

DOCUMENTO  
TECNICO

**<sup>1</sup>Fulvio Mattivi**  
**<sup>1</sup>Urska Vrhovsek**  
**<sup>1</sup>Giulia Malacarne**  
**<sup>1</sup>Domenico Masvero**  
**<sup>1</sup>Luca Zulini**  
**<sup>1</sup>Marco Stefanini**  
**<sup>1</sup>Claudio Moser**  
**<sup>1</sup>Riccardo Velasco**  
**<sup>2</sup>Graziano Guella**

<sup>1</sup>Fondazione Edmund Mach,  
 Centro Ricerca ed Innovazione -  
 San Michele all'Adige (TN)

<sup>2</sup>Laboratorio di Chimica Bio-orga-  
 nica, Dipartimento di Fisica,  
 Università di Trento



F. Mattivi

## GLI OLIGOMERI DEL RESVERATROLO NELLE FOGLIE DELLE VITI RESISTENTI (MERZLING X TEROLDEGO) INFETTATE DA P. VITICOLA

Scopo di questo studio era la caratterizzazione strutturale delle viniferine che si accumulano nelle foglie dei genotipi resistenti di *Vitis vinifera* se infettati con *Plasmopara viticola*. Sono state evidenziate 15 viniferine, delle quali 10 nuove per la vite, assieme ad un dimero che deriva dalla condensazione della (+)-catechina con l'acido trans-caffeico.

### Introduzione

All'interno delle Vitaceae, le viniferine rappresentano un gruppo relativamente ristretto di composti fenolici di basso peso molecolare costituito da derivati del *trans*-resveratrolo dotati di proprietà antifungine, che permettono alla pianta di contrastare l'attacco dei patogeni (1). Nella vite, la produzione di resveratrolo porta alla formazione di fitoalessine che derivano da oligo-

merizzazione ossidativa, denominate viniferine (2). Alcune di queste sono state dimostrate agire biologicamente contro diversi patogeni fungini della vite (3-4). È stato osservato che la tossicità delle fitoalessine stilbeniche verso i funghi è strettamente correlata alla loro struttura chimica. In particolare, è stato riportato che  $\gamma$ -viniferin, dimero ossidativo del resveratrolo, e pterostilbene, analogo metilato del resveratrolo,

sono gli stilbeni maggiormente tossici verso la mobilità e sviluppo dell'oomycete *P. viticola* (2,5).

Gli studi pionieristici di Langcake e Pryce (3) hanno chiarito le strutture di *trans*-resveratrolo,  $\alpha$ -viniferin ed  $\epsilon$ -viniferin, osservando la presenza di altri composti caratteristici della famiglia delle Vitaceae simili alle viniferine ma non caratterizzati ( $\beta$ -viniferin e  $\gamma$ -viniferin). Hanno descritto inoltre la formazione

**Parole chiave:** *Vitis vinifera*, *Plasmopara viticola*, stilbeni, stilbenoidi, NMR, spettrometria di massa

**Tab. 1 - Nome, quantità isolata e dati MS dei composti ottenuti da foglie di vite infettate con *P. viticola*.**

frazione	tempo ritenz. (min)	quantità (mg)	taglia	nome	formula molecolare	MM calcolata	ione molecolare (M-H)-	osservato (M-H)-	Δ massa (ppm)
1.1	17,4	0,13	di-	Z- $\omega$ -viniferin (1)	C <sub>28</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	454,1416	453,1337	453,1340	-0,7
1.2	17,9	2,80	di-	E- $\omega$ -viniferin (2)	C <sub>28</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	454,1416	453,1337	453,1323	3,1
1.4	18,5	n.a.	di-	E- $\omega$ -viniferin (3)	C <sub>28</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	454,1416	453,1337	453,1340	-0,7
1.4	18,5	n.a.	di-	Z- $\omega$ -viniferin (4)	C <sub>28</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	454,1416	453,1337	453,1338	-0,2
2.1	13,5	1,10	di-	caffaic acid and catechin condensation product (5)	C <sub>24</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	452,1107	451,1028	451,1021	1,6
2.2	14,8	1,39	di-	pallidol (6)	C <sub>28</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	454,1416	453,1337	453,1317	4,4
3.1	15,4	0,61	tri-	ampelopsin D (7) + quadrangularin A (8)	C <sub>28</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	454,1416	453,1337	453,1340	-0,7
3.2	18,9	1,13	tri-	$\alpha$ -viniferin (9)	C <sub>42</sub> H <sub>30</sub> O <sub>9</sub>	678,1890	677,1811	677,1818	-1,0
4.1	19,1	0,59	tri-	E-cis-miyabenol C (10)	C <sub>42</sub> H <sub>32</sub> O <sub>9</sub>	680,2046	679,1967	679,1979	-1,8
5.1	17,9	0,54	tri-	Z-miyabenol C (11)	C <sub>42</sub> H <sub>32</sub> O <sub>9</sub>	680,2046	679,1967	679,1974	-1,0
5.2	18,1	1,55	tri-	E-miyabenol C (12)	C <sub>42</sub> H <sub>32</sub> O <sub>9</sub>	680,2046	679,1967	679,1969	-0,3
6.1	16,8	5,46	tetra-	isohopeaphenol (13)	C <sub>56</sub> H <sub>42</sub> O <sub>12</sub>	906,2676	905,2597	905,2617	-2,2
7.1	17,5	1,04	tetra-	ampelopsin H (14)	C <sub>56</sub> H <sub>42</sub> O <sub>12</sub>	906,2676	905,2597	905,2620	-2,5
7.2	17,5	0,90	tetra-	vaticanol C-like (15)	C <sub>56</sub> H <sub>42</sub> O <sub>12</sub>	906,2676	905,2597	905,2635	-4,2

di un deidrodimerico di *trans*-resveratrolo (che successivamente ha preso il nome di  $\delta$ -viniferin) ad opera della perossidasi da rafano e della H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Successivamente a questi lavori c'è stato poco progresso nella caratterizzazione strutturale di questi composti bioattivi inducibili nelle foglie di vite. Altri stilbeni identificati in foglie infettate con *P. viticola* sono il monomero pterostilbene (2) ed il dimero  $\delta$ -viniferin (sinonimo: *trans*-resveratrol dehydrodimer), che sono stati descritti essere le principali viniferine sintetizzate in foglie di *V. vinifera* var. Chasselas infettate da *P. viticola* o soggette a radiazione ultravioletta (5), mentre lo stilbenoide  $\alpha$ -viniferin non è più stato osservato nei lavori seguenti. La maggior parte degli studi disponibili si sono focalizzati su presenza e ruolo funzionale delle strutture note, concentrandosi soprattutto sugli oligomeri che mantengono nella struttura il doppio legame stilbenico, denominati oligostilbeni (1,6) piuttosto che su quei composti che hanno persa nella polimerizzazione, detti stilbenoidi.

Questo articolo è parte di

una più ampia ricerca finalizzata a stabilire il ruolo dell'intera classe delle viniferine nella difesa della vite nei confronti di *P. viticola*. Uno screening preliminare condotto per mezzo di HPLC-DAD-MS aveva mostrato che il 17% dei genotipi in una popolazione segregante (Merzling x *Vitis vinifera* Teroldego) presenta nelle foglie una quantità elevata rispetto ai parentali, ed un complesso profilo di viniferine della vite note ed ignote, successivamente alla infezione con *P. viticola*.

## Scopo del lavoro

Lo scopo principale di questo studio era quindi l'isolamento e caratterizzazione strutturale delle viniferine presenti in alcuni genotipi selezionati della popolazione di viti resistente alla *P. viticola*. Attraverso tecniche avanzate di spettrometria di massa (LC-ESI-MS e LC-ESI-Q-TOF) e misure estensive di risonanza magnetica nucleare (NMR) mono e bidimensionali, spettrometria ultraviolet-

to (UV), dicroismo circolare (CD) e proprietà ottiche, è stato possibile identificare le dieci principali viniferine, come pure tre viniferine minori e un polifenolo dimero presenti nelle foglie infettate. Calcoli di meccanica molecolare (MM) sono inoltre stati condotti su tutti i composti qui riportati, per individuarne la conformazione più stabile.

## Materiali e metodi

**Viti.** Per l'isolamento delle viniferine sono stati scelti 18 genotipi dai vigneti sperimentali della Fondazione Edmund Mach in San Michele all'Adige, da una popolazione F1 che deriva da incrocio tra Merzling e *V. vinifera* cv Teroldego. Le 10 foglie apicali di 2-3 germogli sono state infettate con *P. viticola*, e dopo 6 giorni campionate, congelate e conservate a -20 °C.

