

Acido betulinico e sua importanza come antitumorale

Introduzione

Molti costituenti delle piante, come taxolo, camptotecina, podofillotossina, vincristina e vinblastina, sono principi attivi molto importanti correntemente impiegati come farmaci per combattere con successo alcuni tumori umani; essi rappresentano anche dei modelli per lo sviluppo di nuovi agenti chemioterapici antitumorali. Tali composti hanno strutture complesse e tra di loro molto eterogenee e sono capaci di facilitare meccanismi di citotossicità, che vengono generalmente classificati nelle due categorie: di necrosi e di apoptosi (morte programmata delle cellule).

Tra gli antitumorali di origine vegetale desidero soffermarmi su un composto triterpenoidico che più volte è stato isolato e caratterizzato dal gruppo di ricerca dell'Università di Pisa da me coordinato. Mi riferisco all'acido betulinico, ampiamente diffuso nei cibi, nelle piante medicinali e nel mondo vegetale in genere sia sotto forma di acido libero o di aglicone, sia sotto forma di saponina, cioè legato ad una o più unità zuccherine, la cui struttura, insieme a quella della betulina, viene sotto riportata.

Generalità

In un programma di screening sponsorizzato dal National Cancer Institute U.S.A., alcuni ricercatori dell'Università dell'Illinois coordinati dall'Italo-americano Prof. Pezzuto [1], in un frazionamento bio-guidato in cui sono state impiegate linee cellulari di cancro umano, hanno isolato dall'estratto della corteccia di *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae) un componente con una citotossicità selettiva contro cellule di melanoma umano. Questo costituente è risultato essere l'acido betulinico, che ha inibito in modo specifico la crescita

IVANO MORELLI (*)

di quattro linee cellulari (MEL 1-4) ottenute da pazienti umani con melanoma metastatici, mentre tutti gli altri tipi di tumori sono risultati recalcitranti al trattamento con tale composto. Ciò in contrasto netto con quello che viene osservato con molti farmaci chemioterapici antitumorali, come anche quelli di origine vegetale (camptotecina, ellipticina, mitramicina -A, etoposide, taxolo, vinblastina e vincristina), i quali evidenziano tutti una relativamente intensa citotossicità senza alcuna selettività. L'ispezione visiva delle cellule di melanoma trattate con acido betulinico suggerisce che il composto agisce inducendo apoptosi.

L'assenza di tossicità, unita ad una significativa attività antitumorale, indicano quindi per l'acido betulinico un indice terapeutico favorevole, che è un prerequisito per essere preso in seria considerazione per lo sviluppo come farmaco.

Un altro aspetto favorevole all'uso di questo principio attivo è che tale composto, a differenza di quello che è accaduto di recente con il taxolo, ha un'ampia disponibilità di essere reperito come tale o di essere ottenuto da altri precursori. L'acido betulinico è infatti molto diffuso nel regno vegetale ed è disponibile da numerose fonti, anche se in basse rese. D'altra parte è facilmente ottenibile, attraverso una semplice ossidazione del gruppo alcolico primario in C-28, dalla betulina, che è il componente principale della corteccia di molte piante del genere *Betula*, ove in alcuni casi si trova anche in concentrazione superiore al 35%, in un materiale che è di scarto, rispetto al legno che viene largamente impiegato per produrre mobili. La corteccia di betulla contiene anche acido betulinico, ma in concentrazioni che raramente

superano lo 0.025% [2,3].

Si deve far rilevare che sia la betulina che l'acido betulinico sono prodotti che vengono anche commercializzati, ma il secondo è meno puro e molto più costoso del primo [4].

Per ottenere l'acido betulinico dalla betulina sono stati proposti molti approcci sintetici. I primi sono stati pubblicati alla fine degli anni '30 e prevedevano un processo multi-stadio, attraverso il quale, alla fine, si otteneva il prodotto desiderato, purtroppo in rese abbastanza basse [5,6]. Tale processo si basava sulla conversione della betulina nel suo diestere (betulin-3,28-diacetato), che successivamente veniva trasformato in betulin-3- monoacetato, il quale, attraverso l'ossidazione con il reattivo di Jones ($\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{acetone}$) [7], dava luogo all'acido 3-acetilbetulinico, da cui per perdita del gruppo estereo mediante saponificazione, si otteneva infine il prodotto desiderato. Di recente [8] sono stati proposti due nuovi metodi di sintesi dell'acido betulinico, entrambi con un numero minore di stadi, che in ambedue i casi portano all'ottenimento del prodotto desiderato con rese superiori. Il primo prevede l'ossidazione con il reattivo di Jones della betulina ad acido betulinico, il quale, per riduzione con NaBH_4 , fornisce una miscela 95:5 di 3 β - e α - isomeri, che, per ricristallizzazione, fornisce l'acido betulinico (isomero β -) con resa del 75%. Le acque madri, che contengono la miscela di isomeri, possono essere riossimate e di nuovo ridotte, per fornire alla fine nuovo acido betulinico, con una resa globale del 71%. Gli stessi ricercatori, per evitare la formazione dell' α - isomero, hanno proposto un nuovo approccio sintetico che non prevede l'acido betulinico e quindi riduzione, come prodotti intermedi. Per una conversione su larga scala della betulina in acido betulinico, alla fine però i citati ricercatori sostengono che il primo processo in due stadi, che prevede

come intermedio l'acido betulónico, sia il metodo più efficace.

