, etc.), legati alle caratteristiche di resistenza nei confronti di insetti ed erbivori, si perdono e che nello stesso tempo la pianta sintetizza particolari metaboliti secondari che le conferiscono delle chances di sopravvivenza nel corso del processo evolutivo. Ciò non significa che tutti i metaboliti secondari abbiano svolto questo ruolo nelle piante che li hanno sintetizzati né che un particolare composto secondario sia rimasto presente in una pianta nel corso dell'evoluzione perchè le conferisce un particolare vantaggio. E', anche, possibile che tale presenza sia dovuta al fatto che il gene o la famiglia di geni, che codificano questo composto, siano strettamente associati sullo stesso cromosoma con i geni che determinano un altro carattere che risulta essere più vantaggioso per la pianta nel processo di selezione. Si è, comunque, osservato che le piante sintetizzano una maggiore varietà di metaboliti secondari rispetto agli animali in quanto una pianta, non essendo dotata di una mobilità che le consenta di sfuggire ai suoi predatori, ha dovuto attrezzarsi di una serie di difese chimiche. In genere, il ruolo dei metaboliti secondari nei meccanismi di difesa delle piante è legato alle loro particolari caratteristiche chimico-fisiche, che li rendono, di volta in volta, urticanti, tossici o sgradevoli al palato. Oltre che nelle relazioni pianta-animale, i metaboliti secondari sono anche coinvolti nelle relazioni pianta-pianta come nel caso dello juglone (XXVI), un pigmento di natura chinonica che, liberato in forma di precursore inattivo dal noce, a seguito di un processo ossidativo diventa un potente inibitore della crescita di molte specie di piante.

D'altra parte se non è di semplice interpretazione il fatto che, ad esempio, nel corso del processo evolutivo le angiosperme più avanzate abbiano sostituito un glicoside di un flavonolo con un glicoside di un flavone, può essere più facilmente comprensibile il fatto che, passando da una pianta legnosa ad una specie erbacea, composti quali i tannini (ellagitannini, ma, soprattutto, proantocianine) siano stati sostituiti, in qualità di agenti antifungini, da flavonoidi più evoluti, i quali vengono prodotti dai tessuti vegetali soltanto dopo che il processo infettivo si è instaurato (fitoalessine). E' possibile, comunque, ipotizzare che la capacità di sintetizzare determinate classi di sostanze fenoliche, da parte di un particolare organismo vegetale, sia da mettere in relazione al significato ecologico che tali sostanze possono rivestire. Ad esempio, un vantaggio per gli organismi vegetali derivante dalla presenza delle sostanze fenoliche è quello riconducibile alle loro caratteristiche spettrali, che fanno sì che esse possano agire da schermo nei confronti delle radiazioni UV nel range critico 230-380 nm. La presenza di sostanze fenoliche nelle cellule epidermiche dei tessuti vegetali è efficace nel prevenire fenomeni di mutagenesi determinati dalla formazione di dimeri pirimidinici, il danno del DNA ($\lambda_{\max} = 260$ nm) indotto dall'esposizione alle radiazioni UV-B (320-280 nm) ed UV-C ($\lambda < 280$ nm) ed è in grado di costituire uno schermo in grado di evitare la fotodistruzione dei coenzimi NAD o NADP ($\lambda_{\max} \cong 340$ nm). Di questo vantaggio hanno potuto beneficiare alcune alghe nel momento del passaggio da un ambiente acquatico ad un ambiente terrestre: le piante più primitive, in cui sono stati infatti identificati dei flavonoidi, sono alcune alghe, appartenenti alla famiglia delle Charophyceae, le quali vengono considerate dei prototipi delle piante anfibe che hanno preceduto le piante terrestri vere e proprie. In effetti, sia i fenoli semplici che gli acidi fenolici ed i derivati cinnamici possono assolvere alla funzione di schermo protettivo nei confronti delle radiazioni UV, ma in questo ruolo i flavonoidi svolgono un'azione più efficace nel contrastare le radiazioni più nocive in quanto presentano dei massimi di assorbimento a 250-270 e 335-360 nm. Un altro possibile vantaggio per i costituenti cellulari, derivante dalla presenza delle sostanze fenoliche, è quello derivante dalle loro proprietà antiossidanti ed alla loro capacità di chelare i metalli. Queste proprietà determinano una riduzione delle probabilità di fotoossidazione di alcuni composti in condizioni di elevate intensità luminose.

6.3.2.1 Pigmenti fenolici

Il ruolo e l'importanza dei pigmenti di natura fenolica nel contribuire al colore dei tessuti vegetali, in generale, e dei fiori, in particolare, in relazione al contributo attribuibile alle due classi di pigmenti più abbondanti in natura, clorofille e carotenoidi, risultano evidenti dall'analisi dei dati riportati in tabella 3.2.1.1.

Tabella 3.2.1.1: Basi chimiche del colore dei fiori nelle angiosperme.

Colore	Pigmento responsabile
Bianco, avorio, crema	Flavoni e/o flavonoli
Giallo	Carotenoidi Flavonoidi gialli Calconi ed auron Carotenoidi e flavonoidi gialli
Arancione	Carotenoidi Pelargonidina ed auron
Scarlatto	Pelargonidina Cianidina e carotenoidi
Marrone	Cianidina su fondo di carotenoidi
Magenta, cremisi	Cianidina
Rosa	Peonidina
Malva, violetto	Delfinidina
Blu	Cianidina e copigmenti Delfinidina e copigmenti Delfinidina ed acilazione aromatica
Porpora intenso	Delfinidina ad elevate concentrazioni
Verde	Clorofille

Tutti i flavonoidi hanno un'elevata banda di assorbimento nel range 250-270 nm, inoltre, flavoni e flavonoli hanno una seconda banda di assorbimento a 330-370 nm, i calconi a 340-390 nm, gli auron a 370-430 nm, infine, le antocianidine¹ assorbono intensamente nel range 520-560 nm. L'importanza dei pigmenti fenolici nel contribuire al colore di fiori e frutti e, conseguentemente, nell'influenzare l'impollinazione dei fiori e la dispersione dei semi con il loro effetto di attrazione su insetti ed altri animali è da tempo largamente riconosciuta. Meno semplice è stato scoprire che flavonoidi incolori, ma largamente diffusi nei tessuti florali, sono essenziali come copigmenti degli antociani e che, grazie alle loro caratteristiche spettrali nella regione dell'ultravioletto, possono agire da invisibili guide UV per gli insetti impollinatori. E' noto, infatti, che numerose specie di insetti hanno un apparato visivo che li rende particolarmente sensibili ai glicosidi flavonici e flavonolici, che assorbono intorno ai 350 nm, nonchè ai flavonoidi gialli, quali calconi, auron, 3-deossiantocianine e flavonoli con sostituenti ossidrilici o metossilici extra sul C₆ o sul C₈. Oltre che dalla classe di appartenenza del flavonoide (antocianidine, calconi, auron, flavoni e flavonoli), il colore del tessuto dipende dal pattern di ossidrilazione e/o metossilazione dello scheletro base. Anche la glicosilazione dei gruppi ossidrilici ha un ruolo funzionale nel caso dei flavonoidi colorati, ed, inoltre, la posizione del legame glicosidico sullo scheletro flavonoidico può produrre degli shifts significativi nel visibile.

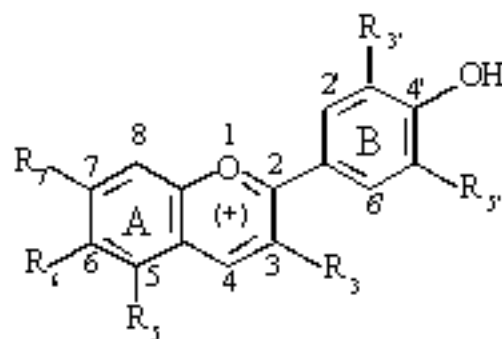
¹ Vengono chiamate antocianine i glicosidi e gli acil-glicosidi delle antocianidine (agliconi).

In figura 3.2.1.1 sono riportate le strutture di alcune antocianidine ritrovate in natura, tutte basate su uno scheletro base, costituito dal catione flavilium (la struttura primaria), cui sono attaccati gruppi ossidrilici e metossilici. Attualmente sono note le strutture di $\cong 22$ antocianidine, ma tra queste quelle più frequentemente ritrovate nelle piante sono la pelargonidina (scarlatto), la cianidina (cremisi) e la delphinidina (blu-violetto). Questi tre pigmenti, insieme alle comuni strutture metilate [peonidina (rassiccia), petunidina (porpora) e malvidina (malva)], sono particolarmente abbondanti in frutti e fiori, dove la comparsa di varie tonalità di colorazioni (dal rosa al rosso scarlatto, al rosso porpora, al magenta, al viola, fino al blu) dipende dalla presenza delle strutture metilate accanto alle antocianidine più comuni. Pelargonidina e delphinidina si ritrovano, in particolare, in fiori di colore azzurro e la loro sintesi è correlata alla selezione naturale effettuata da insetti impollinatori attratti dal colore scarlatto (il colibrì) e dal colore blu intenso (l'ape), rispettivamente. Le foglie pigmentate, normalmente, contengono cianidina, mentre le altre due antocianidine idrossilate si ritrovano raramente nei tessuti vegetativi. La glicosilazione del C₃ dell'antocianidina produce un'effetto batocromico di $\cong 15$ nm rispetto allo spettro di assorbimento dell'aglicone, e questo tipo di glicosilazione è la più comune nelle piante, mentre la glicosilazione in altre posizioni (C₅ e C₇) è più sporadica e produce effetti meno marcati sul colore. La glicosilazione del C₃ avviene, in genere, ad opera di una o due unità di glucosio o galattosio, ma frequente è anche la presenza di ramnosio, arabinosio e xilosio. A volte, il residuo zuccherino è legato a gruppi acilici, tra i quali sono stati identificati gli acidi idrossicinnamici, i più comuni, acidi idrossibenzoici, acido acetico ed alcuni acidi alifatici bicarbossilici, come l'acido malonico, l'acido malico, l'acido succinico e l'acido ossalico.

La natura ionica delle antocianine fa sì che l'intensità e la tonalità del loro colore sia variabile in funzione del pH: le antocianine sono di colore rosso od arancio in soluzione fortemente acida e questo colore diminuisce man mano che il pH della soluzione aumenta fino a scomparire del tutto. In soluzioni prossime alla neutralità od alcaline si ha la comparsa di una soluzione blu o violetta, colore poco stabile che tende a sbiadirsi nel tempo. Queste variazioni di colore sono da attribuirsi a delle variazioni nella struttura dell'antocianina, conseguenti alle variazioni di pH (figura 3.2.1.3). Aumentando ulteriormente il pH (pH > 7), la molecola subisce una denaturazione irreversibile. La presenza di almeno un gruppo ossidrilico libero nelle posizioni 5, 7 o 4' è una condizione essenziale perchè si abbia lo sviluppo *in situ* dei colori responsabili della pigmentazione dei tessuti vegetali. Le variazioni di colore sono la conseguenza della perdita di un protone da parte del catione flavilium (I) in una soluzione acquosa debolmente acida (pH 4-6, corrispondente al range di pH esistente nel vacuolo) ed della successiva formazione di una delle tre possibili basi chinoniche (II_a, II_b, II_c) di colore rosso o blu. Inoltre, per idratazione del catione flavilium, normalmente a livello di C₂, si formano un emiacetale (III) (pseudobase incolore) e due calconi, retrocalcone *cis* (IV_a) e retrocalcone *trans* (IV_b), (incolori o di colore giallo pallido). In soluzione acquosa molto acida (pH < 2) lo ione flavilium, rosso od arancio, è la sola struttura presente. Aumentando il pH, da pH 2 fino alla neutralità, anche le altre strutture (strutture secondarie) cominciano ad essere sempre più abbondanti a scapito della forma cationica. Le proporzioni tra le varie forme dipendono dal valore del pH e, man mano che la forma cationica va scomparendo, la soluzione va gradualmente decolorandosi: tra pH 2 e pH 4 la struttura prevalente in soluzione è l'emiacetale, tra pH 4 e pH 6 si ha la scomparsa dello ione flavilium, mentre aumenta la concentrazione delle basi chinoniche. Aumentando ulteriormente il pH, in ambiente alcalino compaiono le forme anioniche (V_a, V_b), blu, delle basi chinoniche. Le reazioni descritte sono caratteristiche della porzione agliconica e non coinvolgono i residui zuccherini ed acilici eventualmente presenti nella struttura dell'antocianina. Comunque, l'abbondanza relativa delle diverse strutture secondarie presenti in soluzione, dalla quale dipende il colore di un pigmento, è funzione, oltre che del pH, del particolare pattern di sostituzione dello scheletro base. Normalmente le strutture secondarie colorate sono instabili, pertanto, il colore della soluzione tende a scomparire più o meno rapidamente a seconda del pH, a meno che non intervenga un

Figura 3.2.1.1: Strutture di antocianidine naturali.

<i>Antocianidina</i>	<i>Pattern di sostituzione</i>					
	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6
Pelargonidina	OH	OH	H	OH	H	H
Cianidina	OH	OH	H	OH	OH	H
Delfinidina	OH	OH	H	OH	OH	OH
Peonidina	OH	OH	H	OH	OMe	H
Peturidina	OH	OH	H	OH	OMe	OH
Malvidina	OH	OH	H	OH	OMe	OMe
Apigeninidina	H	OH	H	OH	H	H
Luteolinidina	H	OH	H	OH	OH	H
Tricetinidina	H	OH	H	OH	OH	OH
Aurantidinidina	OH	OH	OH	OH	H	H
6-Idrossi-Cianidina	OH	OH	OH	OH	OH	H
6-Idrossi-Delfinidina	OH	OH	OH	OH	OH	OH



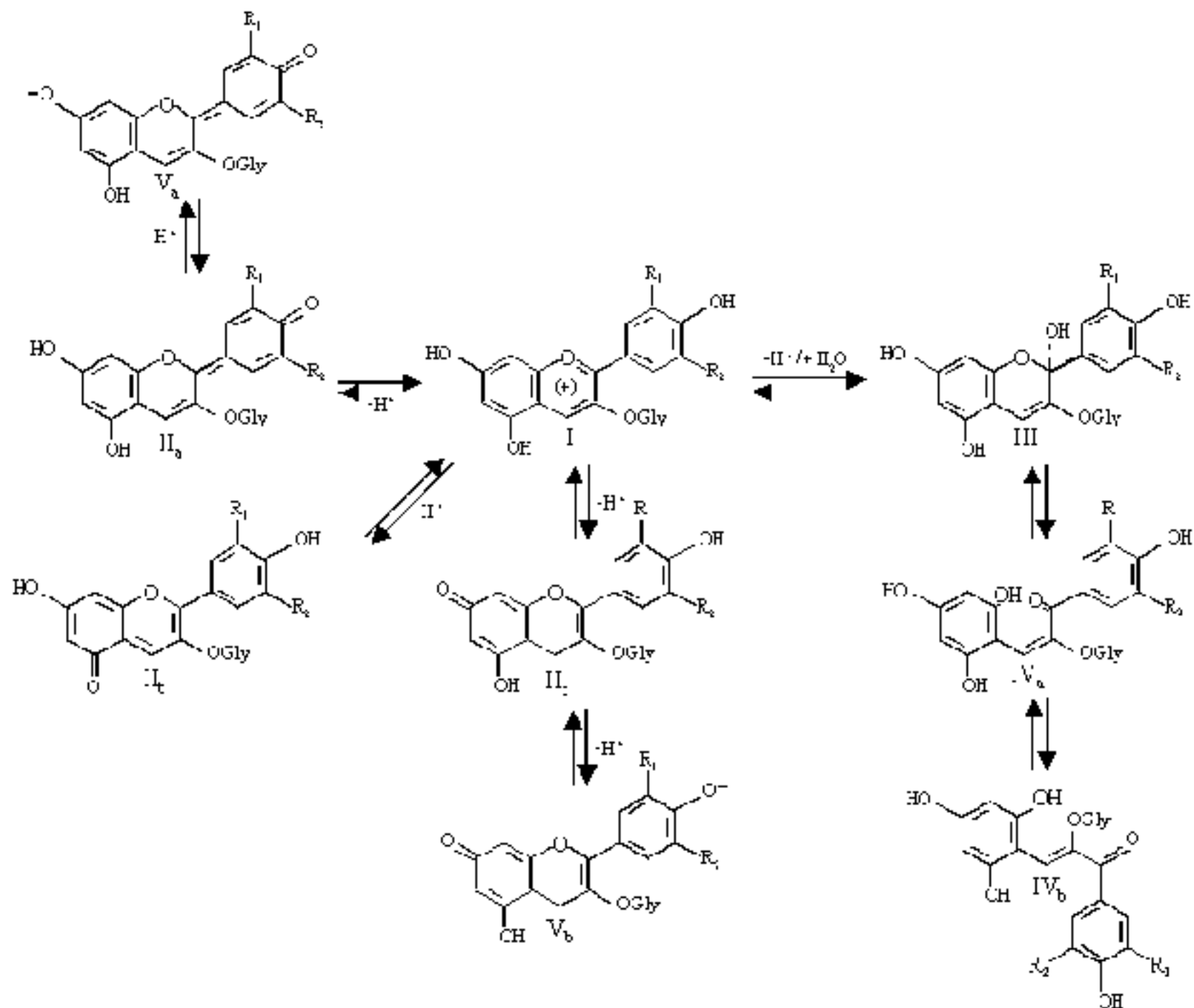


Figura 3.2.1.3: Variazioni del colore delle antocianine in funzione del pH.

processo di stabilizzazione del colore, che comporta la formazione di strutture terziarie.