**Infezione delle piante.** Sporangiospore di *P. viticola* (Berk. e Curt) Berl. et De Toni sono state raccolte da piante infette di *V. vinifera* cv

Pinot Grigio. La muffa bianca emergente dalla parte inferiore delle foglie è stata spazzolata in acqua bidistillata fino ad ottenere una sospensione di conidi con 10<sup>4</sup>/10<sup>5</sup> spore/mL.

L'infezione delle piante è stata ottenuta spruzzando la sospensione di conidi fredda sulla superficie inferiore di tutte le foglie completamente estese, in una camera climatica mantenuta a 24 °C e 80% RH.

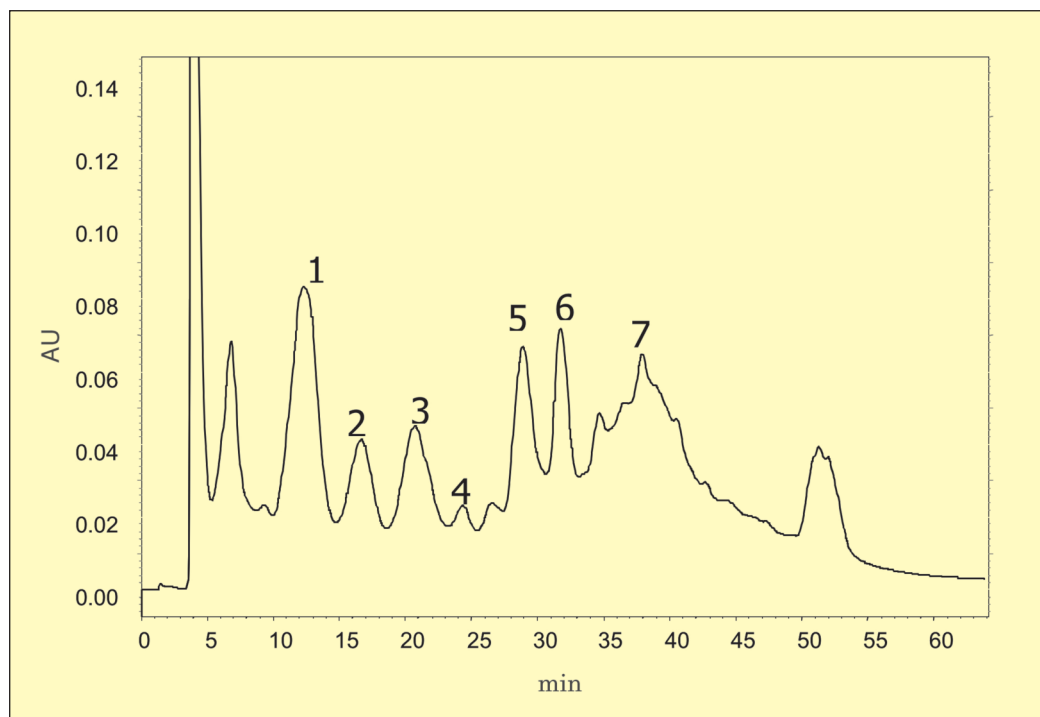
**Composti chimici.** Acetonitrile, metanolo e acido acetico sono stati acquistati da Carlo Erba, etile acetato da BDH ed acido fosforico da Merck. L'acqua era di grado milliQ. I composti *trans*-resveratrolo e *trans*-4-hydroxystilbene sono stati ottenuti da Sigma Aldrich, *cis*-resveratrolo è stato preparato via foto-isomerizzazione di standard di *trans*-resveratrolo, mentre *trans*-piceid (*trans*-resveratrol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside) era stato isolato dalle radici anidre di *Polygonum cuspidatum* (7). La purezza di ogni monomero è stata controllata per HPLC e l'identità confermata in accordo con Mattivi et al. (8).

**Estrazione.** Il processo è stato condotto sotto azoto, al buio e in assenza di acidi minerali, per prevenire la produzione di artefatti dovuto ad ossidazione, foto-isomerizzazione ed idrolisi. Le foglie sono state pesate (517 g), macinate ed estratte per 48 h a temperatura ambiente in metanolo (10 L). Il materiale solido è stato rimosso ed il volume di estratto ridotto a 500 mL in evaporatore rotante a 35 °C.

**Cromatografia preparativa.** Sia la cromatografia flash in bassa pressione che la cromatografia liquida ad alta pressione sono state realizzate con un sistema HPLC preparativo Shimadzu SCL-10 AVP. Per guidare l'estrazione, sia l'estratto grezzo che ogni frazione intermedia sono state analizzate per HPLC-DAD-MS.

**Cromatografia flash su Isolute ENV+.** Il primo passaggio nella purificazione dell'estratto è stato condotto con una colonna a siringa Isolute da 150 mL per cromatografia flash, impaccata con 20 g di assorbente ENV+ Isolute con diametro di 40-70 µm e dimensione media dei pori di 60 µm, chiuso alle due estremità con i dischi accessori Isolute SPE. La resina veniva attivata prima di ciascun uso tramite eluizione sequenziale con metanolo (200 mL) ed acqua (300 mL). L'estratto grezzo era diviso in due frazioni da 250 mL, ciascuna filtrata su filtro Durapore 0.22 µm, assorbita su circa 10 g di resina attivata ed asciugata sotto pressione ridotta. La resina veniva sospesa in acqua ed impaccata nella colonna a siringa, che veniva inserita in linea nel sistema HPLC. La cromatografia flash era condotta a temperatura ambiente con un flusso di 25 mL/min ed eluizione sequenziale con: A. acqua (350 mL); B. pentano : diclorometano 2:1 v/v (2 L); C. etile acetato (500 mL) e D. metanolo (500 mL). Le frazioni B, C e D venivano portate a secco, disciolte in 50 mL di metanolo ed analizzate

**Fig. 1 - Purificazione dell'estratto grezzo sulla colonna diolo**



per HPLC-DAD-MS. La frazione C, con tutti i composti di nostro interesse, veniva selezionata per ulteriore lavorazione, mentre le altre venivano eliminate.

**Cromatografia flash su HW40S.** Una seconda purificazione è stata condotta sulla stessa apparecchiatura, usando 20 g di resina HW40S (Toyopearl) come fase stazionaria. La soluzione in metanolo (la frazione C ottenuta dalla purificazione con ENV+) è stata caricata quantitativamente sulla colonna a siringa. La colonna veniva inserita nel sistema HPLC preparativo, lavata con acqua (500 mL) a 10 mL/min, e collegata al detector impostato a 280 nm. Le fasi mobili erano acqua (A) e metanolo (B). La corsa cromatografica consiste in un gradiente lineare da 50 a 100% B in 60 min, seguito da un tratto isocratico al 100% B per 40 min, con flusso 10 mL/min. Venivano raccolte le frazioni sequenziali di 50 mL ed una aliquota di ciascuna iniettata in HPLC-DAD-MS per verificarne la composizione. Le frazioni eluite tra 50 e 90 min contenevano tutti gli stilbeni e stilbenoidi. Queste frazioni venivano riunite, por-

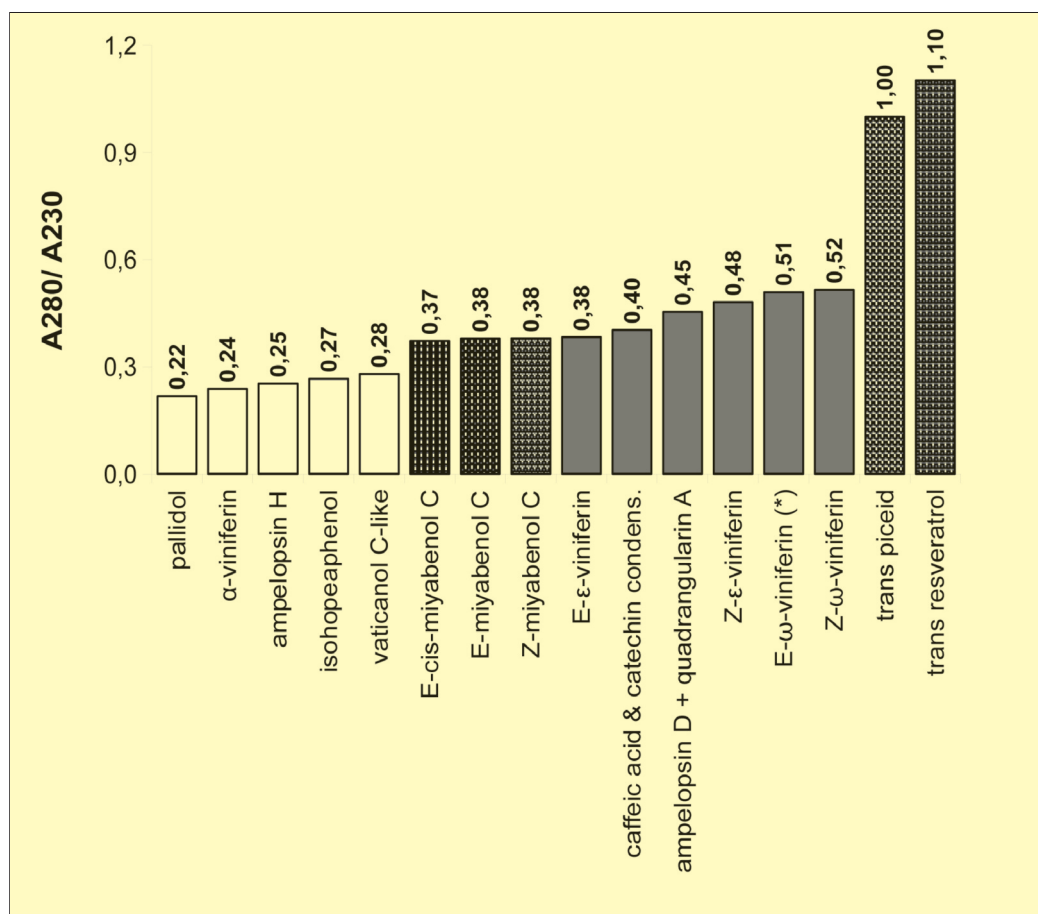
tate a secco e sciolte in 100 mL di metanolo. Questa frazione purificata risultava ulteriormente arricchita nei composti desiderati.