Vediamo ora come è possibile isolare la betulina dalla corteccia di betulla e come ottenere l'acido betulinico con il metodo via acido betulónico.

Isolamento della betulina [2]

La corteccia di betulla (150 g) viene tagliata in piccoli pezzetti (o macinata) e bollita in un matraccio con una soluzione di sodio carbonato al 2% per rimuovere i costituenti acidi. La soluzione viene filtrata ed il residuo viene bollito 2 volte con porzioni da 500 mL di acqua calda, quindi filtrato con un Buchner. Il residuo solido viene seccato all'aria ed estratto con metanolo caldo per 3 ore, quindi filtrato. Per concentrazione della soluzione estrattiva, si separa per cristallizzazione la betulina grezza, come cristalli bianchi. Gli esteri della betulina, presenti nelle acque madri, possono essere saponificati per addizione di 25 volumi di una soluzione all'1% di potassio idrossido in etanolo; dopo una notte a temperatura ambiente, la betulina grezza viene filtrata,

seccata e cristallizzata da cloroformio-metanolo o etanolo, fino ad ottenere aghi con p.f. 251-252°C.

Preparazione dell'acido betulónico [8]

Ad una soluzione di betulina (1.0 g, 2.26 mmoli) in acetone (50 mL) a 0°C viene aggiunto goccia a goccia il reattivo di Jones preparato di fresco (CrO₃ in acido solforico diluito 8 N; 26.72 g di anidride cromica in 23 mL di H₂SO₄ conc. diluito a 100 con acqua). La soluzione viene agitata per 1.5 ore a 0°C, diluita con metanolo (25 mL), agitata per ulteriori 5 min., quindi addizionata di acqua (40 mL). Il solvente organico viene rimosso sotto vuoto ed il residuo acquoso viene estratto con etile acetato (2 x 40 mL). La fase organica viene quindi lavata con acqua (20 mL) e salamoia (15 mL), seccata su magnesio solfato anidro, filtrata e portata a secco. Il residuo viene quindi cromatografato su gel di silice (60-200 mesh) utilizzando come eluente etere di petrolio/etile acetato (4:1), per ottenere acido betulónico (0.77 g, resa 75%), p.f. 247-149°C.

Preparazione dell'acido betulinico [8]

Ad una soluzione di acido betulónico (500 mg, 1.10 mmoli) in THF (20 mL) a 0°C viene aggiunto NaBH₄ (440 mg, 10.0 equiv.) ed agitata a temp. ambiente per 10 ore. Alla soluzione viene aggiunto HCl 2 N (3 mL) and il THF viene ridotto sotto vuoto per oltre il 50%. La soluzione viene diluita con etile acetato (80 mL), lavata con acqua (3 x 5 mL) e salamoia (5 mL). La fase organica viene seccata su magnesio solfato anidro, filtrata ed il solvente rimosso sotto vuoto. Il residuo bianco (resa quantitativa) viene disciolto in metanolo caldo (50 mL). Per raffreddamento si separa per cristallizzazione acido betulinico (375 mg, resa 75%), p.f. 291-2°C.

Bibliografia

- [1] Pisha E., Chai H., Lee I-S., Chagwedera T.E., Farnsworth N.R., Cordell G.A., Beecher C.W.W., Fong H.H.S., Kinghorn A.D., Brown D.M. Wani M.C., Wall M.E., Hieken, T.J., Das Gupta T.K., Pezzuto J.M., *Nature Med.*, **1**, 1046, 1995; Schmidt M.L., Kuzmanoff K.L., Ling-Indeck L., Pezzuto J.M., *European J. Cancer*, **33**, 2007, 1997.
- [2] Hunefield J., *Prakt. Chem.*, **7**, 53, 1836
- [3] Sosa A., *Ann. Chem.*, **14**, 5, 1940
- [4] Secondo il catalogo Aldrich 1999-2000, 1 g di betulina pura al 97% e di acido betulónico tecnico al 90% costano, rispettivamente Lit. 94.000 e 408.000; quindi la betulina è più di 4 volte meno costosa del suo derivato.
- [5] Ruzicka L., Lambertson A.H., Christie E.W., *Helv. Chim. Acta*, **21**, 1706, 1938
- [6] Robertson A., Soliman G., Owens E.C., *J. Chem. Soc.*, 1267, **1939**
- [7] Djerassi C., Engle R.R., Bowers A., *J. Org. Chem.*, **21**, 1547, 1956
- [8] Kim D.S.H.L., Chen Z., Nguyen T., Pezzuto J.M., Qiu S., Lu Z-Z., *Synth. Comm.*, **27**, 1607, 1997