Da quanto esposto risulta chiaro perchè le antocianine, i pigmenti responsabili delle variopinte colorazioni dei tessuti vegetali, paradossalmente non esistono in una forma colorata stabile. Anzi, nel range di pH 3-7, cioè in condizioni fisico-chimiche simili a quelle dei vacuoli cellulari, il sito in cui si accumulano le antocianine, questi composti sono presenti, normalmente, in una forma incolore, come conseguenza della reazione di idratazione del catione flavilium, e ciò è in contraddizione con quanto effettivamente si osserva in natura: poichè il pH vacuolare è debolmente acido o neutro, come si sviluppa il colore, ad es., dei fiori? Poichè la perdita di colore è dovuto in larga parte all'idratazione del catione flavilium, lo spostamento dell'equilibrio di questa reazione a favore della specie ionica, comporterà una stabilizzazione del colore. L'attacco nucleofilo dell'acqua sull'anello eterociclo del catione flavilium può essere prevenuto dalla presenza nel mezzo di specie capaci di interagire fortemente e selettivamente con il catione flavilium stesso e/o con le basi chinoniche. D'altra parte, le caratteristiche strutturali ed elettroniche delle forme colorate di antocianina (cromofori planari ad ampia delocalizzazione elettronica) le rende particolarmente idonee a formare complessi molecolari (non-covalenti) stabili in grado di contrastare efficacemente la reazione di idratazione (struttura terziaria del pigmento). Specie capaci di associarsi con un'antocianina sono l'antocianina stessa (auto-copigmentazione), se presente a concentrazioni adeguate (10^{-3} - 10^{-2} M), ed un'ampia varietà di molecole incolore, definite copigmenti per la loro capacità di intensificare la colorazione dell'antocianina in ambiente debolmente acido o neutro (copigmentazione intermolecolare). Nel caso delle antocianine con gruppi acil-aromatici legati al residuo glicosidico può aversi un fenomeno di copigmentazione intramolecolare. Infine, alcuni cationi metallici, quali magnesio, alluminio e ferro, possono anch'essi avere un ruolo nella stabilizzazione del colore del pigmento. Pertanto, le relazioni tra struttura dell'antocianina e/o antocianidina e pH da sole non sono sufficienti a spiegare perchè: (i) i fiori sono colorati ed esibiscono un'ampia gamma di colori; (ii) fiori di diverso colore possono contenere le stesse antocianine; (iii) fiori con colori simili possono contenere antocianine differenti.

Per quanto concerne l'auto-copigmentazione, si è osservato che quelle formate da due basi chinoniche (omo-associazioni) sono molto più stabili di quelle formate dal catione flavilium o dalla base chinonica ionizzata. Questo è un dato di notevole significato biologico in quanto nel range di pH tipico di un vacuolo cellulare sono le basi chinoniche la forma colorata prevalente e, quindi, la loro associazione può dare un importante contributo alla stabilizzazione *in vivo* dei pigmenti florali.

Antocianine ed antocianidine possono essere stabilizzate tramite la formazione di complessi colorati con vari metalli e questi complessi sono suscettibili anche a piccole variazioni di pH. E' stato, infatti, osservato che la formazione di chelati tra antocianine e metalli, quali alluminio, magnesio e ferro, è alla base della comparsa del colore blu nei petali di molti fiori e che antocianine con un gruppo catecolo nel loro anello B posseggono il potenziale per formare complessi più o meno stabili con numerosi metalli, oltre a quelli citati. La formazione del complesso, che avviene con l'allontanamento di due protoni dal catione flavilium e la conversione del pigmento nella sua forma chinonica, determina quindi un forte shift sia batocromico che ipercromico. In altri casi, invece, la comparsa del colore blu di alcuni fiori è legata non soltanto alla presenza del metallo ma anche alla contemporanea presenza di un efficace copigmento: il ruolo del metallo potrebbe essere quello di favorire la formazione dell'associazione pigmento-copigmento ovvero di rafforzarne l'interazione. Così, ad esempio, ferro e/o alluminio sembrano essere essenziali per il colore azzurro dei fiordalisi, i quali, invece, assumono una colorazione rossa quando, al posto di cianidina-3,5-diglucoside, contengono glicosidi della pelargonidina incapaci di formare complessi con i metalli. Confrontando l'azzurro del fiordaliso con il rosso di una rosa, si scopre che entrambi i pigmenti contengono cianidina-3,5-diglucoside ma nel primo caso il pigmento è un complesso del ferro con 4 molecole di antociano e tre molecole di un glicoside dell'apigenina, nel secondo caso l'antociano non risulta essere complessato con un metallo. Il colore blu dell'*Hydrangea macrophylla*, i cui sepali

contengono delphinidina 3-glucoside, si sviluppa, come osservato in sistemi modello, non solo per la presenza di alluminio ma anche a causa della copigmentazione con gli acidi 3-caffeil- e 3-cumaril-chinico: in questi sistemi l'alluminio, da solo, è insufficiente per sviluppare un colore blu stabile. D'altra parte, variando la struttura dell'antocianina, si è osservato che le variazioni di colore tipiche della formazione di una struttura terziaria si realizzano soltanto nel caso in cui l'antocianina possiede gruppi *orto* diidrossifenolici sull'anello B e ciò sta ad indicare la formazione di un composto chelato tra l'alluminio e la molecola di antocianina. In alcuni casi, oltre alla presenza di un copigmento, nella formazione di complessi stabili con i metalli di particolare rilievo è l'acilazione del C₃ dell'antociano. Ad esempio, la cianidina-3-p-cumaroilglucoside-5-glucoside in presenza di alcuni copigmenti forma stabili complessi metallici, non altrettanto sembrano fare nelle stesse condizioni la cianidina-3,5-diglucoside e la delphinidina-3,6-diglucoside. Probabilmente, anche la lunghezza e la natura del residuo zuccherino sono importanti nel determinare la stabilità del complesso.

Un altro fattore importante nel determinare la colorazione e la stabilità del colore di un'antociano nelle normali condizioni di pH cellulare è la copigmentazione. Copigmenti possono essere flavonoidi, alcaloidi, amminoacidi, acidi organici, nucleotidi e polisaccaridi, anche se in questa definizione si possono includere i metalli e le stesse antocianine. L'effetto di un copigmento si manifesta sia con un aumento dell'assorbanza in corrispondenza della λ_{\max} nel visibile (effetto ipercromico) sia con uno shift batocromico, cioè uno spostamento del massimo di assorbimento verso valori più elevati di λ . Tale effetto, determinato da una stretta associazione tra il copigmento e le strutture colorate dell'antocianina, in particolare il catione flavilium, è funzione del tipo e della concentrazione dell'antocianina, del tipo e della concentrazione del copigmento, della temperatura e del pH del mezzo. La formazione del complesso molecolare comporta una parziale desolvatazione delle molecole di pigmento e copigmento ed un riarrangiamento delle molecole di solvente attorno al complesso in modo da consentire un più stretto contatto tra i due tipi di molecole. Questo meccanismo è all'origine dell'effetto ipercromico nella banda di assorbimento visibile dell'antocianina (il ridotto accesso di molecole di acqua al C₂ e/o al C₄, i siti elettrofili nella struttura del flavilium, fa sì che aumenti la concentrazione del cromoforo) e dello shift batocromico (in prossimità del cromoforo si ha una variazione di polarità del mezzo in quanto alcune molecole di acqua sono state sostituite da molecole organiche meno polari). Circa la natura delle interazioni tra le molecole del pigmento e del copigmento si ritiene che le principali forze guida nel determinare le associazioni siano le interazioni idrofobiche anche se non è da escludere la formazione di legami idrogeno, laddove questo sia possibile. Un dato copigmento, inoltre, può stabilizzare sia il catione flavilium che le basi chinoniche, anche se non allo stesso modo ed in misura diversa a seconda del pH. Per un dato valore del pH il copigmento complessa il catione, stabilizzandolo e facendo sì che la sua concentrazione sia più elevata che non in assenza del copigmento, ma la formazione del complesso influenza debolmente l'acidità degli ossidrilici sul C₇ e sul C₄ della forma flavilium e, pertanto può verificarsi un aumento della concentrazione delle basi chinoniche, che, a loro volta, possono formare un complesso con il copigmento. Pertanto, a seconda del rapporto molare tra pigmento e copigmento ed a seconda del pH, modificandosi i rapporti tra i vari complessi possibili, si potrà osservare tutta una gamma di colori pur in presenza di una sola antocianina. La copigmentazione è un processo naturale che si verifica *in vivo* all'interno dei vacuoli cellulari delle piante superiori, i quali sono essenzialmente delle soluzioni acquose. E', pertanto, la struttura dell'acqua allo stato liquido che governa le associazioni tra il copigmento ed il catione flavilium: in assenza di acqua la copigmentazione, probabilmente, non avverrebbe. La caratteristica più tipica di questo solvente, che la differenzia notevolmente da altri solventi polari, è la sua struttura tridimensionale, in cui molecole di acqua, con una geometria quasi-tetraedrica, sono tenute assieme da legami idrogeno. Questa particolare struttura è più importante della stessa natura polare dell'acqua nel determinare l'entità della reazione di copigmentazione. Ogni fattore che destabilizza questa struttura (aumento di temperatura, di forza ionica, presenza di cosolvente, etc.) indebolisce

anche l'effetto della copigmentazione. Al contrario, fintanto che il network di molecole di acqua costituisce il parametro strutturale dominante, pigmento e copigmento sono mantenuti a stretto contatto in accordo con un meccanismo che può essere descritto come un'interazione idrofobica.

Infine, va ricordato che alcuni fiori blu (es.: *Senecio cruentus*, *Ipomoea tricolor*) contengono pigmenti, che presentano una loro stabilità *in vitro* senza la necessità di una copigmentazione intermolecolare o di una complessazione con metalli pesanti. Si tratta, in genere, di antocianine acilate, cioè con almeno un gruppo acilico, il copigmento interno, legato al residuo glicosidico. Spesso il gruppo acilico è rappresentato da un derivato dell'acido cinnamico, il quale interagisce con il cromoforo per mezzo dei suoi elettroni π ed in questa associazione il residuo glicosidico ha il ruolo di uno "spaziatore". Questo tipo di copigmentazione intramolecolare costituisce una sorta di auto-protezione dell'antocianina nei confronti della reazione di idratazione, ed infatti le antocianine acilate o poliacilate sono particolarmente resistenti alla decolorazione sia in soluzione acida che in soluzione neutra, anche in assenza di metalli e copigmenti esterni. Le caratteristiche di stabilità del pigmento scompaiono se viene allontanato il gruppo acilico. In genere, questi pigmenti sono 3,5- o 3,7-diglicosidi per i quali non è ancora ben nota la relazione esistente tra numero e natura dei gruppi e stabilità del colore. In alcuni casi la stabilità del pigmento viene raggiunta in seguito alla formazione di una struttura a sandwich in cui due residui acilici aromatici si dispongono sopra e sotto il cromoforo proteggendolo dall'attacco nucleofilo dell'acqua. Una situazione diversa si verifica per la gentiodelfina, un pigmento diacilato, nel quale il processo di stabilizzazione coinvolge soltanto un residuo caffeico nella formazione di una conformazione impaccata. In quest'ultimo processo fattori importanti sono la struttura dei residui acilici aromatici, la loro posizione sul residuo zuccherino come pure la lunghezza del residuo glucosil-acilico, che deve essere tale da conferire allo scheletro del pigmento una flessibilità adeguata alla formazione di un'associazione intramolecolare.

6.3.2.2 Fenoli come agenti allelopatici

Il termine allelopatia viene usato, in senso lato, per indicare le interazioni biochimiche, dirette od indirette, sia benefiche che nocive, tra le diverse specie vegetali, inclusi funghi e batteri, interazioni che si realizzano tramite il rilascio di sostanze chimiche nell'ambiente. Comunemente questo termine viene riferito agli effetti nocivi di una specie di pianta superiore, il donatore, su di un'altra, il recettore, effetti che si manifestano come riduzione di efficienza nella germinazione e nella crescita e che rappresentano un aspetto della competizione tra le specie. In ogni caso, le interazioni allelopatiche sono determinate dal rilascio nell'ambiente circostante (volatilizzazione, dilavamento della superficie ad opera di pioggia o goccioline di rugiada, essudazione dalla pianta viva, caduta di frutti e semi) da parte del donatore di metaboliti secondari fitotossici (sostanze allelochimiche), i quali per esercitare la loro azione debbono accumularsi nel suolo in quantità sufficiente e debbono avere sufficiente stabilità per tutto il tempo necessario per manifestare la loro efficacia.

Diversi esperimenti, condotti in anni recenti, hanno dimostrato che un certo numero di sostanze fenoliche, in particolare, chinoni, fenoli semplici, acidi fenolici, derivati dell'acido cinnamico e flavonoidi, presentano un'attività allelopatica quando secreti dai tessuti vegetali. Tale attività può esercitarsi sia sulla pianta che li ha prodotti che su altre piante presenti nell'ambiente circostante. Sostanze quali l'idrochinone e l'acido salicilico, presenti in forma legata nei tessuti vegetali, quando vengono rilasciate da foglie e radici in forma libera nell'ambiente circostante possono avere un effetto inibitorio sia sulla germinazione dei semi che sul processo di crescita delle piante presenti nello stesso ambiente. Pur con tutte le difficoltà connesse allo studio dei processi di volatilizzazione, essudazione, lavaggio e rilascio dei metaboliti secondari, nonché con la valutazione dei fenomeni di degradazione di tali metaboliti nel suolo, diverse ricerche hanno rilevato la presenza degli acidi p-idrossibenzoico, vanillico, e siringico, nonché di alcuni derivati dell'acido cinnamico nelle acque piovane dopo dilavamento delle foglie di numerose specie vegetali. Tali soluzioni hanno mostrato effetto inibitore sulla germinazione di un ampio

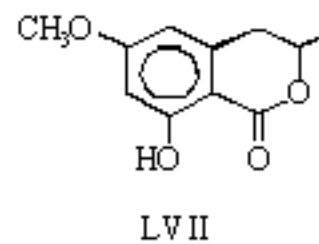
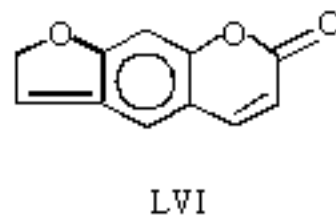
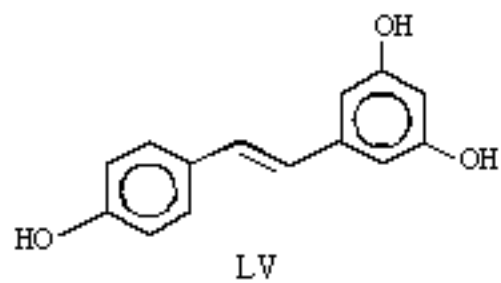
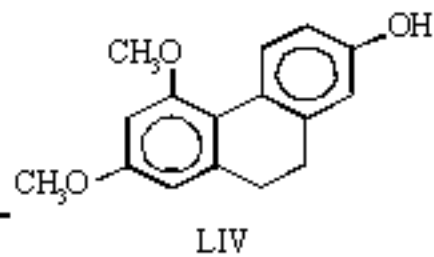
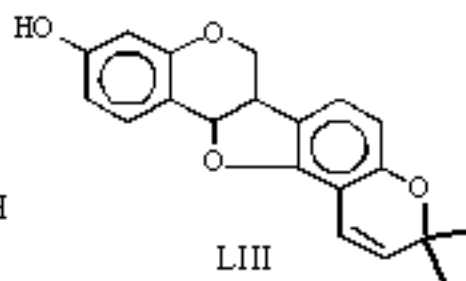
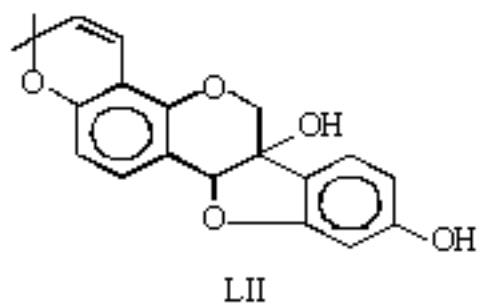
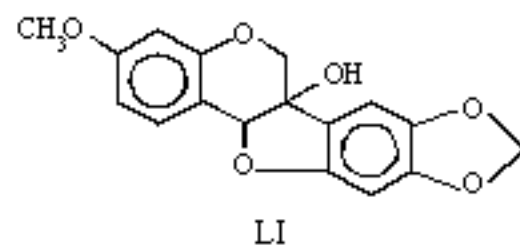
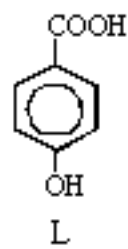
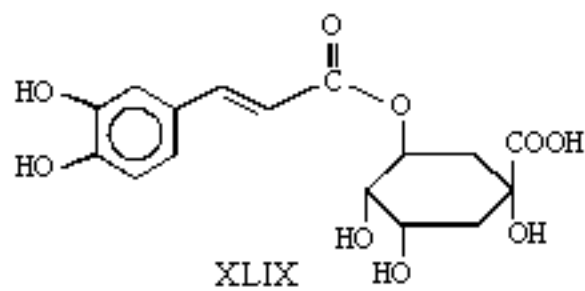
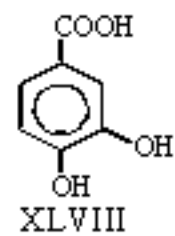
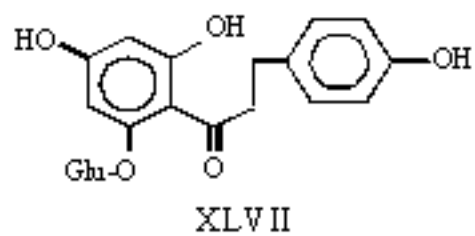
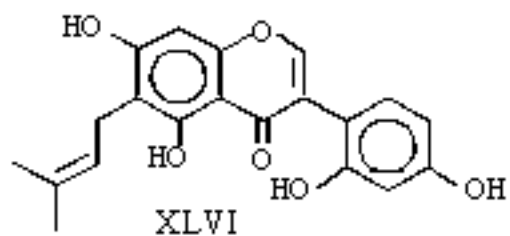
spettro di semi di angiosperme.