**Cromatografia preparativa in fase normale.** Per il frazionamento dei diversi oligomeri è stata scelta una colonna diolo, Develosil 100DIOL-5, 300 x 20 mm. Dopo condizionamento con acetonitrile, con flusso 20 mL/min, è stata connessa ad un rilevatore UV operante a 280 nm. Aliquote di 10 mL dell'estratto metanolic purificato contenente gli stilbeni venivano portate a secco, sciolte in 0.5 mL di metanolo e 0.5 mL di acetone prima della iniezione. La separazione cromatografica, a temperatura ambiente, era condotta utilizzando come fasi mobili acetonitrile (A) e metanolo con 3% acqua (B). Il profilo era il seguente: 100% A per 15 min, gradiente lineare al 15% B in 30 min, gradiente lineare al 100% B in 10 min, valore mantenuto per altri 10 min. Ciascun picco veniva raccolto separatamente, portato a secco, sciolto in 10 mL di metanolo ed analizzato per HPLC-DAD-MS. Le 7 frazioni contenenti gli stilbeni

così ottenute sono state portate a 1.5 mL in acetone per la caratterizzazione preliminare con NMR.

**Cromatografia preparativa in fase inversa.** Una colonna Discovery HS-C18, 250 x 21.2 mm, 5 µm, veniva condizionata con acqua, con flusso 10 mL/min e collegata al detector operante a 280 nm. Ognuna delle 7 frazioni veniva portata a secco, sciolta in 0.5 mL metanolo e filtrata su filtro Durapore 0.22 µm prima della iniezione. La separazione cromatografica veniva condotta a temperatura ambiente, in 78 min, utilizzando acqua (solvente A) e acetonitrile (B), con questo profilo: 100% A per 3 min, poi isocratico a (30-27-32-34-32-32-32% B, percentuale variabile rispettivamente per le frazioni 1-7) per 65 min seguito da 100% B per 10 min. Ogni picco (14 in totale) veniva raccolto separatamente, portato a secco, sciolto in 10 mL di metanolo ed analizzato utilizzando HPLC-DAD-MS.

**Analisi HPLC-DAD-MS.** Le seguenti condizioni sono state utilizzate per monitorare ogni passaggio dell'isolamento e sono state inoltre validate

**Fig. 2 - Il rapporto di assorbanza (A280/A230), quindi tra le bande UV II e III degli stilbenoidi**

per permettere di ottenere il profilo dei metaboliti delle viti infettate. L'analisi è stata realizzata su un sistema Micromass ZQ LC-MS completo di una pompa HPLC Waters 2690 e detector DAD Waters 996 gestito da software Empower. La separazione è stata ottenuta su una colonna cromatografica Zorbax SB-Aq, 5 μm, 2.1x150 mm, con precolonna Zorbax SB-Aq, 5 μm, 2.1x12.5 mm. La fase mobile consiste di acido acetico 0.1% in H<sub>2</sub>O (A) e acetonitrile (B). La separazione è stata condotta a 40 °C in 27 min, nelle seguenti condizioni: Gradienti lineari a partire da 5% B, al 70% B in 25 min, al 95% B in 0.1 min, 95% B mantenuto per 2 min, alle condizioni iniziali (5% B) in 0.1 min. La colonna veniva equilibrata per 7 min prima di ogni analisi. Il flusso era 0.25 mL/min ed il volume di iniezione 6 μL. Gli spettri UV/Vis venivano registrati tra 220 e 400 nm, con rileva-

zione a 280 e 310 nm.

L'uscita del sistema HPLC era splittata (9:1) all'interfaccia ESI dell'analizzatore di massa. Spettri di massa elettrospray nell'intervallo di *m/z* 100-1500 venivano registrati in modalità positiva. Il voltaggio del cono (CV) era impostato in modalità scansione a 40 V per le identificazioni basate sul picco dell'aglicone, e a 25 V per l'identificazione basata sia sul frammento dell'aglicone che sullo ione molecolare. I seguenti ioni (*m/z*) venivano monitorati per la quantificazione: 229.1 (CV 25 V) per *trans*- e *cis*-resveratrolo, 229.1 (CV 40 V) per *trans*- e *cis*-piceid, 455.2 (CV 60 V) per i dimeri, 681.2 (CV 70 V) per trimeri, 907.2 (CV 80 V) per tetrameri.

**Analisi Q-TOF.** Spettri di massa ad alta accuratezza sono stati acquisiti mediante uno spettrometro di massa HDMS-Q-TOF Synapt con

sistema di ionizzazione elettrospray (ESI) e software MassLynx 4.1. L'analisi HDMS è stata realizzata dopo separazione nelle condizioni cromatografiche descritte nella sezione precedente, con modalità negativa e nell'intervallo di *m/z* 50-3000 Da. Lo spettrometro era calibrato utilizzando sodio formiato, e leucine enkephalin veniva usato per la lock mass. I dati sperimentali sono riportati in Tab. 1. In queste condizioni lo strumento è accreditato di produrre dati sperimentali con una accuratezza entro ±3 ppm.

**Esperimenti NMR.** Gli spettri <sup>1</sup>H (400 MHz) e <sup>13</sup>C (100 MHz) NMR di tutti gli oligomeri misurati sono stati registrati in d<sub>6</sub>-acetone (99.90% CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>) a 298 K su uno spettrometro NMR Bruker-Avance 400 MHz NMR, utilizzando un probe 5 mm BBI con 90° proton pulse length di 8.7 μs alla transmis-

sion power di 0 db e equipaggiato con pulsed-gradient field utility. La scala del chemical shift (δ) era calibrata sul segnale del protone residuo dell'acetone deutero, rispettivamente a δ<sub>H</sub> 2.040 ppm e δ<sub>C</sub> 29.80 ppm. Sono stati registrati questi esperimenti: <sup>1</sup>H-NMR; decoupled <sup>13</sup>C-NMR; <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H DQCOSY; <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC; <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC e <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY.

I calcoli di meccanica molecolare sono stati ottenuti con programma PCMOD 7.0 /GMMX versione 1.5. Tutte le strutture minimizzate che rientravano in una finestra di strain-energy di 3.0 kcal/mol venivano salvate e infine minimizzate con entrambi MMX e MM3 force fields, conservando solo quelle rientranti entro 2.0 kcal/mol.

**Misure UV.** Gli spettri UV di ciascun oligomero sono stati registrati in metanolo, su uno spettrometro Hitachi U-2000. Valori medi venivano ottenuti attraverso misurazioni a due appropriate diluizioni, una il doppio dell'altra, tutte nel range 1.15-9.55 X 10<sup>-5</sup> M, al fine di ottenere una lettura di assorbanza nell'intervallo 0.27-0.83 UA.

**Misure polarimetriche e dicroismo circolare.** La rotazione ottica specifica veniva misurata in metanolo a temperatura ambiente, utilizzando un polarimetro JASCO-DP181 alla lunghezza d'onda di emissione del sodio e valutato come valori di [α]<sub>D</sub> espressi in deg dm<sup>-1</sup>cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>. Lo spettro CD era registrato in metanolo a temperatura ambiente, con un dicrografo Jasco J-40AS e valutando Δε (dicroismo circolare molare) in cm mol<sup>-1</sup> L alla lunghezza d'onda del massimo osservato nello spettro CD.

**Dati strutturali deicomposti isolati**

Le tabelle con tutti i dati strutturali sono reperibili sul lavoro originale in lingua inglese.