La presenza di sostanze fenoliche nel suolo può, inoltre, influenzare l'accumulo, la disponibilità e la velocità di assorbimento di molti nutrienti minerali. Ad esempio, i fenoli possono competere per i siti dell'assorbimento anionico su argille ed humus e possono anche legarsi a forme solubili di alluminio, ferro e manganese, che altrimenti si legherebbero al fosfato: in tal modo i fenoli aumentano la disponibilità del fosfato. L'assorbimento minerale può essere influenzato dai fenoli anche tramite effetti sulla funzionalità delle membrane delle cellule radicali, in quanto gli acidi fenolici sono in grado di depolarizzare il campo elettrico transmembrana con conseguente inibizione del trasporto attivo.

6.3.2.3 Fenoli come agenti antifungini

Diverse classi di sostanze fenoliche presentano un'attività antimicrobica in grado di contrastare efficacemente infezioni fungine, batteriche o virali (figura 3.2.3.1). Tale attività viene manifestata sia da fenoli preesistenti, che da metaboliti di natura fenolica che si formano nei tessuti vegetali in seguito all'instaurarsi del processo infettivo (fitoalessine). Al primo gruppo appartengono fenoli semplici, acidi fenolici, acidi cinnamici, flavonoli ed alcuni isoflavoni, quali il luteone (XLVI), e diidrocalconi, quale la florizina (XLVII), mentre fitoalessine di natura fenolica appartengono, generalmente, alle classi degli isoflavonoidi, dei flavani, degli stilbeni, dei fenantreni, dei pterocarpani e delle furanocumarine. Uno dei primi esempi di inibizione delle spore di un patogeno fungino ad opera di sostanze fenoliche preesistenti nell'ospite è quello osservato in scaglie colorate di cipolla dove la presenza di catecolo ed acido protocatecuico (XLVIII) inibiva la germinazione delle spore di *Colletotrichum circinans*. Analogamente la resistenza mostrata da alcune varietà di patata nei confronti di *Phytophthora infestans*, *Verticillium albo-atrum* e *Streptomyces scabies* è riconducibile alla presenza di adeguati livelli di acido clorogenico (XLIX). Elevate concentrazioni di acido caffeico e dei suoi esteri sono correlate positivamente alla resistenza di varietà di cocomero nei confronti di *Alternaria* spp., o del peperone nei confronti del *Colletotrichum* od, infine, del tabacco nei confronti del TMV (virus mosaico del tabacco). Anche la resistenza di molti prodotti ortofrutticoli all'insorgenza di malattie di origine fungina nel corso della conservazione allo stato fresco è legata alla presenza di barriere antinfettive preesistenti: oltre ai fenoli costitutivi già citati, numerosi flavoni e flavanoni si sono rivelati efficaci nel contrastare marciumi derivanti dalla presenza di *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus* spp. ed altri patogeni fungini comunemente insorgenti nel corso della conservazione. Numerose ricerche sono state condotte per valutare il meccanismo con cui si esplica la tossicità dei composti fenolici. Si è riscontrato come la lipofilità della molecola e/o la presenza di almeno un gruppo ossidrilico acido costituiscano un requisito strutturale essenziale per una buona attività antifungina. La lipofilità, infatti, permette alla molecola fenolica attiva di penetrare la membrana cellulare del patogeno e successivamente il gruppo ossidrilico può agire disaccoppiando la fosforilazione ossidativa. Il meccanismo di tossicità dei tannini viene, invece, collegato alla loro capacità di inibire gli enzimi extracellulari del patogeno, che gli impedisce di penetrare nelle cellule dell'ospite, ovvero alla loro capacità di depauperare il substrato dei nutrienti necessari al patogeno, con la complessazione dei metalli e l'insolubilizzazione delle proteine, od, infine, ad un'azione diretta sulle membrane del patogeno con conseguente inibizione della fosforilazione ossidativa.

La presenza di barriere antimicrobiche endogene preesistenti e l'esistenza di una correlazione positiva tra il grado di resistenza ed il tenore di composti fenolici nei tessuti vegetali sani non sono sempre direttamente correlati ai meccanismi di difesa messi in atto dai tessuti vegetali per contrastare il processo infettivo. Molto spesso per comprendere tale meccanismo è più importante valutare le risposte postinfettive indotte nei tessuti infetti. Tali risposte comprendono anche un aumento dell'attività di molti sistemi enzimatici, tramite elicitatori di diversa natura chimica, e l'accumulo di metaboliti (inclusa la reazione ipersensitiva) in grado di antagonizzare l'ulteriore sviluppo del processo infettivo. In questo contesto molte sostanze fenoliche, di per sé non dotate di attività biologica, diventano attive nella forma ossidata e



questa attività è spesso legata ad una inibizione degli enzimi extracellulari del patogeno. Ad esempio i prodotti di ossidazione dei fenoli preesistenti nella mela svolgono un ruolo importante nel contenere l'incidenza dei marciumi prodotti da *Sclerotinia fructigena*. Inoltre i fenoli ossidati possono svolgere un ruolo importante nella reazione necrotica, cioè nella reazione di polimerizzazione ossidativa che coinvolge fenoli, amminoacidi e proteine e che porta alla formazione delle melanine. Questa reazione porta alla formazione di una barriera che ostacola l'ulteriore sviluppo del patogeno e nello stesso tempo sottraendo ossigeno e nutrienti depaupera il substrato necessario allo sviluppo del patogeno.

Anche l'accumulo postinfettivo dei fenoli preesistenti, conseguente ad una elicitazione degli enzimi chiave nella loro biosintesi, può essere considerato un aspetto importante della risposta dei tessuti infetti. Ad esempio, nella patata si osserva un accumulo di acido clorogenico in seguito ad attacco di *Helminthosporium carbonum*, *Phytophthora infestans* e *Fusarium solani*, mentre nella mela in seguito ad attacco di *Sclerotinia fructigena* si osserva un aumento della concentrazione di acido p-idrossibenzoico (L) ed acido vanillico.

La reazione ipersensitiva, nella sua accezione di risposta attiva dell'ospite all'attacco del patogeno comprendente l'attivazione di barriere antifezionali e fisiche, che inibiscono il processo infettivo, include, infine, la sintesi *ex novo* di sostanze antimicrobiche, le fitoalessine. Le fitoalessine sono composti di basso peso molecolare che si accumulano all'interfaccia tra il tessuto infetto ed il tessuto sano con una velocità e ad una concentrazione adeguate ad inibire la crescita del patogeno. La prima fitoalessina identificata e caratterizzata è stata la pisatina (LI), un isoflavonoide appartenente alla classe dei pterocarpani, attiva nei confronti di *Fusarium solani*, *Stemphylium botryosum*, *Rhizopus stolonifer*, *Helminthosporium turcicum*, *Neurospora crassa* e *Penicillium expansum*. Altri esempi di fitoalessine di natura fenolica sono la faseollina (LII) e la gliceollina I (LIII), entrambe classificabili come isoflavonoidi (pterocarpani) come la gran parte delle fitoalessine fenoliche identificate, l'orchinolo (LIV), della classe dei fenantreni, la viniferina ed il resveratrolo (LV), due stilbeni, lo psoralene (LVI) e la xantoxina, della classe delle furanocumarine. ed, infine la 6-metossimelleina (LVII), un'isocumarina. In quasi tutte le specie vegetali studiate la sintesi delle fitoalessine è spesso associata ad alti tipi di risposte difensive della pianta quali la sintesi di lignina e tannini e la deposizione di ulteriori strati di parete cellulare.

In definitiva, la sequenza di eventi, che costituiscono la risposta difensiva, può includere in successione: morte e necrosi della cellula ospite, accumulo di fenoli tossici, modificazioni delle pareti cellulari dell'ospite ad opera di sostituenti fenolici (reazioni di esterificazione) o creazioni di barriere fisiche ed, infine, produzione di specifiche sostanze antibiotiche quali le fitoalessine. Questa sequenza di eventi fa sì che si possano distinguere due momenti nella strategia difensiva della pianta. In una prima fase si verifica un rapido accumulo di fenoli nel sito dell'infezione, i quali agiscono rallentando od arrestando la crescita del patogeno fintanto che non viene attivata la seconda fase del meccanismo di difesa, nel corso della quale l'ospite può inibire completamente il patogeno.

6.3.2.4 Fenoli e resistenza ad insetti

Le relazioni ecologiche tra pianta ed insetti sono piuttosto complesse e comprendono parametri sia di tipo fisico che chimico. Queste relazioni vengono influenzate sia da fattori ambientali che da fattori legati alle interazioni pianta-insetto, inclusa la reazione ipersensitiva ed il grado di resistenza della pianta nei confronti delle malattie vettorate dagli insetti. L'espressione di tutti questi fattori è sotto il controllo di vari parametri ambientali, che agiscono sull'insetto, sulla pianta e sulle interazioni pianta-insetto, ma è, soprattutto, il risultato di uno o più fattori genici.

In termini di ecologia chimica, l'insetto migra da pianta a pianta e riconosce il suo ospite tramite colori e sostanze volatili emesse dalla pianta. Una volta che l'insetto si è fermato su un particolare ospite ed ha effettuato un test di assaggio, diventa prevalente il ruolo delle sostanze che agiscono da deterrenti o da stimolanti nell'alimentazione dell'insetto. In questo contesto, il fatto che una pianta possa essere accettata o rifiutata dall'insetto come cibo dipende in gran parte dalla sua composizione chimica e, nell'ambito di questo meccanismo, un ruolo importante

viene svolto dall'eventuale presenza di inibitori chimici in grado di inibire l'ovoposizione sulla pianta ospite o, successivamente, lo sviluppo delle larve e la sopravvivenza della progenie. Da un punto di vista strutturale tali inibitori appartengono a diverse classi di composti chimici, inclusi i composti fenolici.

Diverse classi di sostanze fenoliche si sono rivelate in grado di influenzare il comportamento, lo sviluppo e la crescita di numerose specie di insetti. Ad esempio, alcuni flavonoidi del cotone agiscono da stimolatori nutrizionali nei confronti di *Anthonomus grandis*, analogamente la florizina presente nelle foglie di melo agisce da stimolante nei confronti di alcuni afidi (*Aphis pomi* e *Rhaphalosiphum insertum*). Alcuni glicosidi della naringenina, dell'esperetina e della quercetina, presenti nelle foglie di alcune specie di *Citrus* fungono da stimolatori dell'ovoposizione da parte di *Papilio xuthus*. I composti attivi sono in genere degli O-glicosidi o dei C-glicosidi piuttosto che degli agliconi ed, inoltre, anche il tipo di residuo zuccherino è in grado di influenzare l'attività del composto fino al punto di renderlo inattivo o trasformarlo in un deterrente antinutrizionale. E' probabile che in alcuni casi questi composti vengano usati dagli insetti fitofagi per riconoscere la pianta ospite, dal momento che spesso il pattern flavonoidico è tipico di una data specie vegetale. Al contrario, esistono numerose ricerche che dimostrano che i flavonoidi possono, anche, agire da deterrenti nutrizionali a concentrazioni relativamente basse, ad esempio la quercetina-3-ramnoside e la florizina agiscono da deterrenti nei confronti di *Manduca sexta* e di *Schizaphis graminum* rispettivamente, oppure agire da efficienti sostanze antibiotiche ed antivirali. In genere, la tossicità dei flavonoidi viene aumentata dalla presenza nella loro struttura di sostituenti (prenilazione, metilazione) che rendono in composto meno polare, ovvero dalla presenza di gruppo ortodifenolici, oltre che dal tipo e dalla posizione della glicosilazione.

Un gruppo molto importante di composti con proprietà deterrenti nei confronti degli insetti è costituito dai tannini, in particolare i tannini condensati, la cui presenza nei tessuti vegetali limita notevolmente il numero e la crescita degli insetti sulla pianta. La tossicità dei tannini è da ricondursi alla loro capacità di complessare le proteine con conseguente diminuzione della digeribilità del cibo ovvero con effetti negativi sul metabolismo endogeno dell'insetto. Altre cause del potere deterrente dei tannini sono riconducibili ai loro effetti negativi sul sapore (astringenza) ovvero sulla durezza dei tessuti.

6.4 Polimeri fenolici

6.4.1 Tannini

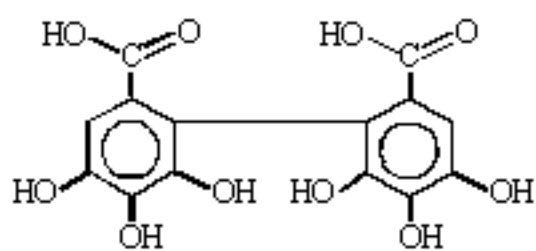
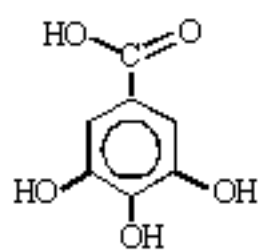
Il termine tannino fu originariamente introdotto da Seguin nel 1796 per indicare una classe di composti vegetali, presenti in galle di quercia, capaci di tannare (interagire con proteine) la pelle animale, quando trattata con un'infusione acquosa di galle, per produrre cuoio. Successivamente, la dizione tannini vegetali fu utilizzata per indicare tutta una serie di composti polifenolici capaci di precipitare le proteine in un mezzo acquoso. Questi composti posseggono, inoltre, tutta una serie di caratteristiche tipiche dei fenoli, cioè la capacità di formare complessi colorati con sali di ferro, di ossidarsi in presenza di permanganato di potassio in ambiente alcalino, di subire facilmente reazioni di sostituzione elettrofila aromatica, etc., che, assieme alla peculiare capacità di precipitare le proteine possono essere usate per identificare i tannini nel materiale vegetale.

La capacità dei tannini di precipitare le proteine è determinata dalla possibilità che essi hanno di formare strutture stabili con molecole proteiche per mezzo di legami incrociati. La natura di queste interazioni non è completamente chiara in tutti i suoi dettagli, ma sono senz'altro coinvolti legami idrogeno multipli tra i gruppi fenolici ed alcuni siti della molecola proteica, quali il legame peptidico. Nel caso sopracitato delle pelli animali l'instaurarsi di queste associazioni con le molecole di collagene, che costituiscono le fibre proteiche del tessuto, danno origine ad

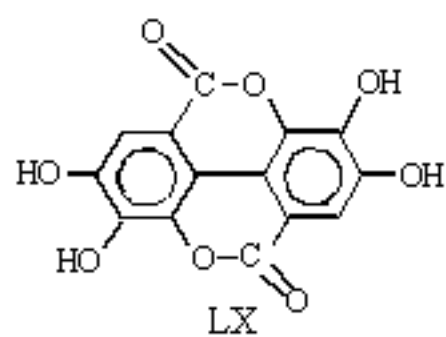
un prodotto, chiamato cuoio, che presenta delle caratteristiche di aumentata resistenza a calore, umidità, abrasioni ed attacchi microbici rispetto al prodotto originario. Le associazioni con le molecole proteiche si instaurano soltanto se le molecole polifenoliche hanno dimensioni opportune per legare tra loro molecole proteiche adiacenti e se hanno un numero di gruppi fenolici sufficiente a permettere la formazione di legami incrociati in più siti. Se le molecole sono troppo grandi, esse non riescono a penetrare all'interno della struttura proteica, se, invece, sono troppo piccole possono entrare nella struttura proteica ma non sono in grado di formare legami stabili con proteina. Sulla base di queste osservazioni fu suggerito che molecole con un PM compreso tra 500 e 3.000 avessero le dimensioni ottimali per formare legami stabili con le proteine. Pertanto, fu proposta da Bate-Smith e Swain la seguente definizione per i tannini: "sostanze fenoliche solubili in acqua, con un peso molecolare compreso tra 500 e 3.000 e che, oltre alla normale reattività dei fenoli, posseggono la capacità di precipitare alcaloidi (solfato di cinchonina), gelatina ed altre proteine".

I tannini sono dei costituenti di scarsa importanza in funghi, alghe, muschi ed epatiche, sono presenti sia nelle Gimnosperme che nelle Angiosperme ed, all'interno delle Angiosperme, diventano particolarmente significativi in molte dicotiledoni, che costituiscono il materiale di partenza per l'estrazione di molti tannini commerciali. Alcune specie comunemente usate come fonte di tannini sono: il sommaco giapponese (*Rhus typhina*) ed il sommaco cinese (*Rhus semialata*), appartenenti alla famiglia delle Anacardiaceae analogamente allo *Schinopsis balansae*, la quercia (*Quercus* spp.), il cerro turco (*Quercus infectoria*) ed il castagno (*Castanea* spp.) tra le Fagaceae, specie di *Acacia* e di *Caesalpinia* tra le Leguminisae ed, infine, alcune specie di *Eucaliptus* tra le Myrtaceae. I tannini sono localizzati principalmente nei vacuoli e nelle cere superficiali dei tessuti vegetali, dove non interferiscono con i processi metabolici cellulari. L'accumulo di tannini può aversi in ogni tipo di tessuto: nelle radici, principalmente nell'ipodermide al di sotto dello strato epidermico suberizzato dove agiscono da protezione nei confronti di patogeni, nei fusti, in particolare nei siti di crescita attiva, come floema secondario e xilema e nello strato compreso tra la corteccia e l'epidermide, dove possono avere un ruolo nella regolazione della crescita di questi tessuti, nei frutti e nelle foglie, cui conferisce un sapore astringente riducendone l'appetibilità da parte degli erbivori, ed, infine, nei semi, localizzati in uno strato compreso tra il tegumento esterno e lo strato di aleurone dove contribuiscono al mantenimento della dormienza. Tessuti contenenti tannini hanno il caratteristico sapore astringente, dove per astringenza si intende un'interazione tra i polifenoli e le proteine e/o glicoproteine salivari con conseguente insolubilizzazione delle molecole proteiche: normalmente, con il procedere del processo di maturazione del frutto o dello sviluppo della foglia si ha un aumento del grado di polimerizzazione e, quindi, del peso molecolare del tannino e, conseguentemente, si ha una perdita di astringenza. Più in generale, questa reazione può essere vista come una strategia della pianta per difendersi da erbivori, oppure può essere considerata nel più complesso meccanismo di resistenza della pianta nei confronti di patogeni, in quanto i tannini ed i prodotti della loro ossidazione (chinoni) possono essere usati per inattivare i sistemi enzimatici del patogeno e per formare una barriera protettiva insolubile contro l'ulteriore avanzata del patogeno. Infine, va ricordato che la capacità dei tannini di legarsi stabilmente con le proteine costituisce un grave inconveniente nei processi di estrazione e purificazione degli enzimi dai tessuti vegetali. Infatti, durante l'omogenizzazione dei tessuti, quando viene distrutta la compartimentazione cellulare, il tannino, prima rigidamente compartimentato, può legarsi irreversibilmente con l'enzima. Quest'inconveniente può essere, in una qualche misura, evitato con l'aggiunta di polivinilpirrolidone (PVP) e/o sostanze antiossidanti, come l'acido ascorbico, al mezzo di estrazione.