**Nomenclatura.** In accordo con la corrente pratica, abbiamo utilizzato in maniera con-

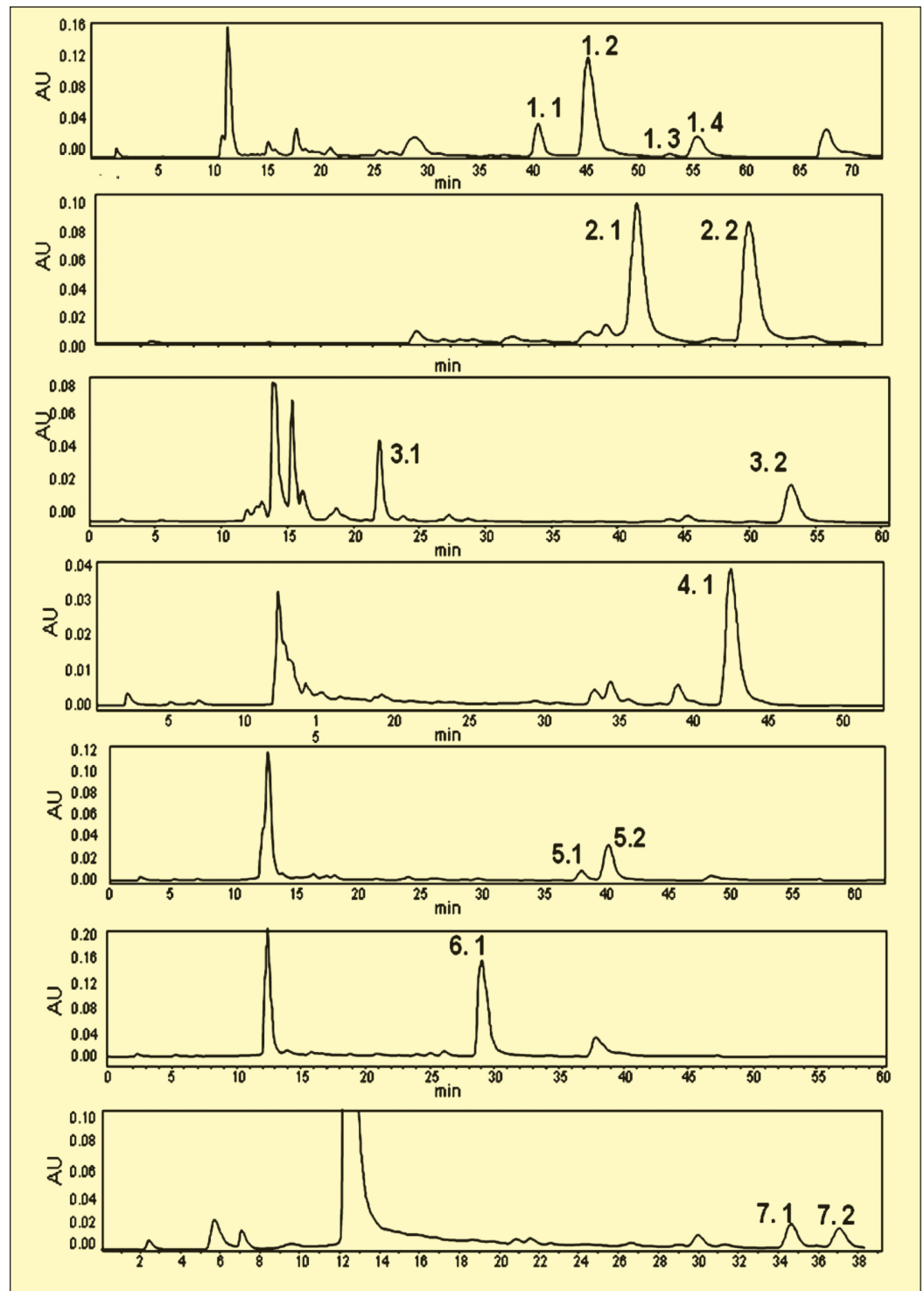
sistente la nomenclatura *trans*- e *cis*- per descrivere la stereochimica agli anelli saturi, mentre si è utilizzata la nomenclatura *Z*-/*E*- per descrivere la stereochimica dei doppi legami. I nomi utilizzati in questo studio, assieme con i nomi triviali utilizzati in letteratura, sono i seguenti: *Z*- $\epsilon$ -viniferin (sin. *cis*- $\epsilon$ -viniferin); *E*- $\epsilon$ -viniferin (sin. *trans*- $\epsilon$ -viniferin); *E*- $\delta$ -viniferin (sin. *trans*- $\delta$ -viniferin, *trans*-resveratrol dehydromer); *Z*-miyabenol C (sin. *cis*-miyabenol C); *E*-miyabenol C (sin. *trans*-miyabenol C).

## Risultati e discussione

**Infezione della vite, estrazione dalle foglie e frazionamento.** In una indagine preliminare a mezzo HPLC-DAD-MS, avevamo osservato che nelle foglie infette con *P. viticola* raccolte dalla progenie dell'incrocio di Merzling x Teroldego si nota la formazione, in aggiunta a *trans*-resveratrol, *trans*-piceid e *E*- $\epsilon$ -viniferin, di numerosi altri stilbeni e stilbenoidi, ed in numero superiore a quello dei composti noti finora isolati nella vite (risultati non pubblicati). La accurata identificazione e quantificazione di quantità minime di viniferine in una matrice complessa quale l'estratto da foglia è particolarmente impegnativa. A questo punto risultava ovvio che prima di poter descrivere la interazione tra vite e *P. viticola* in questa popolazione, era necessario isolare e caratterizzare questi nuovi metaboliti. Diciotto genotipi alti produttori di stilbenoidi sono stati selezionati da questa popolazione e queste piante sono state infettate, le loro foglie apicali raccolte, riunite ed estratte con metanolo, con una resa tale da permetterci di intraprendere l'isolamento in quantità sufficienti alla caratterizzazione strutturale.

La pre-purificazione dell'estratto grezzo è stata realizzata in due passaggi. In accordo con risultati precedenti con gli stilbenoidi dalle radici di

**Fig. 3 - Isolamento finale per cromatografia in fase inversa delle sette frazioni ottenute dalla colonna diolo**

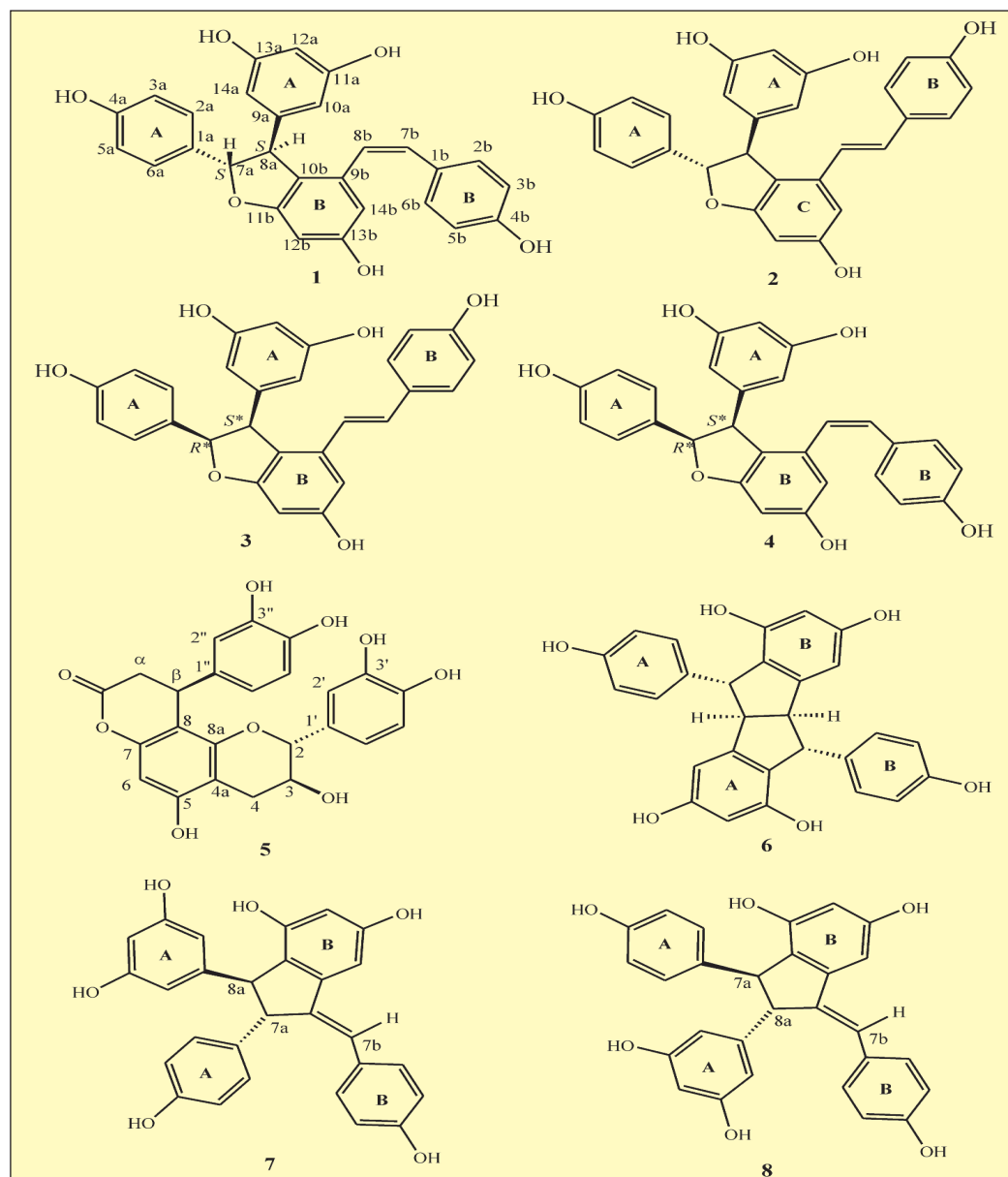


vite (9-10), una cromatografia flash su una resina formata dal copolimero polistirene-divinilbenzene (Isolute ENV+) ci ha permesso di eliminare con efficienza la maggior parte dei metaboliti primari, quali carboidrati, acidi organici, aminoacidi e clorofille, e metaboliti secondari quali le proantocianidine, nelle tre frazioni di

lavaggio acquoso, con pentano-diclorometano e con metanolo. Questa purificazione iniziale ha permesso di incrementare i segnali di stilbeni e stilbenoidi, in precedenza sovrapposti e parzialmente coperti da altri interferenti, nei cromatogrammi HPLC-DAD-MS. Una seconda cromatografia flash su resina HW40S

ha permesso una ulteriore purificazione dell'estratto, tramite la raccolta dei soli composti eluenti nell'intervallo 40-90 min. Nell'estratto purificato così ottenuto, tutti i composti target sono stati recuperati, finalmente rappresentando i principali picchi visibili nel cromatogramma HPLC-DAD-MS.

**Fig. 4 - Strutture degli stilbenoidi dimeri nelle foglie di vite: Z-ε-viniferin (1), E-ε-viniferin (2), E-ω-viniferin (3), Z-ω-viniferin (4), pallidol (6), E-ampelopsin D (7), E-quadrangularin A (8) e di un prodotto di condensazione tra (+)-catechina ed acido trans-caffeico (5)**



La colonna diolo ci ha permesso di frazionare in maniera efficace l'estratto purificato, ottenendo sette frazioni che risultavano separate in base alla loro taglia ed affinità (Fig. 1). La caratterizzazione dei composti ha confermato la separazione dei dimeri (frazioni 1, 2 e 3) dai trimeri (frazioni 3, 4 e 5) e tetrameri (frazioni 6 e 7). Ciascuna delle sette frazioni ottenute per cromatografia in fase normale è stata quindi ulteriormente separata per cromatografia in fase inversa. Questa tecnica complementare ci ha permes-

so di raccogliere 14 frazioni contenenti da 0.13 fino a 5.46 mg (Tab. 1) di oligomeri puri, per un totale di 14.74 mg.

Queste frazioni sono state etichettate con un codice numerico sequenziale a due cifre, la prima indicante l'ordine di eluizione nella colonna in fase normale (Fig. 1) e la seconda l'ordine di eluizione nella separazione in fase inversa (Fig. 3).

**Caratterizzazione strutturale dei composti isolati.** Una conferma della struttura degli oligomeri isolati è stata ottenuta per spettrometria di

massa ad alta risoluzione in modalità negativa. Per tutti è stato possibile ottenere un ottimo match rispetto alla massa teorica, inferiore a 3 ppm con l'eccezione di tre composti e comunque sempre inferiore a 5 ppm (Tab. 1).

Lo studio dello spettro UV ci ha dato altre informazioni preliminari. Il cromoforo stilbenico è essenzialmente caratterizzato dalla presenza di tre bande, convenzionalmente chiamate come I, II e III (11). La banda I è localizzata tra 308 e 336 nm mentre la banda II è nella regione

281-313 nm. Mostrano tipicamente dei coefficienti di estinzione molare elevati e sono in diretta relazione alla presenza di un doppio legame coniugato in configurazione *E* (cioè *trans*). La banda III, situata intorno ai 230 nm, è più debole ed essenzialmente dovuta alla presenza di unità fenoliche. La presenza di un cromoforo *cis*-stilbenico da origine ad uno spettro differente, con un massimo di assorbimento (banda II) di minore intensità e più corta lunghezza d'onda rispetto all'isomero *trans* (11).

Oltre ai coefficienti di estinzione molare, abbiamo misurato il rapporto tra le assorbanze A280/A230 che era stato suggerito essere informativo per l'assegnazione della struttura (12). Il rapporto A280/A230 è stato trovato assumere (Fig. 2) valori bassi (0.22-0.28) per cinque stilbenoidi oligomeri. Valori intermedi sono stati trovati per i tre oligostilbeni trimeri (0.37-0.38) e per gli oligostilbeni dimeri (0.38-0.52). I valori più elevati erano quelli dei monomeri del *trans*-resveratrol (1.00-1.10).

Sono stati condotti molteplici esperimenti NMR al fine di chiarire ciascuna struttura, inoltre i valori sperimentali di dicroismo circolare ed  $\alpha$  sono stati acquisiti e successivamente discussi per ciascun composto, dove appropriato. Gli stilbenoidi oligomeri possiedono tre caratteristiche strutturali peculiari che devono essere definite con chiarezza per poter definire le loro strutture: 1) la stereochimica dei doppi legami esociclici, 2) la posizione regiochimica dei gruppi 4-idrossifenil e 3,5-diidrossifenil ai C7/C8 e 3) la stereochimica relativa (o eventualmente assoluta) dei centri chirali C7 e C8. Il primo compito è semplice dato che la grandezza del parametro  $^3J$  (H7,H8) è diagnostica della stereochimica del doppio legame in configurazione *Z* (11-13 Hz) o *E* (15-17 Hz). Il secondo compito, la definizione della regiochimica ai vari centri C7/C8, richiede esperimenti HMBC. Di solito, l'esame delle risonanze 2D-

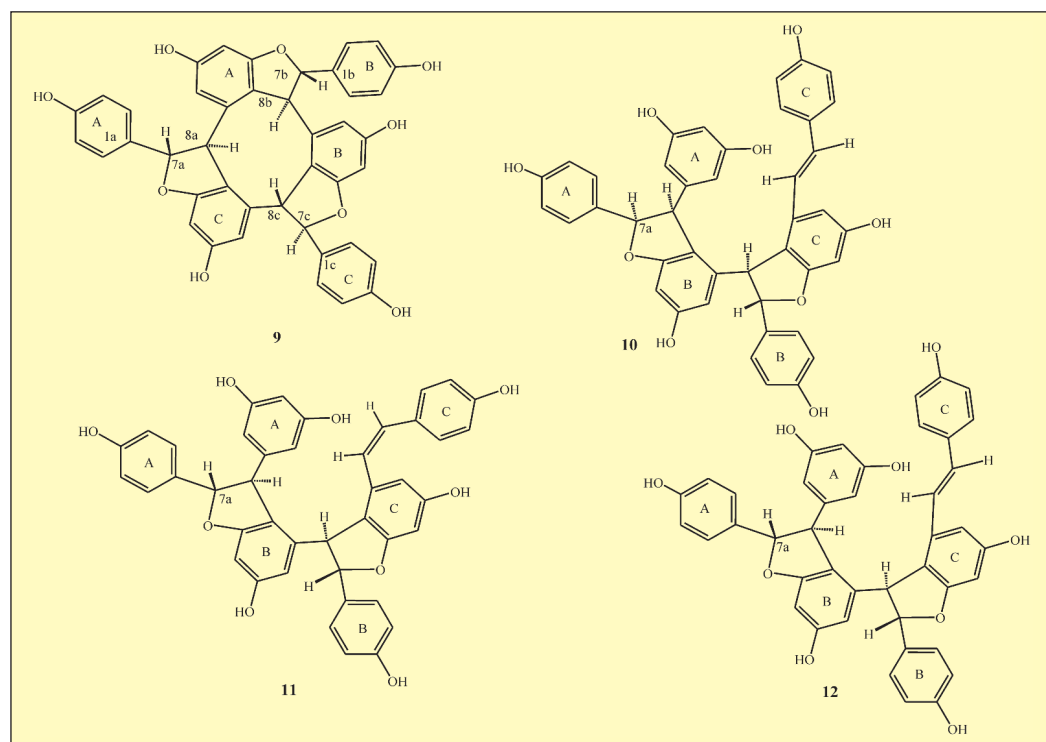
HMBC degli H7 ed H8 permette di definire la principale connettività tra gli atomi dell'intero oligomero. Il terzo compito può essere considerato il più difficile, per il fatto che negli anelli a cinque membri anche piccole modifiche nella geometria possono alterare in modo significativo l'angolo diedro tra i nuclei accoppiati H7/H8, causando ampie variazioni nei valori delle loro costanti di accoppiamento. Nonostante sia generalmente accettato che nei 2,3-benzodiidrofurani (come pure nei 2,3-diidrofuran) il  $^3J_{cis}$  (5-10 Hz) sia maggiore che  $^3J_{trans}$  (1-9 Hz) (13), non si può pervenire ad una assegnazione definitiva della stereochimica usando solamente la dimensione degli accoppiamenti, a meno che non sia stato attentamente investigato uno specifico pattern di sostituzioni o di sistemi eterociclici, oppure sia stata condotta una completa analisi conformazionale. Di conseguenza, questa assegnazione stereochimica deve essere valutata mediante esperimenti di irradiazione selettiva 2D-NOESY e/o NOE1D. Se tramite irradiazione della risonanza H-7 viene osservato un marcato NOE ( $\gg 10\%$ ) sul segnale del H-8 vicinale, questo implica una vicinanza spaziale dei protoni coinvolti e si può convalidare quindi una configurazione *cis* al C7/C8, mentre quando si rileva solo un modesto NOE ( $\gg 1-2\%$ ), i due protoni sono attesi essere in posizione *trans*.