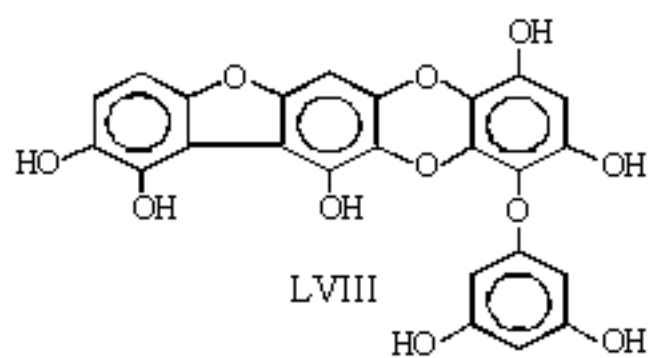
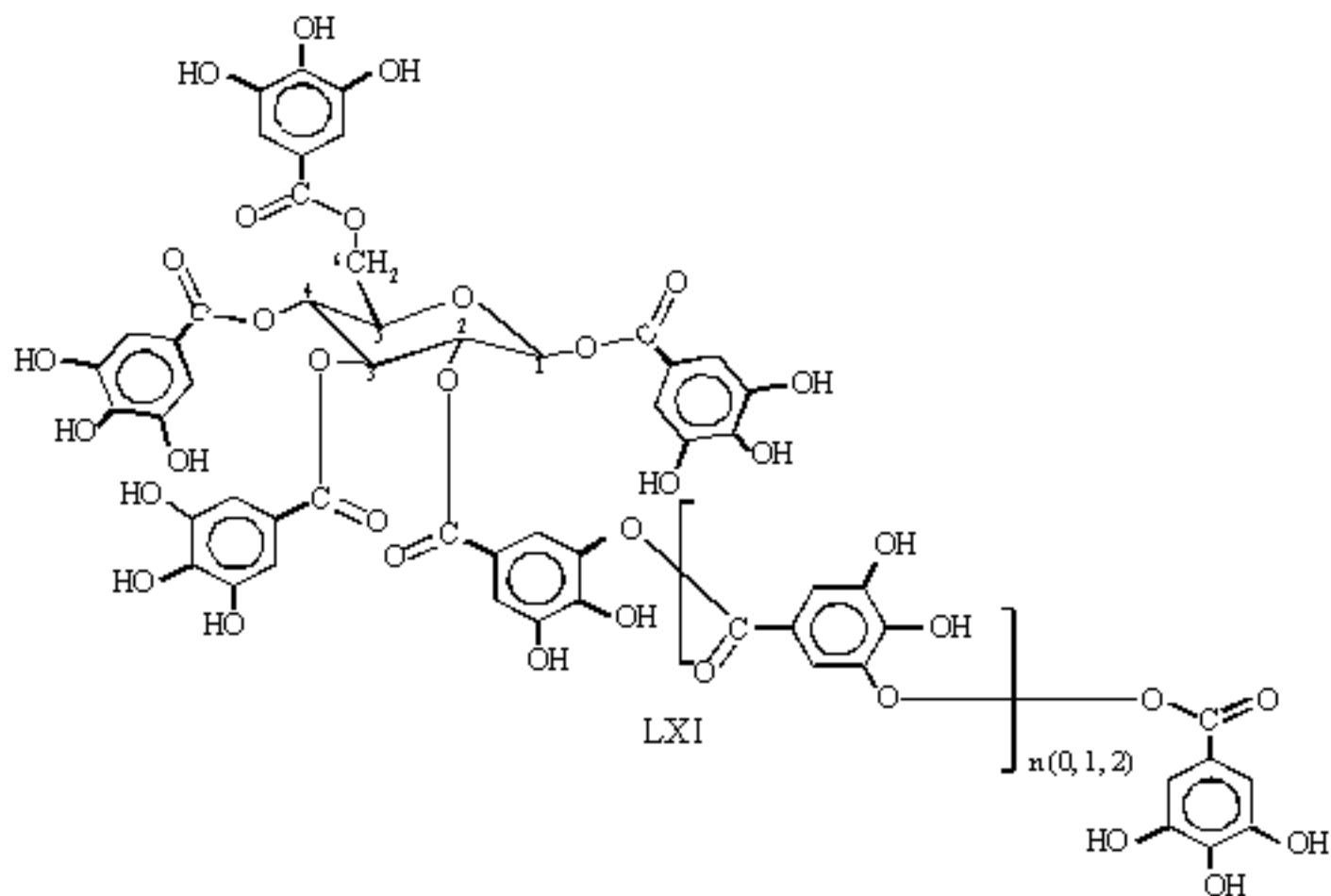
Attualmente i tannini vengono classificati in accordo con le loro caratteristiche strutturali, come suggerito da Freudenberg, che separò i tannini in due classi: tannini idrolizzabili e tannini condensati (proantocianidine). I primi sono quelli che per semplici trattamenti con acidi o basi oppure con enzimi idrolitici (tannasi) producono zuccheri ed acidi fenolici, i secondi non si



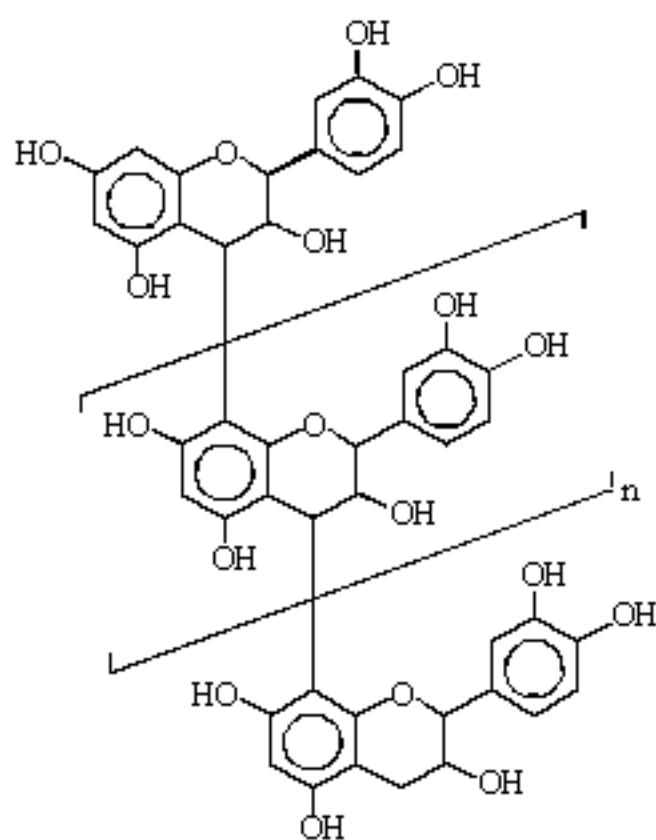
LIX



LX



LVIII



LXII

idrolizzano facilmente (vengono, comunque, attaccati dalla tannasi) e non contengono zuccheri nella loro struttura, basata sullo scheletro del flavano. Recentemente è stata caratterizzata una terza classe di tannini, i florotannini, presenti in molte specie di alghe brune (*Eisenia*, *Fucus*, *Cystophora*, *Chorda*, *Cytoseria*, *Laminaria*, *Bifurcaria*) ed i quali sono formati da unità di floroglucolino unite da legami C-C e/o C-O. In alcuni casi l'anello aromatico può essere aloogenato ed in molti casi sono state identificate molecole con un numero di unità monomeriche superiore ad 8. Una tipica struttura di florotannino è costituita dal fucofuroeckolo (LVIII), isolato da *Eisenia arborea*. Da ultimo, va citata una nuova classe di tannini aventi la struttura di C-glicosidi formati da un flavan-3-olo legato con il suo C₈ o C₆ al C₁ della porzione zuccherina di un ellagitannino. La successiva scoperta di un analogo composto, la mongolicanina, in cui al tannino idrolizzabile è legata una proantocianidina dimera, ha indicato chiaramente l'esistenza di copolimeri di proantocianidine e tannini idrolizzabili, creando così un legame tra le due principali classi di tannini.

Nei tannini idrolizzabili normalmente un monosaccaride, quasi sempre glucosio, od un ciclitolo funge da nocciolo strutturale cui sono legati, tramite legami esteri, vari acidi fenolici, quali acido gallico (gallotannini) ed acido esaidrossidifenico (LIX) (ellagitannini). Gli ellagitannini sono stati così chiamati in quanto nel corso dell'idrolisi producevano una forma lattonica dell'acido esaidrossidifenico, l'acido ellagico (LX), che in realtà non esisteva come tale nella struttura polimerica ma era un'artefatto, prodottosi nel corso dell'idrolisi. Gallotannini ed ellagitannini possono essere correlati tra loro da un punto di vista biosintetico secondo uno schema proposto da Schmidt (figura 4.1.1), in cui il gruppo esaidrossidifenil, che per idrolisi produce acido ellagico, deriva da un accoppiamento ossidativo di due residui galloilici adiacenti del gallotannino. Esempi di tannini idrolizzabili comunemente utilizzati sono il tannino di Cina, estratto da galle di sommaco, ed il tannino di Turchia, estratto da galle di cerro. Entrambi vanno sotto il nome commerciale di acido tannico, che normalmente è una miscela di gallotannini, la cui composizione varia a seconda del materiale usato per l'estrazione ed è difficilmente riproducibile. Questa variabilità è da attribuirsi alla labilità dei legami esteri in ciascun gallotannino contenuto nell'acido tannico. Per blanda idrolisi dell'acido tannico, sia per via chimica che per via enzimatica, si ottengono glucosio ed acido gallico: una struttura fondamentale rappresentativa dei gallotannini presenti nell'acido tannico è data dal penta-O-galloil-β-D-glucosio. La struttura del tannino di Cina (LXI) è rappresentata da un pentagalloilglucosio, cui sono attaccati con legami esteri altri residui galloilici (n= 0, 1 e 2). Il metanolo reagisce con il tannino di Cina rompendo i legami esteri: trattamenti con MeOH danno come primi prodotti pentagalloilglucosio e metil-gallato. Analisi spettroscopiche dell'acido tannico e dei prodotti della metanolisi hanno consentito di attribuire al tannino di Turchia una struttura che somiglia molto a quella del tannino di Cina, le principali differenze sono: l'esistenza di un OH non esterificato nella molecola centrale di glucosio (o comunque un diverso tipo di sostituzione sul C₂ e sul C₄ del glucosio) ed una localizzazione della catena galloilica (n = 1, 2, o 3) sul C₆ dello zucchero centrale. Un caso strutturalmente inusuale di gallotannino è rappresentato dal tannino di Tara, estratto da baccelli di *Caesalpinia spinosa*, una leguminosa dell' America latina, il quale è costituito da una miscela di tetra e pentagalloil esteri dell'acido chinico.

Se i tannini idrolizzabili si ritrovano essenzialmente nelle dicotiledoni, i tannini condensati sono diffusi nella gran parte delle piante vascolari e sono localizzati principalmente in tessuti lignificati ed in tegumenti di frutti in fase di maturazione. Le principali fonti di tannini condensati sono rappresentate da specie quali *Schinopsis lorentzii* e *S. balansae*, *Uncaria gambier*, catecù (*Acacia catechu*), mangrovia (*Rhizophora* sp.), myrtan (*Eucalyptus* sp.) ed *Acacia mearnsii*. Per trattamento acido essi tendono a policondensare, formando prodotti amorfi insolubili (flobafeni), con simultanea formazione di piccole quantità di pigmenti antocianici. I tannini condensati (o flavanici) sono polimeri di flavani, flavan-3-oli (catechine), 5-deossiflavan-3-oli (es. fisetinidolo e robinetinidolo), leucoantocianidine (flavan-4-oli e flavan-3,4-dioli) e peltoginoidi, che vengono indicati anche con il termine di proantocianidine o

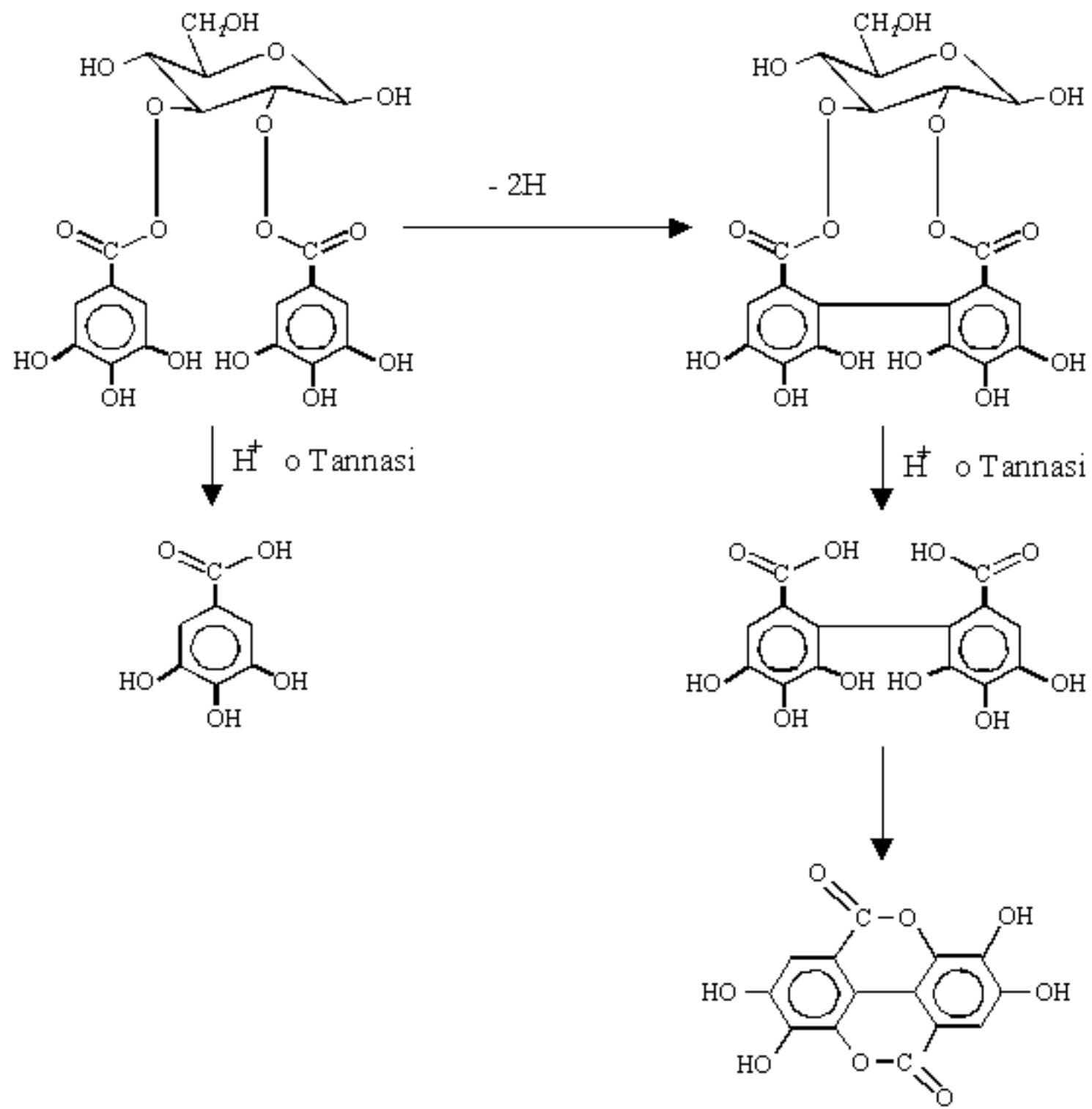


Figura 4.1.1: Biogenesi degli ellagitannini.

proantocianidine condensate (LXII), in quanto si tratta di sostanze incolori che per riscaldamento in ambiente acido producono antocianidine. Le unità monomeriche si legano tra loro a formare dimeri, oligomeri e polimeri tramite legami C₄-C₈ o C₄-C₆; le proprietà astringenti, nulle per i monomeri, cominciano ad apparire con le proantocianidine dimere e diventano via via più significative man mano che il grado di polimerizzazione aumenta, per ridiventare nulle quando il peso molecolare del polimero supera i 3000 dalton. È importante, inoltre, sottolineare che *in vivo* i tannini condensati si ritrovano in forma libera non-glicosilata, fatto inusuale nella chimica dei polifenoli vegetali ed il cui significato biogenetico non è ancora ben noto. È stato suggerito che proantocianidine insolubili, quelle che restano nel tessuto vegetale dopo estrazione con solventi quali acqua, metanolo od acetone, possano ritrovarsi all'interno della parete cellulare, legate covalentemente alla matrice polisaccaridica. Conseguentemente è stata sollevata la questione se tali proantocianidine abbiano o no un ruolo essenzialmente strutturale nella cellula. Inoltre, l'attività biologica dei tannini condensati è piuttosto limitata a causa del loro elevato peso molecolare e della loro conseguente relativa immobilità. Tuttavia, l'assenza di gruppi protettivi sulla loro matrice idrossilata è, probabilmente, la causa del loro importante ruolo nelle interazioni pianta/animale. Quando l'organizzazione cellulare viene distrutta, ad esempio quando un insetto morde un tessuto fogliare, i tannini possono facilmente complessare le proteine, riducendo significativamente l'attività degli enzimi od il valore nutritivo della molecola proteica.