Eventualmente, gli shift  $^{13}C$  dei C7 e C8 possono discriminare tra le configurazioni relative *cis* e *trans* 2,3 a causa dell'effetto schermante di un atomo di carbonio in configurazione *cis*- in posizione g (effetto-g) (14).

## I dimeri

*Z-ε-viniferin* (1). Lo spettro di massa del picco isolato nella frazione 1.1 (Fig. 3) corrisponde a quello di un resveratrolo dimero, con assorbimento UV e coefficiente di estinzione molecolare ( $\epsilon_{280.0} = 9920 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) in accordo con la presenza di un

**Fig. 5 - Strutture degli stilbenoidi trimeri nelle foglie di vite:  $\alpha$ -viniferin (9), E-cis-miyabenol C (10), E-miyabenol C (12), Z-miyabenol C (11)**



doppio legame stilbenico in configurazione *cis*, e dati NMR (Fig. 4) e CD in accordo con la struttura della *Z-ε*-viniferin. In particolare, una assegnazione completa e una discussione dettagliata dei dati NMR per *Z-ε*-viniferin e per tutti gli altri composti noti è disponibile nelle Supporting Information dell'articolo originale in lingua inglese, liberamente scaricabili online.

Questo composto è stato descritto come un prodotto della isomerizzazione indotta dalla luce della *E-ε*-viniferin estratta dalle foglie di vite (3). Considerando che questo composto era meno del 5% dell'isomero *E* (Tab. 1) e che non era osservato nelle analisi degli estratti da foglia fresca, pensiamo che la sua presenza di dovuta alla formazione durante l'isolamento, nonostante che l'intero processo sia stato fatto con protezione dalla luce. Ha conservato la stessa configurazione assoluta osservata nell'isomero *E* (2).

(+)-*E-ε*-viniferin (2). Lo spettro di massa del picco isolato nella frazione 1.2 (Fig. 3) corrisponde con quello di un resveratrolo dimero, con

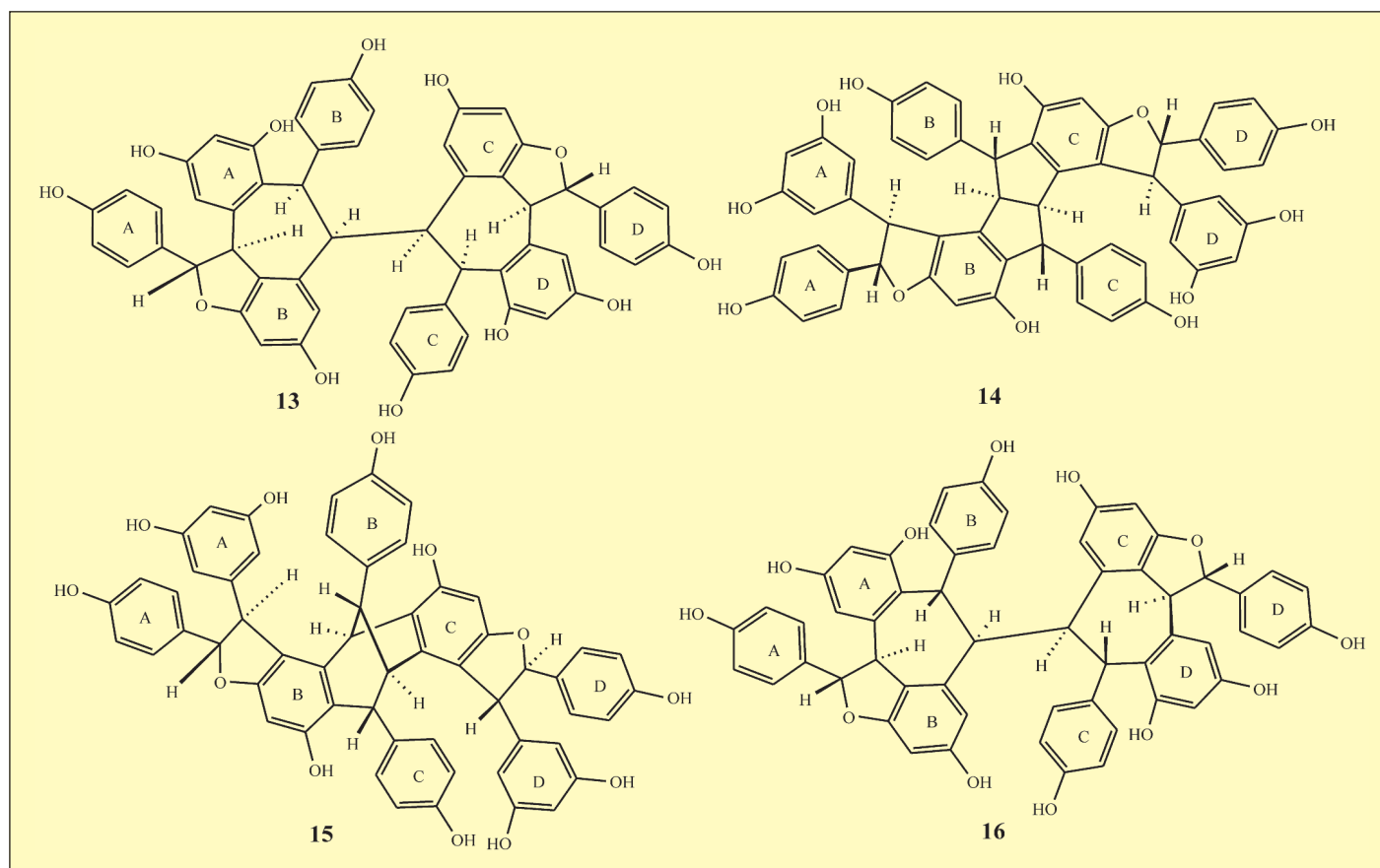
assorbimento UV e coefficiente di estinzione molecolare ( $\epsilon_{319.0} = 30633 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ;  $\epsilon_{280.0} = 24781 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) in accordo con la presenza di un doppio legame stilbenico in configurazione *E*, e dati NMR (vedi Supporting Information, versione inglese) (Fig. 4), CD ed  $\alpha$  in accordo con la struttura della (+)-*E-ε*-viniferin (2). L'isolamento di una sola e specificamente dissimmetrica struttura *trans*-, la cui configurazione assoluta all'anello *trans*-diidrobenzofuranico è stata completamente assegnata e trovata avere entrambi i centri chirali in configurazione *S*, ha confermato la alta specificità della reazione di dimerizzazione del resveratrolo, come già riportato (3).

La presenza di questo composto è molto importante, data la alta bioattività riportata per *E-ε*-viniferin contro il rilascio di zoospore da sporangi di *P. viticola* (50% inibizione a  $19 \mu\text{g/mL}$ ) e contro la mobilità delle zoospore successivo al loro rilascio (50% inibizione a  $12.5 \mu\text{g/mL}$ ), come pure nel combattere la germinazione dei conidi di *Botrytis cinerea*

(50% inibizione a  $100 \mu\text{g/mL}$ ). Inoltre, *E-ε*-viniferin e *trans*-resveratrolo sono i mattoni utilizzati per costruire diversi alti oligomeri.