In tabella 4.1.1 sono riportati alcuni esempi di monomeri ritrovati in natura e le corrispondenti proantocianidine: la classe più comune di proantocianidine è costituita dalle procianidine, consistenti di catene di catechina e/o epicatechina unite con legami C₄-C₆ o C₄-C₈. Le proantocianidine più semplici sono quelle dimere tra le quali le più comuni sono le procianidine di tipo B, in cui i monomeri, catechina e/o epicatechina, formano un legame 4→8. Successive addizioni di unità poli-idrossiflavan-3,4-dioli porta alla formazione di proantocianidine più complesse (trimeri, tetrameri, etc.) tramite formazione di legami 4→6 o 4→8. Una variante strutturale delle proantocianidine, che posseggono un pattern tipo floroglucino nell'anello A, è costituito dalle proantocianidine di tipo A, caratterizzate dalla presenza di un secondo legame interflavonoidico, un legame di tipo etere che si forma per accoppiamento ossidativo tra il C₂ di una unità e l'O₅ o l'O₇ di una seconda unità.

Per quanto concerne la reattività dei tannini, si è già detto che la proprietà tipica dei tannini vegetali, che li contraddistingue dalle altre sostanze polifenoliche, è la loro capacità di combinarsi con proteine ed altri polimeri naturali, quali pectine e cellulosa. Durante la concia delle pelli, le catene polipeptidiche di collagene formano legami incrociati con opportune sostanze fenoliche. La prima tappa durante il processo di concia è l'associazione tra i gruppi fenolici ed i siti reattivi della proteina. L'accesso ai siti reattivi viene facilitato in mezzo acido per la formazione di gruppi cationici, a livello di lisina ed idrossilisina in particolare, fenomeno che facilita il rigonfiamento delle fibre: la sostanza tannante deve avere la capacità di penetrare, quindi, negli spazi interfibrillari. Parlando più in generale, i tannini reagiscono con le proteine formando, a seconda dei casi, sia complessi solubili che complessi insolubili: la formazione degli uni o degli altri dipende dalla natura e dalle concentrazioni relative di tannini e proteine, dal pH, dal tenore alcolico e dalla forza ionica del mezzo. Mentre i tannini condensati presentano al di sopra di pH 7-8 proprietà di associazione indipendenti dal pH, i tannini idrolizzabili risultano fortemente legati a pH 3-4, mentre al di sopra di pH 5 le interazioni risultano molto più deboli. È stata determinata l'efficienza dei tannini come precipitanti delle proteine facendoli reagire con le proteine del sangue emolizzate e determinando colorimetricamente l'emoglobina residua: si è definito, in tal modo, un fattore di astringenza relativa come rapporto tra la concentrazione di acido tannico e quella del particolare tannino in esame, che provoca lo stesso grado di precipitazione della proteina. La capacità di precipitare la proteina aumenta regolarmente con l'aumentare del peso molecolare del tannino da 578 a 1134. Analoghi esperimenti condotti con l'enzima β-glucosidasi mostrano che il β-pentagalloyl-D-glucosio rappresenta la configurazione ottimale per la formazione del complesso con la

Tabella 4.1.1: Nomenclatura delle proantocianidine: tipi di proantocianidine e rispettive unità monomeriche.

<i>Classe di Proantocianidina</i>	<i>Unità Monomerica</i>	<i>Pattern di sostituzione</i>						
		<i>3</i>	<i>5</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>3'</i>	<i>4'</i>	<i>5'</i>
Procassinidina	Cassiaflavano	H	H	OH	H	H	OH	H
Proapigeninidina	Apigeniniflavano	H	OH	OH	H	H	OH	H
Proluteolinidina	Luteoliflavano	H	OH	OH	H	OH	OH	H
Procianidina	Catechina	OH	OH	OH	H	OH	OH	H
Profisetinidina	Fisetinidolo	OH	H	OH	H	OH	OH	H
Prorobinetinidolo	Robinetinidolo	OH	H	OH	H	OH	OH	OH
Propeltoginidina	Peltoginano							
Promopanidina	Mopanano							

proteina. Assumendo un PM di 120.000 per la β -glucosidasi, i risultati indicano che una mole di enzima fissano approssimativamente 20 moli di pentagalloyl-glucosio: questo complesso può essere dissociato per trattamento con acetone, che permette un recupero di circa il 75% dell'attività iniziale. Inoltre, le associazioni della gelatina con quantità elevate di tannino sembrano indicare un ruolo molto importante in queste associazioni dei gruppi non polari e delle catene laterali di natura idrofobica, che in questa proteina rappresentano oltre il 50% del contenuto amminoacidico. La capacità di detergenti non-ionici (Tween 80) di dissociare efficacemente i complessi tannino-proteina è da ascrivere alla presenza nella loro struttura di siti idrofobici, con conseguente elevato grado di associazione con le proteine. Queste ultime considerazioni fanno pensare che i legami idrogeno, pur se importanti, non hanno un ruolo preponderante nella formazione di complessi dei tannini con le proteine.

Un altro tipo di reazione di particolare interesse, soprattutto nel settore della conservazione dei prodotti ortofrutticoli, nonché del condizionamento di bevande quali il tè, il vino e la birra, è costituito dalla condensazione ossidativa dei tannini. Composti orto e para-difenolici, monomeri ed oligomeri, danno luogo a reazioni di accoppiamento ossidativo con policondensazione delle subunità monomeriche. L'ossidazione spontanea ad opera dell'ossigeno molecolare è minima nell'intorno di pH 2,5, mentre diventa via via più significativa in soluzione acquosa al di sopra di pH 3,5-4,6, per diventare molto rapida in ambiente alcalino od in presenza di enzimi ossidasi, quali polifenolossidasi, laccasi e perossidasi. Il meccanismo dell'accoppiamento può essere allo stesso tempo sia di natura ionica che radicalica, con formazione di legami C-C e C-O-C tra i diversi nuclei aromatici (figura 1).

Si è già detto che le caratteristiche di astringenza conferite dai tannini ai tessuti vegetali che li contengono e l'attività biologica dei tannini e dei prodotti della loro ossidazione nei confronti di vari microorganismi fanno sì che questi composti svolgano un ruolo molto importante nei meccanismi di difesa della pianta. I tannini possono fungere da riserva di fenoli tossici, i quali vengono mobilitati in risposta ad processo infettivo, e, successivamente, polimerizzando possono contribuire alla formazione del tessuto necrotico, che agisce da barriera insolubile nei confronti del patogeno. La presenza dei tannini nei tessuti vegetali ne riduce l'appetibilità da parte di animali erbivori ed influisce negativamente sulla digeribilità dei principali nutrienti. I siti di azione dei tannini sono la cavità orale, dove la rottura delle cellule, conseguente alla masticazione, espone proteine e carboidrati all'azione dei tannini con conseguente sensazione di astringenza, ed il tratto gastrointestinale dove i tannini non vengono assorbiti e reagiscono con carboidrati e proteine riducendone la digeribilità. Sia l'amido che la cellulosa vengono complessati da tannini, specie dai tannini condensati: l'amido tende a formare cavità idrofobiche al cui interno possono penetrare tannini ed altre molecole lipofile, cellulosa ed altri carboidrati di parete possono interagire con i tannini in maniera analoga a quella con cui si legano alla lignina. La digeribilità dei carboidrati può essere negativamente influenzata dai tannini per effetto della loro azione inibente sugli enzimi idrolitici. L'insolubilizzazione delle proteine da parte dei tannini determina l'inibizione di molti enzimi e rendono la proteina tannata indisponibile da un punto di vista nutrizionale, in quanto non può essere idrolizzata dalla proteasi. I tannini, ed in particolare gli ellagitannini, sono degli inibitori endogeni della crescita di numerose specie di insetti infestanti, agendo da sostanze antibiotiche o da deterrenti antinutrizionali nei confronti di insetti ed afidi. L'acido ellagico, ad esempio, inibisce fortemente la crescita di un fitofago del tabacco, l'*Heliothis virescens*, analogamente gli ellagitannini si sono rivelati efficaci nel contrastare l'infestazione di diverse specie di insetti, quali *Schizaphis graminum* e *Myzus persicae*, mentre i tannini condensati si sono rivelati efficaci nei confronti di *Gossypium hirsutum*.

I tannini, inoltre, sono dei potenti antibiotici in grado di difendere i tessuti vegetali dai marciumi di origine fungina grazie alla loro attività inibitoria nei confronti degli enzimi idrolitici (cellulasi, pectinasi, xilanasi) utilizzati dal patogeni per penetrare nelle cellule vegetali, alla loro azione sulle membrane cellulari del patogeno (inibizione della fosforilazione ossidativa), ma anche grazie alla loro attività antiossidante, dovuta alla capacità dei tannini di agire sia da substrato

ossidabile che da scavenger di radicali liberi, in modo da proteggere dall'ossidazione altri costituenti cellulari. E' noto, infatti, che la suscettibilità ai marciumi dei tessuti vegetali aumenta con il progredire della fase di senescenza in cui si verificano reazioni di ossidazione mediate da radicali liberi: la presenza di antiossidanti ritarda la perdita di integrità da parte delle membrane cellulari inibendo la produzione di perossidi, la degradazione degli acidi grassi dei lipidi polari e la produzione dell'etilene. La tossicità dei tannini nei confronti di molti patogeni fungini è ben documentata ed, in generale, tests *in vitro* non hanno evidenziato sostanziali differenze tra la tossicità dei tannini idrolizzabili e quella dei tannini condensati. Ad esempio, la resistenza della fragola nei confronti dei marciumi botritici viene correlata al tenore di proantocianidine ma è probabile che anche i tannini idrolizzabili presenti nel frutto esercitino un'attività inibitoria nei confronti del fungo. I due tipi di tannino sono entrambi efficaci nel contrastare lo sviluppo dell'*Aspergillus niger* e del *Chaetomium cupreum*. Altri esempi di funghi filamentosi inibiti dal tannino sono rappresentati da *Colletotrichum graminicola*, *Penicillium* spp., *Gloeophyllum trabeum*, *Trichoderma viride* e vari altri patogeni in grado di svilupparsi sui tessuti vegetali sia in fase di pre-raccolta che di post-raccolta.

6.4.2 Lignina

Con il termine lignina si indica uno dei principali tipi di polimeri fenolici che, nonostante il nome, si ritrova come costituente più o meno abbondante delle pareti cellulari di tutte le piante vascolari, comprese la specie erbacee. E' esclusa la presenza di lignina in piante non vascolari, quali alghe e funghi, mentre nei muschi è stata riscontrata la presenza di polimeri fenolici insolubili, che, in assenza di prove definitive circa la loro struttura, vengono definiti lignino-simili. L'uso di una tale terminologia deriva dall'inadeguatezza delle metodologie analitiche di estrazione e caratterizzazione di questi polimeri, in genere incapaci di isolare la lignina in una forma inalterata (lignina nativa).

La lignina è presente nella matrice non-cellulosica delle pareti cellulari in stretta associazione con la matrice cellulosica e con gli -OH fenolici legati covalentemente o tramite legami idrogeno ai carboidrati della parete. Legami covalenti possono aversi anche con le proteine della parete, è stato anzi suggerito che uno dei primi stadi della lignificazione possa essere la formazione di legami incrociati con la proteina della parete primaria durante la polimerizzazione dei costituenti monomerici della lignina. Oltre che nelle pareti cellulari dei tessuti conduttori, la lignina si ritrova, anche, in pareti di radici, frutti, gemme e corteccia. Il processo di lignificazione della parete ha inizio dopo la deposizione dei costituenti polisaccaridici e verso la fine del processo di crescita cellulare: in genere, la lamella mediana e la parete primaria risultano più lignificate che non la parete secondaria. La lignina contribuisce alla forza compressiva della parete cellulare formando una fitta rete attraverso la matrice, che lega fortemente le microfibrille cellulosiche. Questo processo è stato considerato un fattore decisivo nell'adattamento delle piante all'habitat terrestre, in quanto solo la lignificazione delle pareti rende possibile la formazione di strutture rigide di sostegno in piante legnose ed alberi nonché la formazione di tessuti conduttori per il trasporto di acqua e di altri nutrienti. Infine, va ricordato il ruolo della lignina nella protezione della parete dall'attacco di agenti fisici, chimici e biologici.

Nel 1933 fu postulato da Erdtmann che la lignina si formasse per deidrogenazione enzimatica degli alcoli p-cumarilico (LXIII), coniferilico (LXIV) e sinapilico (LXV), composti fenilpropanoidici la cui porzione aromatica viene indicata con i prefissi p-idrossifenil, guaiacil e siringil. Tale ipotesi fu successivamente confermata da Freudenberg, Kratzl, Neish ed altri, cui si debbono importanti contributi circa la struttura e la biosintesi della lignina, ottenuta in forma oligomerica *in vitro* facendo polimerizzare gli alcoli cinnamoilici con l'ausilio di laccasi di origine fungina o con varie perossidasi. Il materiale polimerico così ottenuto permise di caratterizzare con una buona approssimazione la struttura della lignina. In figura 4.2.1 è riportata la struttura proposta da Nimz nel 1974 per la lignina di faggio (LXVI) sulla base di dati analitici, esperimenti modello e ricerche di natura sia biosintetica che degradativa.

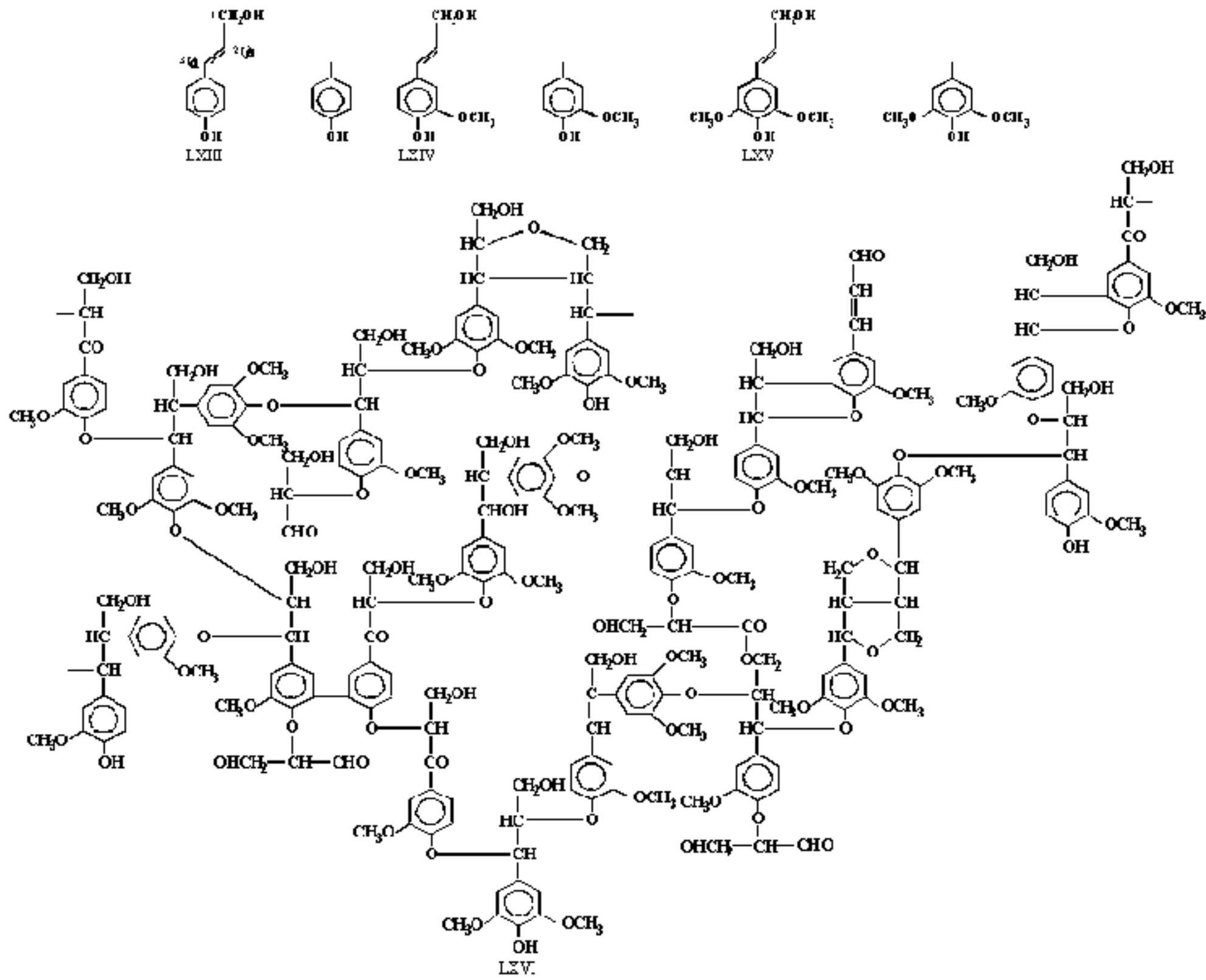


Figura 4.2. 1: Struttura di Nimz della lignina di faggio ed unita strutturali presenti nella lignina.

L'estrazione della lignina dai tessuti vegetali non è un'operazione facile, in quanto tutte le procedure usate coinvolgono l'uso di reagenti piuttosto aggressivi, che possono modificarne la struttura. Sottoponendo il materiale vegetale ad estrazione blanda con etanolo al 95%, a temperatura ambiente e per molti giorni, si riesce a solubilizzare una piccola percentuale ($\cong 5\%$) della lignina contenuta nel materiale legnoso, senza provocare modificazioni della struttura originale: questa lignina viene chiamata lignina nativa o lignina di Brauns. La composizione monomerica della lignina varia a seconda della specie esaminata. Normalmente le lignine vengono classificate come guaiaciliche, guaiacil-siringiliche o guaiacil-siringil-p-idrossifeniliche, a seconda delle aldeidi liberatesi in seguito a procedura di degradazione ossidativa in ambiente alcalino od acido. Non esiste una tecnica di degradazione ottimale che possa stabilire l'esatto rapporto tra i monomeri all'interno del polimero, le tecniche più usate sono l'ossidazione con nitrobenzene in ambiente alcalino, l'ossidazione con NaOH e CuO, l'ossidazione con permanganato, l'acidolisi con diossano ed HCl 2N e la tioacidolisi con $\text{BF}_3/\text{C}_2\text{H}_5\text{SH}$. La degradazione ossidativa della lignina produce aldeidi aromatiche a partire da un benzenoide che possieda un -OH in posizione para rispetto ad una catena alifatica con un carbonio α impegnato in un doppio legame (β -degradazione). Pertanto la p-idrossibenzaldeide, la vanillina e la siringaldeide rivelano la presenza nella lignina di alcool p-cumarilico, coniferilico e sinapilico, rispettivamente, quali unità monomeriche. Le gimnosperme contengono normalmente una lignina guaiacilica, le angiosperme una lignina del tipo guaiacil-siringilico mentre le monocotiledoni, in particolare cereali ed altre colture erbacee, contengono tutti e tre i monolignoli.

La biosintesi degli alcoli cinnamili parte dagli esteri attivati degli acidi cinnamici i quali vengono trasformati in alcoli tramite un processo riduttivo in due stadi, il primo dei quali produce un'aldeide, specifico del pathway biosintetico della lignina. Il primo stadio viene catalizzato da una cinnamoyl-CoA:NADPH ossidoriduttasi, nel secondo stadio si ha la riduzione dell'aldeide catalizzata da una alcool cinnamico deidrogenasi NADP⁺-dipendente (CAD) (figura 4.2.2).

I monolignoli così formati nel citoplasma vengono prima trasformati nei rispettivi glucosidi (p-cumaril- β -glucoside, coniferina e siringina), in cui una molecola di glucosio si lega con un ponte etero all'-OH fenolico, e successivamente vengono polimerizzati a lignina. A seconda delle specie vegetali, quantità più o meno cospicue di monolignoli vengono anche utilizzate per produrre lignani e parte della componente aromatica della suberina. I derivati glucosidici dei monolignoli sono considerati la forma di trasporto delle unità monomeriche attraverso le membrane cellulari fino alla parete, il sito della lignificazione, dove per azione di un β -glucosidasi vengono rigenerati gli agliconi. Un'altra ipotesi suggerisce che i glucosidi agiscano semplicemente da riserva, utilizzata per approvvigionare di precursori nelle cellule in fase di lignificazione.

La polimerizzazione dei monolignoli inizia con l'ossidazione degli -OH fenolici dei monomeri con formazione di fenossiradicali mesomerici, caratterizzati da un tempo di semi-vita molto breve, i quali reagiscono rapidamente per dare lignina e per formare legami tra la lignina ed i polisaccaridi della parete. Nel processo di polimerizzazione possono essere coinvolti due enzimi ossidativi: la laccasi e la perossidasi. La laccasi è una fenolossidasi, contenente rame, che catalizza la reazione **1** in cui si produce il radicale, mentre il Cu^+ del gruppo prostetico viene riossidato da ossigeno molecolare (reazione **2**). Le perossidasi sono presenti nelle piante in varie isoforme, che possono differire tra loro anche nella struttura primaria. Nel processo di lignificazione sono coinvolte delle specifiche perossidasi di parete, localizzate all'interno della parete oppure legate alla parete con legami covalenti, le quali necessitano di H_2O_2 per la produzione dei radicali. La partecipazione di laccasi e perossidasi nella formazione della lignina può essere valutata ricorrendo a reazioni colorimetriche, che utilizzano substrati artificiali, quali la siringaldazina, che viene sottoposta a reazioni di ossidazione in presenza di laccasi ed O_2 o di perossidasi ed H_2O_2 : il prodotto dell'ossidazione è un chinone di colore rosso intenso. Applicando soluzioni di siringaldazina su diversi campioni di legno, provenienti sia da

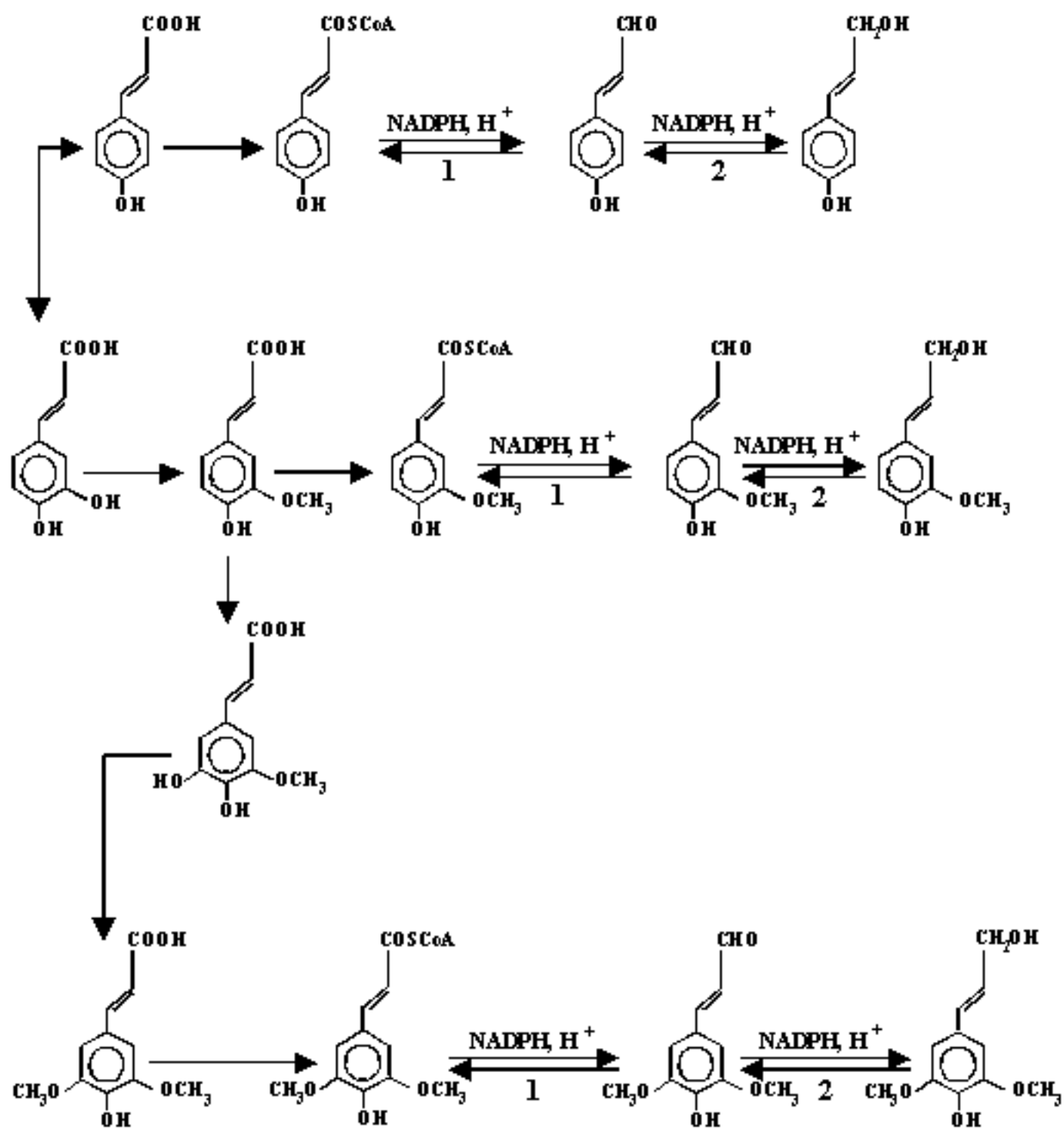


Figura 4.2.2: Biogenesi dei monolignoli. Oltre agli enzimi del metabolismo fenilpropanoico, gli altri enzimi sono: 1=cinnamil-CoA:NADPH ossidoreduttasi; 2=cinnamil alcol deidrogenasi.

angiosperme che da gimnosperme, non si osserva la comparsa di una colorazione rossa indicante la presenza di laccasi. Se, invece, si aggiunge H_2O_2 si osserva un alone rosso, nei tessuti xilematici adiacenti il cambio, indicante la presenza di perossidasi. Questo ed altri esperimenti, fanno propendere per un ruolo quasi esclusivo delle perossidasi nei fenomeni di incipiente lignificazione.

I radicali, formati in seguito alla reazione di ossidazione, possono dimerizzare, formando i dilignoli, i quali possono idratarsi, formando una forma chimica stabile, oppure possono reagire con un altro radicale, formando un radicale trimero. Quest'ultimo può idratarsi o reagire ancora con un radicale. Gli oligomeri stabili, a loro volta, possono riossidarsi, reagendo con una forma radicalica, e produrre altre forme radicali reattive: una sequenza di reazioni non-enzimatiche e randomizzate, del tipo di quelle descritte, porta alla formazione di polimeri di lignina che permeano la matrice della parete cellulare (figura 4.2.3).

Nel corso della biosintesi della lignina, teoricamente, sono individuabili tre diversi momenti per il controllo dell'intero processo: l'approvvigionamento dei precursori, il trasporto dei monomeri nella parete cellulare ed il processo di polimerizzazione. Per quanto concerne il primo stadio, enzimi chiave sono la fenilalanina-ammonio-liasi e le cinnamil:CoA ligasi, la cui attività è effettivamente correlata al tenore di lignina, anche se è difficile stabilire un ruolo regolatore per due enzimi che sono coinvolti in tutte le vie biosintetiche del metabolismo fenilpropanoidico. Altri enzimi chiave considerati sono la cinnamil alcool deidrogenasi (CAD) e le perossidasi, la cui attività è direttamente correlata all'accumulo di lignina. Ma anche in questo caso è difficile stabilire se questi enzimi abbiano un ruolo regolatore, in particolare per le perossidasi, le quali esistono in diverse forme isoenzimatiche, difficilmente caratterizzabili ed identificabili, e non tutte coinvolte nella biosintesi della lignina. Un ultimo potenziale punto di regolazione del processo di polimerizzazione può essere rappresentato, una volta che i precursori siano stati trasportati nella parete, dalla liberazione dei monolignoli liberi dai rispettivi glicosidi.

Per quanto concerne, infine, la degradazione della lignina, esiste un ampio range di microrganismi capaci di degradare, parzialmente o completamente, questo polimero: da alcuni funghi del legno fino ad alcuni batteri ed antinomiceti, meno efficaci, però, dei funghi. Circa i meccanismi coinvolti nei processi degradativi, si ritiene che laccasi e perossidasi (ligninasi o perossidasi della lignina), prodotte dal microrganismo, svolgano un ruolo molto importante in questo processo, anche se queste ipotesi non sono supportate da esperimenti condotti sulla lignina nativa. In particolare, è stato postulato che la perossidasi in presenza di H_2O_2 induca una serie di reazioni, comprese una β -degradazione ed una ossidazione (ad aldeide) del C(α). L'introduzione di funzioni α -carboniliche nel polimero facilita il processo di depolimerizzazione, cui partecipano altri enzimi inclusi quelli in grado di catalizzare la rottura dei legami β -O-arile e la fissione dell'anello aromatico.

La lignina forma legami covalenti con cellulosa, pectine e proteine strutturali quando viene sintetizzata in presenza di questi composti. Inoltre, essa forma legami esteri con poliesteri degli acidi grassi, come quelli presenti nella cutina, con conseguente formazione della suberina: le cellule suberizzate vengono difficilmente penetrate dai patogeni. Anche gli acidi idrossicinnamici formano dei complessi con polisaccaridi, proteine, suberina e cutina tramite legami esteri. Ne consegue che sia la lignina che gli acidi cinnamici provocano nelle pareti cellulari delle modificazioni che contribuiscono alla resistenza dei tessuti vegetali nei confronti delle malattie. Ed infatti, la presenza, la velocità ed il grado di lignificazione in una cellula vegetale sono state spesso messe in correlazione al grado di resistenza in molte combinazioni ospite-parassita. Ad esempio, il processo di lignificazione delle pareti cellulari viene stimolato sia all'interno di lesioni virali che nelle zone adiacenti alla lesione, un analogo fenomeno si osserva nelle cellule necrotiche dell'ospite formatesi attorno ai nematodi: in genere questo tipo di risposta si manifesta nelle specie e/o varietà resistenti piuttosto che in quelle suscettibili. Piante di cetriolo resistenti a *Cladosporium cucumerinum* depositano lignina molto più rapidamente che non le piante suscettibili. Il ruolo della lignificazione come parte di un più generale meccanismo di risposta difensiva dei tessuti vegetali viene suggerito da esperimenti

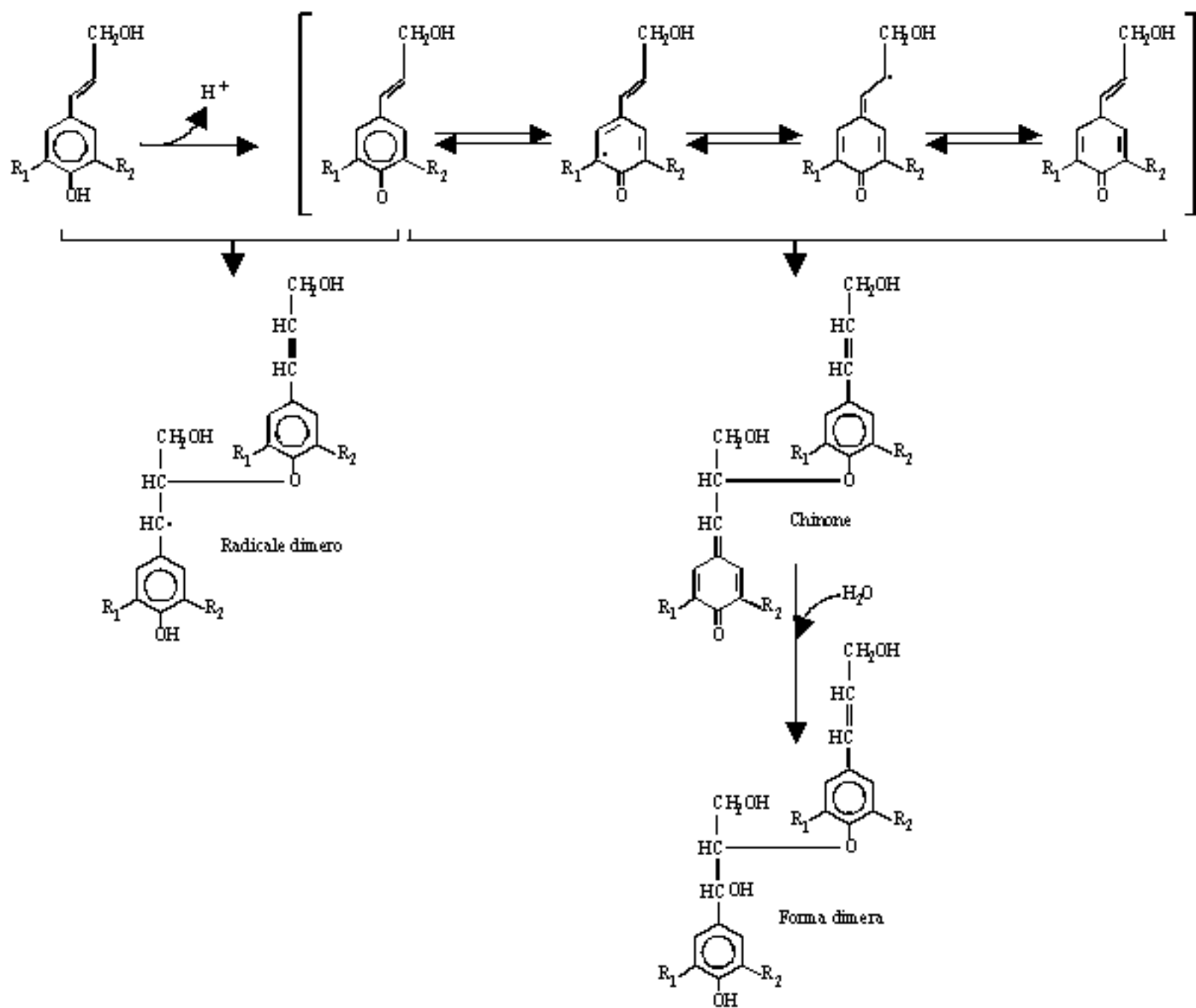


Figura 4.2.3: Prime reazioni, enzimatiche e radicaliche, di polimerizzazione dei monolignoli.

che dimostrano come l'induzione della resistenza nell'ospite è spesso associata ad un'aumentata deposizione di lignina. Ad esempio, mandarini trattati con etilene acquisiscono una maggiore resistenza nei confronti del *Colletotrichum* ed nello stesso tempo accumulano una maggiore quantità di composti fenolici e di lignina rispetto ai frutti non trattati. Analogamente, dischetti di carota trattati con conidi di *Botrytis cinerea* devitalizzati termicamente diventano più resistenti a questo patogeno e presentano un'attività perossidasi più elevata ed un più elevato tenore di lignina e suberina rispetto ai dischetti non trattati. La formazione di strati di lignina (papillae) tra la parete cellulare e la membrana plasmatica, come pure la lignificazione della parete esterna, sembra essere, quindi, un'importante risposta delle cellule all'instaurarsi di diversi processi infettivi. Si ritiene, anzi, che il processo di lignificazione possa rappresentare un'espressione generalizzata di resistenza, in quanto tutte le piante vascolari hanno la capacità di sintetizzare lignina.