$\omega$ -viniferins (3 e 4). Lo spettro di massa del picco isolato in frazione 1.4 (Fig. 3) corrisponde a quello di una miscela di due resveratroli dimeri, con assorbimento massimo UV (294.5 nm) e coefficiente di estinzione molecolare intermedi ( $\epsilon_{294.5} = 13947 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), compatibile con la presenza di una miscela di stilbeni con il doppio legame in configurazioni *Z+E*. I dati NMR (Fig. 4) e CD erano in accordo con la presenza di una miscela di due nuovi isomeri della  $\epsilon$ -viniferin, che abbiamo chiamato  $\omega$ -viniferine (Fig. 4). Si tratta di viniferine minori, dato che la quantità ottenuta era circa 6.5 inferiore rispetto a quella del maggiore dimero nell'uva, *E-ε*-viniferin (2).

I dati NMR e MS hanno suggerito che questi due dimeri del resveratrolo fossero due isomeri strutturali di *E*- e *Z-ε*-viniferin. Dato che non è stato trovato alcun cambiamento nella connettività

**Fig. 6 - Strutture degli stilbenoidi tetrameri isolati dalle foglie di vite: isohopeaphenol (13), ampelopsin H (14), isomero di vaticanol C (15) e hopeaphenol (16)**

tra gli atomi e/o nella posizione regiochimica dei nuclei aromatici in base alle misure HMBC-NMR, le differenze osservate sui dati NMR devono essere indotte da una differente relazione stereochimica ai centri chirali C7a e C8a. Le misure NOESY ci hanno permesso di stabilire che nelle  $\omega$ -viniferine H7a e H8a non erano stereochimicamente nella correlazione *trans* come usuale per gli oligomeri del resveratrolo. Infatti, per tutti gli isomeri delle  $\omega$ -viniferine la integrazione delle mappe fuori-diagonale 2D-NOESY di H-7a mostravano un più forte effetto dipolare con H-8a che con H2a/H6a, mentre l'effetto NOE di H7a con H10a/H14 non era più rilevabile. Questo risultato, che indica una stereochimica 7,8 *cis*, è in perfetto accordo con le distanze internucleari valutate nella geometria molecolare di questi composti come ottenuta mediante calcoli MM per entrambe le  $\omega$ -viniferins per le quali la distanza

H7a-H8a (2.34 Å) era trovata essere minore rispetto ad H7a—H2a/H6a (2.68 Å) mentre la distanza H7a—H10a/H14a era valutata essere tanto lunga (4.19 Å) da sfuggire alla rilevazione NOE. Il valore della costante di accoppiamento  $^3J$  (H-7/H-8) (8.0 Hz) è superiore che nelle  $\epsilon$ -viniferine, dando ulteriore supporto alla loro configurazione *cis*.

Alla luce della intrinseca elevata capacità della tecnica NMR per l'analisi quantitativa, precise misure  $^1\text{H-NMR}$  permettono di ottenere una affidabile stima del loro rapporto molare nella miscela. In base alla integrazione della area relativa dei segnali NMR dei protoni di *E*- $\omega$ -viniferin (**3**) in comparazione ai segnali di *Z*- $\omega$ -viniferin (**4**), la abbondanza relativa del primo deve essere 66% e del secondo 33%. Questo è stato confermato tramite un successivo frazionamento dei due isomeri, che ha permesso di ottenere i loro dati UV. *E*- $\omega$ -

viniferin (**3**)  $\epsilon_{318.5} = 19966 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$   $\epsilon_{280.0} = 12554 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; *Z*- $\omega$ -viniferin (**4**),  $\epsilon_{281.5} = 6754 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

*Prodotto di condensazione tra (+)-catechina ed acido trans-caffeico, 5.* Lo spettro MS del picco isolato in frazione **2.1** (Fig. 3) suggerisce una struttura ricca di ossigeno (Tab. 1) con un debole cromoforo UV con massimo a 280.5 nm ( $\epsilon_{280.5} = 7344 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), e dati NMR e CD in accordo con la presenza di una prodotto di condensazione tra (+) catechina e acido *trans*-caffeico (Fig. 4). La presenza dello scheletro della catechina ha potuto essere dedotta dai caratteristici segnali per H2 a 4.41 (d,  $J = 8.4 \text{ Hz}$ ).  $^1J$  etero correlato a C2 ( $d_C$  82.8) che permette di stabilire la stereochimica al C2-C3. Infatti, ci si sarebbe aspettato un accoppiamento molto piccolo ( $J(2,3) < 1 \text{ Hz}$ ) per H2 nella epicatechina. La configurazione al Cb è stata determinata dal pattern di

accoppiamento di Hb con i protoni diastereotopici al Ca, nonostante che un veloce flipping dell'anello lattone porti a valori di  $J$  mediati. Piccoli segnali rilevabili nello spettro  $^1\text{H-NMR}$  e DQCOSY di questo campione hanno indicato la presenza di un altro composto che potrebbe essere assegnato come il suo Cb stereoisomero in base a modifiche significative nei chemical shifts di 2Ha e Hb, mentre i segnali del nucleo della catechina di entrambi gli stereoisomeri erano quasi sovrapponibili. Una simile struttura si può formare per accoppiamento ossidativo C-C del carbonio in  $\beta$  al carbonile dell'acido caffeico con il C8 della catechina, che viene successivamente convertito nel corrispondente d lattone.

L'isolamento e caratterizzazione di questo prodotto di condensazione ha fornito l'evidenza che altri composti fenolici principali della vite partecipano ai meccanismi di ossidazione enzimatica in-



dotti dalla interazione con il patogeno. Questo ha fornito una conferma indipendente del coinvolgimento di altri composti fenolici costitutivi nella resistenza di *P. viticola* (15). Svartati fenoli e catecoli sono peraltro stati dimostrati essere forti inibitori delle laccasi di *B. cinerea*. Attraverso l'inibizione della stilbene ossidasi, i composti fenolici costitutivi potrebbero attenuare la difesa contro *Botrytis*, preparando un "terreno sicuro" per le classiche fitoalessine (16).

**Pallidol (6).** Lo spettro MS del picco isolato in frazione 2.2 (Fig. 3) corrisponde a quello di un resveratrolo dimero. Sia i dati NMR, che CD ed  $\alpha$  erano in accordo con la struttura nota del pallidol (Fig. 4) (17,19). Questo stilbenoide è conosciuto per essere facilmente prodotto da *trans*-resveratrolo trattato con colture di *Botrytis cinerea* (20) o con perossidasi (21). Nell'ultimo caso, è stata riportata la produzione di ( $\pm$ )-pallidol. La mancanza di attività ottica potrebbe non essere dovuto alla racemizzazione dei suoi centri chirali, ma alla intrinsecamente bassa dissimmetria della intera molecola che contiene infatti un asse interno di simmetria C<sub>2</sub>. Sebbene, in principio, la presenza di questo elemento di simmetria non faccia diventare il pallidol una molecola achirale, potrebbe diminuire le sue proprietà chiroptiche. Vale la pena di ricordare che i dati NMR del composto "4" riportato in Kulesh et al., (22) come (-)-pallidol otticamente attivo non sono in accordo con i dati NMR di campioni di pallidol e sono chiaramente inconsistenti con qualsiasi ragionevole struttura di dimero del resveratrolo.

**Ampelopsin D (7)** e suo regioisomero, quadrangularin A (8). Lo spettro MS del picco isolato in frazione 3.1 (Fig. 3) corrisponde a quello di un resveratrolo dimero, con assorbimento UV e coefficiente di estinzione molecolare ( $\epsilon_{313.5} = 24573 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{280.0} = 15261 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) in

accordo con la presenza di un doppio legame stilbenico in configurazione *E* che assorbe a 313.5 nm, e spettri NMR in accordo con la presenza di una miscela 1:1 di due composti già identificati quali stilbeni costitutivi di alcune Vitaceae, rispettivamente ampelopsin D (7) (23-24) e il suo regioisomero, quadrangularin A (8) (25) (Fig. 4). L'attribuzione della struttura di questi isomeri *trans*- ha richiesto qualche attenzione e la comparazione con un'altra struttura simile, parthenocissin A (26) a causa delle informazioni conflittuali riportate nelle referenze citate. Al contrario di quanto riportato in letteratura (25), dove si asserisce che "i dati NMR di ampelopsin D (23) sono molto simili a quelli di quadrangularin A e la sua struttura dovrebbe attualmente essere la stessa di quadrangularin A", noi confermiamo qui che una attenta analisi dei dati NMR del nostro campione che contiene entrambi i dimeri in quantità quasi equimolecolari porta alla definitiva dimostrazione che queste strutture sono diverse, in accordo con la controindagine spettroscopica di Niwa et al (27).