In generale, si può affermare che il processo di lignificazione può intervenire in diversi modi nelle strategie difensive della pianta. La lignina od il processo di lignificazione possono partecipare al meccanismo di difesa attuato dall'ospite nei confronti del patogeno costituendo una barriera meccanica, in grado di contrastare la crescita del patogeno, tramite delle modificazioni chimiche delle pareti cellulari dell'ospite in modo da renderle più resistenti nei confronti degli enzimi degradativi del patogeno. Ovvero, possono intervenire aumentando la resistenza delle pareti alla diffusione di tossine dal patogeno verso l'ospite e di nutrienti dall'ospite verso il patogeno, od, infine, producendo precursori tossici e radicali liberi, che, unitamente al processo di lignificazione al quale partecipano, servono a circoscrivere lo sviluppo del processo infettivo.

6.4.3 Melanine

Le melanine sono dei pigmenti di natura fenolica colorati, dal marrone al nero, e ad elevato peso molecolare, presenti in tessuti animali, vegetali ed in microorganismi. Esse si formano in seguito a reazioni di polimerizzazione di substrati orto-chinonici derivanti dall'ossidazione enzimatica dei fenoli e, normalmente, sono presenti come granuli in cui la melanina può essere combinata con proteine. Questi pigmenti, la cui esatta struttura non è nota ed i quali sono presenti nella pianta durante il normale corso della crescita od in seguito a stress biotici ed abiotici ed esposizione all'aria, non sono essenziali per la crescita e per lo sviluppo delle piante ma, piuttosto, ne aumentano le capacità di sopravvivenza e di competitività in particolari situazioni.

Ad esempio, quando i tuberi di patata vengono danneggiati meccanicamente, durante la raccolta, la manipolazione ed il loro trasporto, si formano nel sito danneggiato, al di sotto dell'epidermide, delle macchie nere riconducibili alla formazione di pigmenti scuri, i quali vengono identificati come melanine (dopamelanine), prodotte dall'ossidazione enzimatica della tirosina, ed i quali costituiscono il principale problema qualitativo per la patata a livello industriale. Analogamente, si osserva che, quando le piante di soia (*Glycine max* [L.]) vengono esposte al momento della fioritura a temperature inferiori ai 15°C, si ha la comparsa di una pigmentazione marrone sui tegumenti dei semi, formatasi in seguito ad ossidazione enzimatica del catecolo (catecolmelanine). Catecolmelanine sono anche i pigmenti neri identificati in seme di girasole e di cocomero o nel legno di *Dyospyros*: si ritiene che questa classe di melanine sia abbastanza diffusa nel regno vegetale essendo stata riscontrata la sua presenza in specie molto diverse da un punto di vista filogenetico (Cucurbitales, Campanulales, Ustilanginales).

Le melanine sono sostanze difficili da isolare e purificare, procedure che richiedono trattamenti piuttosto drastici. Il pigmento può contenere nella sua struttura porzioni proteiche, lipidiche e carboidrati assieme ad un nucleo polimerico, contenente parti chinoniche, idrochinoniche e semichinoniche. Quest'ultimo polimero rappresenta il gruppo cromoforo del pigmento: non è nota la misura ed il modo in cui esso è legato alle altre porzioni nella melanina ed, inoltre, esso può contenere altre specie fenoliche presenti nel mezzo al momento dell'ossidazione dei suoi precursori. Pertanto, molti studi relativi all'approfondimento delle conoscenze sulle melanine

sono indirizzati verso l'identificazione dei precursori (tirosina, dopa, catecolo, etc.) e dei sistemi enzimatici in grado di catalizzare la polimerizzazione ossidativa. La simultanea presenza di enzima e substrati, comunque, non sfocia sistematicamente nella formazione di melanine, in quanto la presenza di riducenti, come l'acido ascorbico, può inibire la melanogenesi.

Le melanine sono, generalmente, insolubili in acqua, in soluzioni acide e nei comuni solventi organici. In alcuni casi, in cui il cromoforo è ampiamente coniugato con carboidrati e proteine, il pigmento risulta essere solubile in acqua. Normalmente le melanine vengono estratte con soluzioni alcaline concentrate e quindi precipitate con acidi, successivamente, sottoponendo il pigmento ad idrolisi in ambiente acido (HCl 6N per diversi giorni), si allontanano proteine, carboidrati e lipidi. Il pigmento viene sbiancato da H₂O₂, ridotto da sodio tiosolfato, idrogeno solfuro e ioni argento e riossidato da ferrocianuro di potassio e sodio ipoclorito. Il colore nero delle melanine è dovuto all'assorbimento da parte del pigmento di tutte le lunghezze d'onda dello spettro visibile: la percentuale di assorbimento è maggiore nella regione dell'UV e diminuisce progressivamente con l'aumentare della lunghezza d'onda in direzione del lontano rosso. Spesso tale diminuzione di assorbanza è correlata linearmente con l'aumentare di λ , pertanto, la pendenza della funzione lineare viene usata per caratterizzare le melanine naturali anche se, generalmente, non permette di discriminare tra i diversi tipi di melanine. Gli spettri IR di tutte le melanine presentano dei picchi intorno ai 3 μm attribuibili a legami -OH ed -NH e dei picchi intorno ai 6 μm riconducibili a legami carbonilici coniugati.

Lo stadio iniziale della biosintesi delle melanine è l'ossidazione enzimatica dei composti fenolici catalizzata dalla PPO², un enzima che manifesta un'attività monofenolo monossigenasi (tirosinasi, cresolasi) o difenolo ossigeno ossidoriduttasi (catecolossidasi) od entrambe. Substrati della PPO sono vari composti fenolici, ad esempio i principali substrati della PPO presenti in tuberi di patata sono la tirosina, l'acido clorogenico ed, in misura minore, l'acido caffeico: si ritiene, comunque, che sia la tirosina il substrato fenolico responsabile dei fenomeni di pigmentazione. Le melanine derivate dalla DOPA (diidrossifenilalanina), comunemente responsabili della pigmentazione nera nei tessuti animali, si formano per ossidazione enzimatica della tirosina catalizzata dall'enzima tirosinasi secondo lo schema di Raper-Mason (Figura 4.3.1). Nei primi stadi della biosintesi la tirosina viene ossidata enzimaticamente in modo da produrre il corrispondente composto orto-di-ossidrilato, la dopa, e successivamente il dopachinone. Quest'ultimo composto, tramite un riarrangiamento intramolecolare spontaneo ed irreversibile, viene convertito in acido 5,6-diidrossiindol-2-carbossilico (leuco-composto), il quale, successivamente viene convertito nella forma chinonica (dopacromo) di colore rosso. Lo stadio successivo è la formazione del 5,6-diidrossiindolo a partire dal dopacromo, il quale viene decarbossilato e riarrangiato. Una ulteriore reazione di ossidazione produce il 5,6-indolchinone. Questi composti subiscono, successivamente, una serie di reazioni di polimerizzazione non enzimatica con formazione di legami incrociati, il cui prodotto finale viene chiamato **eumelanina**, un polimero di colore nero contenente azoto. In presenza di gruppi tiolici può verificarsi una rapida reazione di addizione nucleofila del gruppo tiolico con il dopachinone e conseguente formazione di derivati tioeteri della dopa. In molti sistemi biologici particolare importanza riveste la reazione con la cisteina, che porta alla formazione della cisteinildopa. Successive reazioni di ossidazione e polimerizzazione portano alla formazione di melanine contenenti zolfo di colore rosso-scuro, comunemente chiamate **feomelanine**. Una terza classe di melanine, **allomelanine**, è costituita da pigmenti polimerici di colore nero i quali provengono dalla ossidazione di difenoli non contenenti azoto, quali il catecolo. La sintesi delle catecolmelanine (Figura 4.3.2) procede attraverso una serie di radicali liberi e di addotti chinone-catecolo, tutti questi prodotti dimeri sono stati identificati in sistemi modello come prodotti dell'ossidazione enzimatica del catecolo. Il primo stadio della melanogenesi a partire da catecolo è la formazione dell'o-benzochinone. Da questo punto in poi non è chiara la

² Spesso in letteratura i termini polifenolossidasi, fenolasi, tirosinasi e catecolossidasi vengono usati come sinonimi.

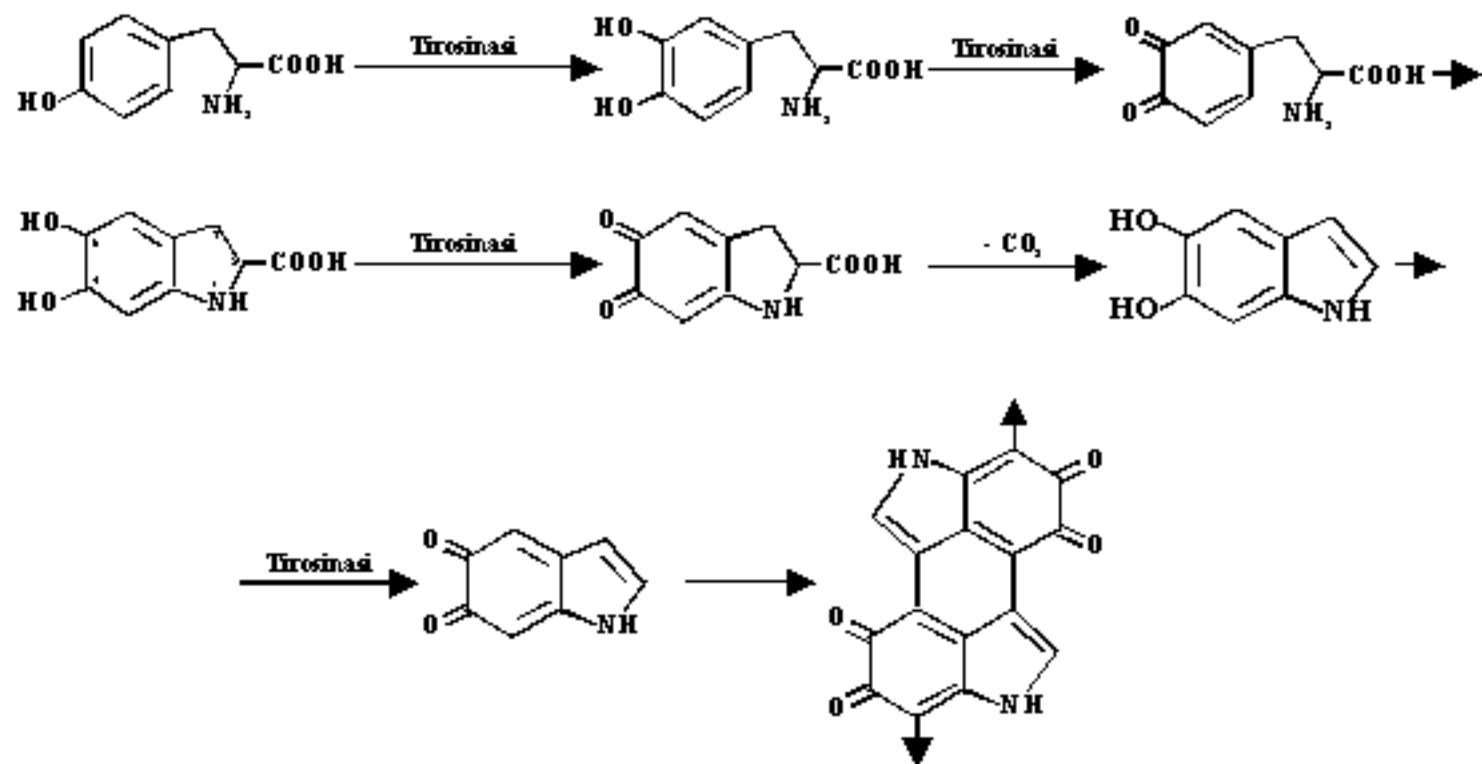


Figura 4.3.1: Schema di Raper-Mason per la biosintesi delle dopamelanine a partire da tirosina.

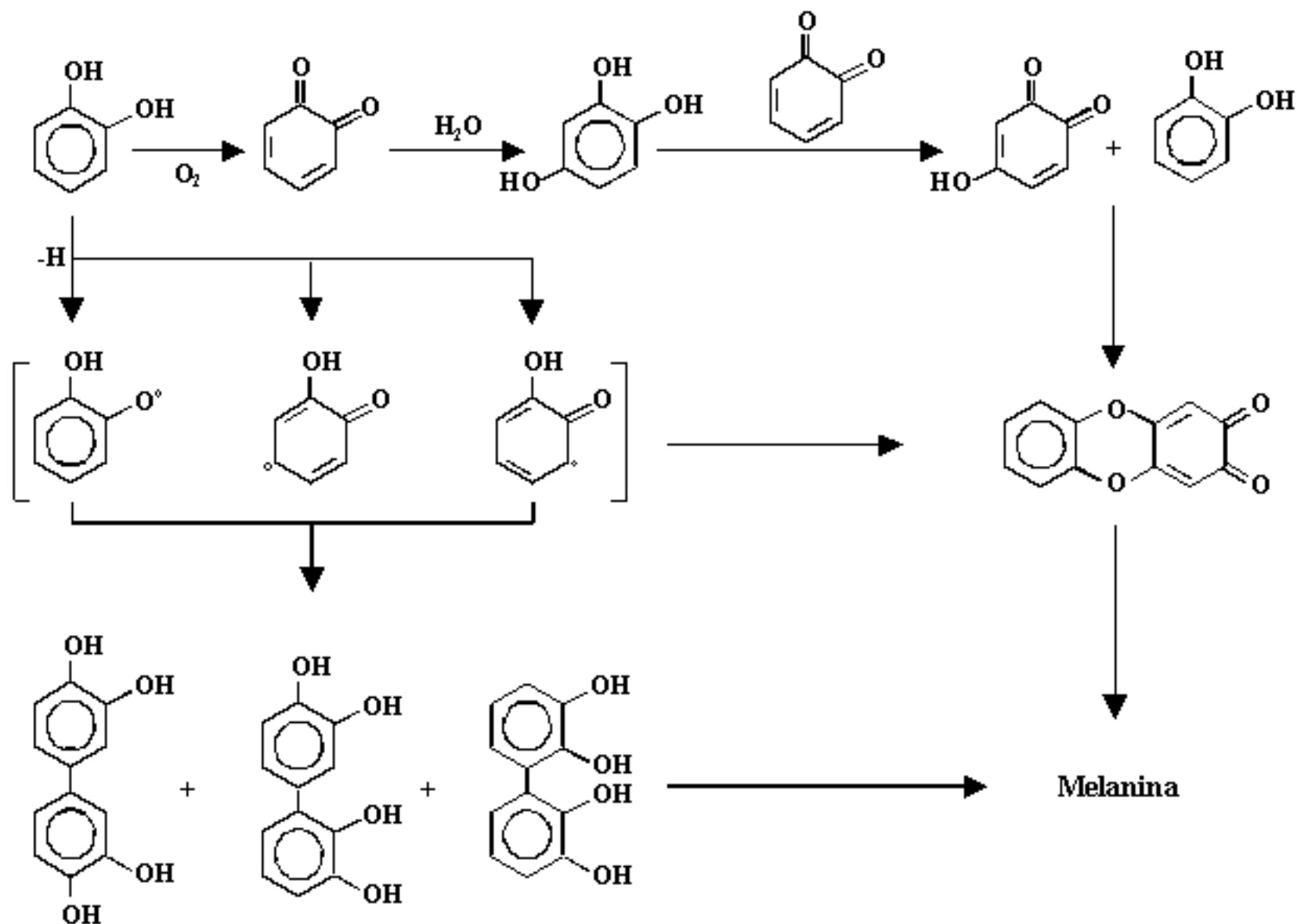


Figura 4.3.2: Biosintesi delle catecolmelanine.

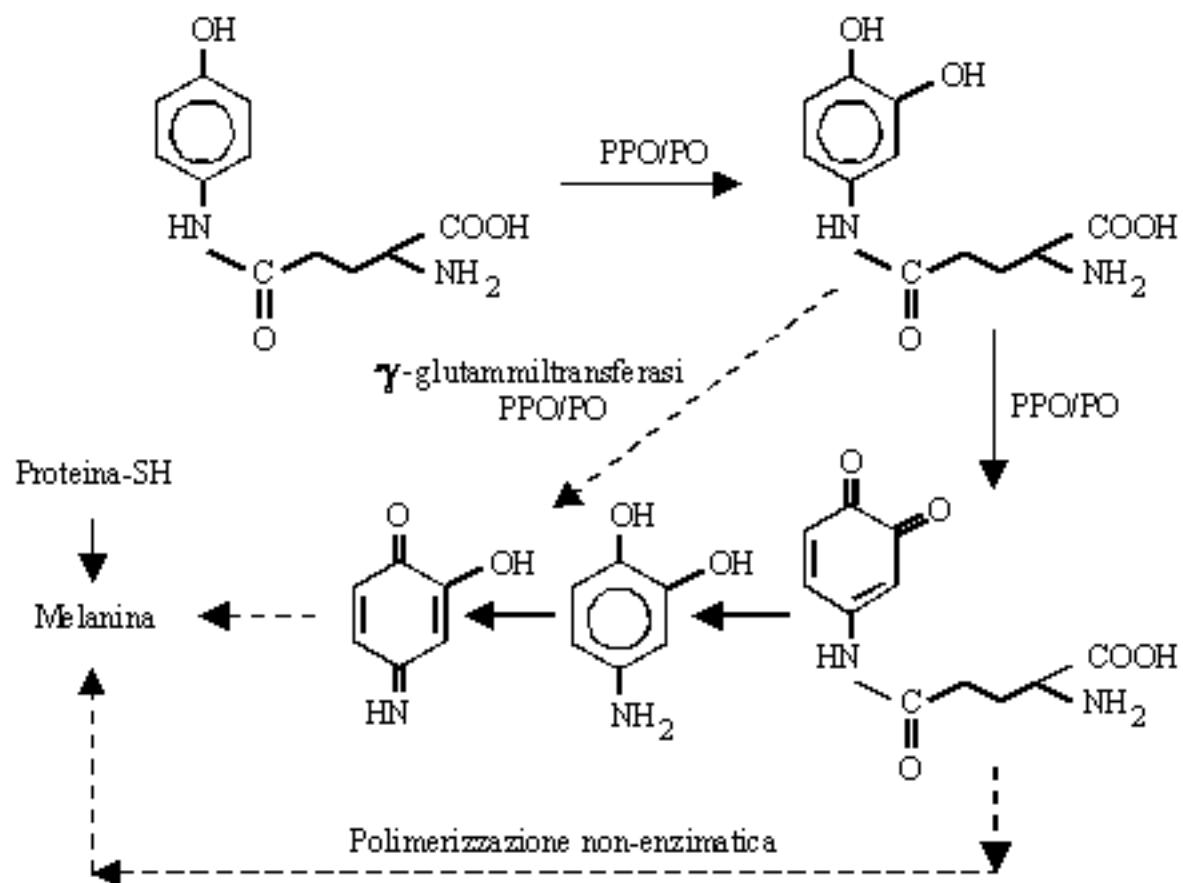


Figura 4.3.3: Biosintesi di γ -glutamminil-3,4-diidrossibenzene melanine a partire da γ -glutamminil-4-idrossibenzene.

sequenza delle reazioni, ma è possibile che oltre a radicali si formino composti quali l'idrossi idrochinone, che reagendo con l'o-benzochinone forma idrossichinone e catecolo. Successive reazioni di condensazione e polimerizzazione di questi intermedi, con conseguente formazione di legami C-C e C-O, portano alla formazione delle catecolmelanine. Inoltre, le specie chinoniche prodotte dall'attività catalitica della PPO, comprese quelle derivanti da composti come l'acido clorogenico e l'acido caffeico ed altri orto-difenoli presenti nei tessuti vegetali, possono prendere parte a varie altre reazioni con gruppi nucleofili (tioli, tioeteri, ammine primarie e secondarie, gruppi ossidrilici) di biopolimeri. In alcuni casi queste reazioni portano alla formazione di legami incrociali all'interno del materiale polimerico.

Le melanine nelle pareti cellulari del fungo comune (*Agaricus bisporus*) possono esser fatte derivare da γ -glutaminil-4-idrossibenzene (GHB) e γ -glutaminil-3,4-diidrossibenzene (GDHB), due composti presenti nel fungo (Figura 4.3.3). Questi fenoli possono essere velocemente ossidati dalla PPO con successiva formazione di melanine, le quali provengono non dalla polimerizzazione di γ -glutamil-3,4-benzochinone, ma da quella del 2-idrossi-4-iminochinone, formatosi non-enzimaticamente dal precedente composto. Anche in questo caso può osservarsi la formazione di melanine eterogenee per effetto dell'azione di tirosinasi e laccasi extracellulari del fungo in combinazione con l'attività di altri enzimi in grado di degradare i composti fenolici presenti nel mezzo e, successivamente, ossidare i risultanti metaboliti con formazione di polimeri colorati. I fenoli ossidati all'interno di queste melanine derivano, generalmente, da catecolo, dopa, dopamina, acido gallico ed acido tannico, ma anche catechina, acido clorogenico ed acido caffeico prendono parte a queste reazioni.

Le necrosi associate a risposte specifiche di piante resistenti alle malattie sono, normalmente, caratterizzate dalla presenza di pigmenti scuri, le melanine, localizzate sulle pareti cellulari e sui protoplasti collassati delle cellule necrotiche. Anche le pareti delle cellule adiacenti possono presentare un certo grado di melanizzazione. Il fatto che la quantità di melanina formata è, in genere, maggiore nelle piante resistenti suggerisce che le melanine e/o dei loro precursori possano contribuire in qualche misura alla resistenza. Le melanine costituiscono una barriera fisica all'ulteriore penetrazione del patogeno essendo in grado di prevenirne l'attività degli enzimi extracellulari o di quelli legati alle pareti cellulari.

Si è già detto che le melanine nelle piante si formano a partire da vari composti orto-difenolici (incolori) i quali possono essere ossidati nei corrispondenti orto-chinoni, colorati, da polifenolossidasi e da perossidasi. Anche i residui fenolici dei tannini, incolori, possono trasformarsi in residui chinonici. La successiva condensazione delle forme chinoniche porta alla formazione delle melanine. I gruppi ossidrilici dei tannini possono formare ponti idrogeno con i gruppi carbonilici dei legami peptidici presenti nelle proteine, mentre i residui chinonici possono formare legami covalenti con i gruppi amminici liberi della lisina e di altri amminoacidi: entrambe le reazioni modificano la struttura proteica. D'altra parte, la perossidasi, oltre a formare chinoni, converte i diidrossifenoli in radicali liberi che possono reagire in vario modo con i costituenti cellulari.

Come conseguenza di questa reattività, i tannini e gli orto-chinoni manifestano una certa tossicità nei confronti di molti microorganismi e virus, ma, soprattutto, disattivano gli enzimi extracellulari prodotti dai microorganismi. Anche i diidrofenoili monomerici manifestano attività antibiotica ed una certa capacità di denaturare gli enzimi, anche se queste azioni possono essere in parte ascrivibili ai prodotti formati in seguito a reazioni di autoossidazione ovvero a reazioni di ossidazione catalizzate da polifenolossidasi e perossidasi. Infatti, l'aggiunta di questi enzimi ad un substrato contenente diidrossifenoli ne rinforza le proprietà antibiotiche e la capacità di denaturare enzimi: ciò significa che chinoni e radicali liberi sono molto più attivi di quanto non lo siano i fenoli. Ad esempio, molte combinazioni virus-ospite evolvono verso un'infezione generalizzata, mentre altre portano alla formazione di tessuti necrotici. In genere, la formazione della necrosi è associata ad un aumentato consumo di O_2 nel tessuto infetto e ad un aumento dell'attività PPO nel sito in cui è localizzata la lesione necrotica e nei tessuti circostanti. L'aggiunta di sostanze orto-difenoliche nel sito dell'infezione accelera la comparsa

della reazione necrotica, oltre a produrre specie chinoniche tossiche per il microorganismo. Questi risultati suggeriscono che l'accumulo e/o la sintesi di substrati della PPO nel sito dell'infezione, il consumo di O_2 , la formazione di specie chinoniche, la complessazione di amminoacidi e proteine ed, infine, la formazione di melanine sono eventi che mirano a controllare lo sviluppo dell'infezione (sottraendo ossigeno, depauperando il substrato nutritivo e formando specie tossiche) e, successivamente a circoscriverlo con la formazione del tessuto necrotico.

Comunque, la reattività dei prodotti intermedi e la difficoltà di degradare la melanina o per via chimica od enzimatica rappresentano degli ostacoli oggettivi nella valutazione del contributo dato dalla formazione delle melanine al manifestarsi della resistenza alle malattie nei tessuti vegetali. In genere, per valutare il significato dell'ossidazione dei fenoli e della produzione di melanina si rilevano parametri come l'attività PAL, l'enzima chiave nella biosintesi dei fenoli, la concentrazione di alcuni intermedi nella sintesi della melanina e l'attività degli enzimi PO e PPO, che tendono ad essere disattivati dagli stessi prodotti di reazione, chinoni e melanine. Altro approccio seguito è quello valutare il ruolo, nella formazione delle melanine, di sostanze che inducono la resistenza. Ad esempio, si è osservato che dicloropropani, che nel riso inducono una resistenza nei confronti di *Piricularia oryzae*, stimolano la formazione di melanine in risposta all'attacco del fungo. Analogamente il triciclazolo induce la resistenza nel riso bloccando la riduzione, indotta da *Piricularia*, dei poli-idrossinaftaleni a tetraloni, con conseguente accumulo di naftochinoni. Questo risultato è stato interpretato ipotizzando un meccanismo in cui la reazione di riduzione viene utilizzata dal fungo patogeno per inibire la melanizzazione e, conseguentemente, superare le resistenze dell'ospite. Sostanze quali i dicloropropani od il triciclazolo, inibendo la reazione di riduzione, ripristinano la capacità di melanizzazione e, quindi, la resistenza dell'ospite.

6.4.4 Suberina

La suberina è un polimero simile alla cutina, dalla quale differisce per la presenza nella sua composizione di acidi bicarbossilici e per la maggiore quantità di acidi grassi a catena lunga, oltre che per la presenza di composti fenolici. È un costituente della parete cellulare presente in molte parti di pianta: nell'endoderme delle radici dove la deposizione della suberina provoca un ispessimento del tessuto (banda di Caspary) con conseguente formazione di una barriera tra apoplasto corticale e stele, nelle cellule esterne di tutti gli organi ipogei, nel periderma, il tessuto secondario di protezione che forma la corteccia esterna di fusti e radici durante l'accrescimento secondario delle piante legnose, nelle cellule della guaina del fascio delle piante C_4 e nelle cellule del tegumento dei semi localizzate nel punto di attacco ai fasci vascolari. Formazione di suberina, inoltre, si riscontra nei siti dell'abscissione fogliare e nelle aree danneggiate da malattie o da ferite. La suberina funge da barriera nei confronti del flusso di acqua e di vari soluti e la sua presenza fa sì che le pareti cellulari suberizzate assumano un caratteristico aspetto lamellare, quasi certamente determinato da strati di cera interposti tra regioni del polimero suberinico.

Il polimero è costituito da una porzione alifatica ed una aromatica, le quali formano una struttura lamellare evidenziabile con la microscopia elettronica. I principali componenti della frazione alifatica sono acidi ed alcoli grassi, epossidi di acidi ed alcoli grassi, acidi grassi ω -idrossilati ed acidi grassi α - ω bicarbossilici. Gli acidi e gli alcoli grassi sono caratterizzati dalla presenza di una catena molto lunga (da C_{20} a C_{30}), mentre tra gli ω -idrossi acidi e gli acidi bicarbossilici, normalmente, i principali componenti sono composti C_{18} Δ^9 monoenoici e/o C_{16} saturi, anche se in molti casi sono prevalenti composti C_{22} saturi. La composizione della frazione fenolica è la più difficile da studiare, ma questa sembra contenere le stesse unità fenoliche identificate nella lignina. Pertanto, per la caratterizzazione della composizione monomerica di questa frazione è stata usata la stessa tecnica adottata per lo studio della lignina, cioè la degradazione ossidativa del polimero con nitrobenzene in ambiente alcalino. Questa procedura porta alla liberazione di aldeidi aromatiche (principalmente p-

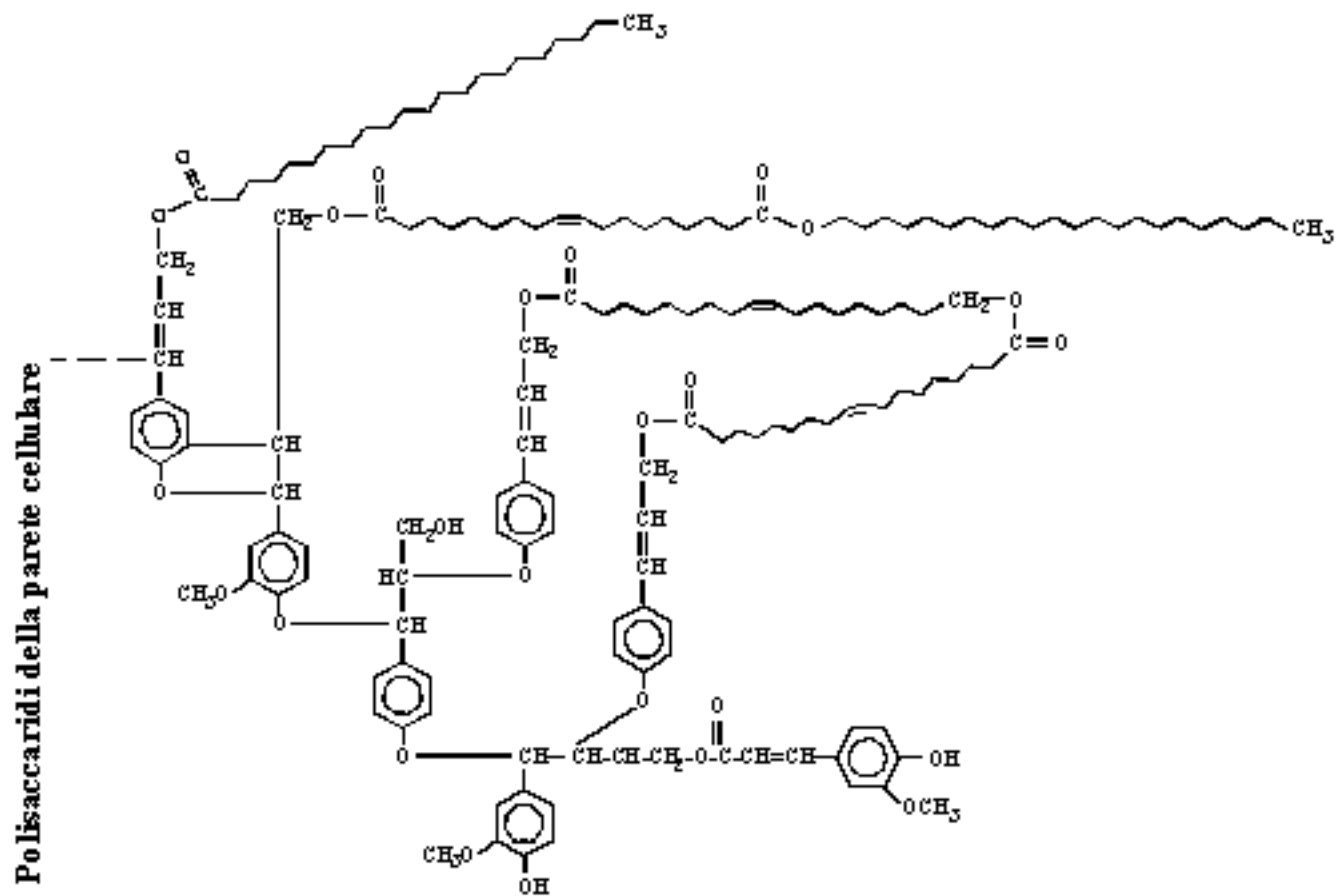


Figura 4.4.1: Modello di struttura della suberina proposto da Kolattakudy.

idrossibenzaldeide, vanillina ed, in misura minore, siringaldeide) derivanti dalla β -degradazione dei corrispondenti composti C₆-C₃.

Come già detto, la deposizione di questo materiale polimerico, contenente sostanze fenoliche, si verifica molto spesso in seguito a ferite provocate nei tessuti vegetali da attacchi fungini oppure da danni meccanici. In questi casi si può osservare la formazione di un periderma cicatriziale, in cui le cellule suberizzate assumono la funzione di una barriera. La deposizione del materiale fenolico comincia circa due giorni dopo che si è avuta la ferita, e continua ad aumentare nei giorni successivi fino a costituire un complesso network fenolico legato alla parete cellulare. Questo fenomeno è preceduto dall'attivazione della fenilalanina ammonio-liasi, l'enzima chiave nella biosintesi dei fenoli, della polifenolossidasi e della perossidasi, attivazione che costituisce la prima fase della risposta del tessuto vegetale al danno subito.

L'ipotesi di modello della struttura della suberina, proposta da Kolattukudy, include gli acidi p-cumarico e ferulico legati covalentemente ed i corrispondenti alcoli p-cumarilico e coniferilico legati tramite legami etere aril-alchile, i quali costituiscono anche i più comuni legami intermonomerici all'interno della lignina. In questo modello la matrice fenolica è attaccata alla parete cellulare, mentre i componenti alifatici sono legati covalentemente alla matrice fenolica (figura 4.4.1). Gli ω -idrossi acidi e gli acidi bicarbossilici formano legami incrociati all'interno della matrice aromatica, inoltre gli ω -idrossi acidi possono anche formare dei poliesteri lineari. Le lunghe catene degli acidi e degli alcoli grassi sono esterificate, ovviamente, nella posizione terminale. Va sottolineato che la porzione alifatica della suberina fornisce al polimero l'idrofobicità necessaria ad interagire con le cere.

La biosintesi della suberina a partire dal materiale monomero non è stata ancora del tutto chiarita. Si ritiene che la porzione aromatica venga depositata prima o simultaneamente alla componente alifatica. I monomeri aromatici subiscono un processo di polimerizzazione presumibilmente analogo a quello suggerito per la lignina, ed in questo processo un ruolo importante viene, probabilmente, svolto dalle perossidasi di parete che catalizzano la polimerizzazione dei monomeri fenolici e la formazione di legami covalenti tra le pareti cellulari ed all'interno del polimero fenolico. Nel modello di Kolattukudy, rappresentato in figura, i componenti alifatici, ω -idrossiacidi ed acidi bicarbossilici attivati, sono esterificati con i gruppi funzionali all'interno del polimero fenolico. Gli alcoli grassi possono essere incorporati all'interno del polimero tramite una reazione di polimerizzazione, catalizzata da perossidasi, dei loro esteri con gli acidi fenilpropanoidici.

Il processo di suberizzazione viene considerato una risposta abbastanza comune dei tessuti vegetali in seguito ad una ferita. E' probabile che alcune sostanze formatesi in seguito alla ferita possano fungere da precursori della catena di eventi che porta alla suberizzazione, infatti, si è osservato con con tuberi di patata che il lavaggio della superficie ferita inibiva la suberizzazione: è probabile che l'acido abscissico prodottosi nei tessuti feriti induca un processo che porta alla formazione di fattori che inducono, a loro volta, la suberizzazione tramite l'induzione degli enzimi coinvolti in questo processo.