È stato suggerito (24) che (-)-ampelopsin D (7) viene sintetizzata dalle Vitaceae dal suo precursore (+)-*E*- $\epsilon$ -viniferin (2), attraverso una iniziale protonazione acida dell'atomo di ossigeno all'anello diidrofuranico, seguita da attacco nucleofilo del doppio legame e formazione di un anello intermedio a cinque membri, che si deprotona per formare (-)-ampelopsin D (7). Un tale meccanismo, che potrebbe giustificare la presenza di questo composto, è però incompatibile con la formazione di quadrangularin A (24,27). Una reazione stereoselettiva, che apparentemente segue una ciclizzazione biomimetica di stilbeni naturali durante la oligomerizzazione ossidativa, è stata dimostrata capace di produrre sia ampelopsin D che quadrangularin A, attraverso diversi meccanismi (28). La presenza sia di ampelopsin D (7) che quadrangularin A (8) in ibridi di

*V. vinifera* è qui riportata per la prima volta.

## I trimeri

**$\alpha$ -viniferin (9).** Lo spettro MS del picco isolato in frazione 3.2 (Fig. 3) corrisponde a quello di un resveratrolo trimero, con un cromoforo UV di media intensità ( $\epsilon_{282.5} = 6265 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e A280/A320 = 0.238 (Fig. 2), compatibile con la presenza di anelli fenolici isolati. I dati NMR, UV e CD erano in accordo con la struttura nota della  $\alpha$ -viniferin (Fig. 5), che era il primo stilbenoide con proprietà antifungine scoperto nelle foglie di vite infettate da *B. cinerea* (29). Questo composto è stato riportato anche in foglie di vite infettate con *P. viticola*, ma non in foglie irraggiate con luce UV (30). Nel nostro caso, le quantità isolate erano sufficienti a fornirci per la prima volta il suo spettro <sup>13</sup>C NMR e potere ottico rotatorio, confermando una struttura dissimmetrica con  $[\alpha]_{589}^{\text{MeOH}, c=0.14} = -46$ .

Secondo Langcake e Pryce (3),  $\alpha$ -viniferin inibisce il rilascio di zoospore da sporangi di *P. viticola*, inibisce la motilità delle zoospore dopo il loro rilascio ed è anche particolarmente attiva nei confronti della germinazione dei conidi di *B. cinerea*. Dopo gli studi pionieristici di Pryce e Langcake (29), la presenza di questo composto, come pure di altre presunte viniferine non caratterizzate strutturalmente, quali  $\beta$ -viniferin e  $\gamma$ -viniferin (3), è stata trascurata, forse per la difficoltà di identificarla e caratterizzarla. Ne consegue che il nostro studio conferma per la prima volta la presenza di  $\alpha$ -viniferin (9) in foglie di vite infettate con *P. viticola*.

***E*-cis-miyabenol C (10).** Le strutture molecolari di 10, 11 e 12 erano strettamente correlate. Lo spettro MS di 10, isolato in frazione 4.1 (Fig. 3) era quello di un resveratrolo trimero, con un forte cromoforo UV ( $\epsilon_{320.5} = 11096 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{280.0} = 8935 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) compatibile con la presenza di un doppio legame *trans*-stil-

benico nella struttura. I dati NMR e CD erano in accordo con un nuovo stereoisomero di *E*-miyabenol C (Fig. 5). Una attenta analisi in NMR delle tracce HMBC suggerisce la stessa connettività degli atomi come per *E*-miyabenol C (12) ma le misure NOESY indicavano un effetto dipolare NOE molto forte del doppietto  $\delta_{\text{H}} 3.71$  (H8a) con il suo protone vicinale H7a a  $\delta_{\text{H}} 5.66$  e un medio NOE con H8b. Così, abbiamo ottenuto evidenza per suggerire qui la stereochimica 7a,8a *cis* per il composto 10. Forti differenze nelle frequenze in <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H-NMR per quasi tutti i nuclei nella parte sinistra della struttura (quella che contiene la giunzione con l'anello *cis*) e forti similarità dei  $\delta$  per quelle dalla parte opposta supportano la nostra assegnazione. Anche i calcoli MM confermano questa ipotesi, suggerendo una struttura a geometria ottimizzata dove gli angoli torsionali H7a-H7b e H8a, H8b sono trovati essere rispettivamente -24° e 149°, portando a valutazioni di  $J(7a,8a) = 6.8 \text{ Hz}$  e  $J(7b,8b) = 8.9 \text{ Hz}$ , in buon accordo con i loro valori sperimentali.

Questo nuovo stereoisomero del miyabenol C potrebbe derivare dalla addizione di un singolo intermedio *trans*-resveratrolo ossidato, con il radicale in posizione  $\alpha$  sul doppio legame stilbenico, ad un anello *m*-difenolo del dimero (+)-*E*- $\epsilon$ -viniferin. La stereochimica di (+)-*E*- $\epsilon$ -viniferin viene completamente ritenuta, mentre l'anello diidrofuranico di nuova formazione ha la stessa, poco comune stereochimica *cis*- già trovate nelle  $\omega$ -viniferine (3,4). Una simile stereochimica nella condensazione della unità resveratrolo terminale è già stata osservata nella formazione del tetramero kobophenol A da *E*-miyabenol C nelle radici di *Carex kobomugi* Ohwi (31).

***Z*-Miyabenol C (11).** Lo spettro MS del picco isolato in frazione 5.1 (Fig. 3) corrispondeva ad un resveratrolo trimero, con forte cromoforo UV ( $\epsilon_{281.5} = 14025 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),

in accordo con la presenza di un doppio legame *cis*-stilbenico nella struttura. Sia i dati NMR che CD erano in accordo con la struttura di *Z*-miyabenol C (**11**) (**Fig. 5**) (31) che non era mai stato riportato in vite.

I dati NMR per questo composto sono quasi sovrapponibili a quelli di miyabenol C nelle unità A e B, mentre ci sono significative differenze nei dintorni della unità C a conseguenza della presenza del doppio legame *Z* 7c/8c. Le stereochimiche relative sui centri chirali 7a/8a e 7b/8b è stata stabilita essere *trans* in base agli effetti NOE dei corrispondenti segnali dei protoni. Inoltre la forte NOE osservata tra H8a e H8b nello spettro NOESY ha suggerito una relazione *cisoidale* in questa struttura.

*E*-Miyabenol C (**12**). Lo spettro MS del picco isolato in frazione **5.2** (**Fig. 3**) corrispondeva a quello di un resveratrolo trimero e sia i dati NMR che CD erano in accordo con la struttura di *E*-miyabenol C (**12**, **Fig. 5**). I nostri dati NMR e CD erano in buon accordo con la letteratura (31-32). In particolare, la stereochimica dei benzodihidrofuranici al C7a/C8a e C8a/8b è stata confermata essere *trans* e, come osservato in **11**, è stata osservata una relazione *cisoidale* di H8a rispetto ad H8b. La quantità di **12** recuperata dalle nostre foglie di vite era la terza più alta tra tutte le viniferine, e la maggiore tra i trimeri (**Tab. 1**). Questo è in buon accordo con l'osservazione che la sua formazione richiede l'aggiunta di un radicale resveratrolo a **2**, che è il principale dimero, ripetendo lo stesso meccanismo che aveva portato alla formazione di **2**, così da ottenere la stereochimica di **12**. *E*-Miyabenol C viene qui riportato per la prima volta nelle foglie di vite. La vite è capace di sintetizzarlo, dato che è già stato isolato tra i trimeri costitutivi dei germogli di *V. vinifera* (33).

*Isohopeaphenol* (**13**). Lo spettro MS del picco isolato

in frazione **6.1** (**Fig. 3**) corrisponde a quello di un resveratrolo tetramero, con cromoforo UV di media intensità ( $\epsilon_{281,0} = 10929 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e  $A_{280}/A_{320} = 0.266$  (**Fig. 2**), in accordo con la assenza di coniugazione tra gli anelli fenolici. I dati NMR, CD e a erano compatibili con la struttura nota del tetramero simmetrico isohopeaphenol (**13**, **Fig. 6**), una viniferina già caratterizzata nel legno della *V. vinifera* 'Kyohou' (34).

La struttura di isohopeaphenol è stata chiarita per comparazione con i dati NMR di hopeaphenol **16** (**Fig. 6**). I nostri dati NMR sono in buon accordo con quelli di Ito et al. (34) per isohopeaphenol, questi autori non hanno riportato però il solvente NMR utilizzato. La stereochimica relativa ai centri chirali è stata confermata da esperimenti NOESY.

Isohopeaphenol è stato osservato qui per la prima volta, come il composto isolato in quantità di gran lunga maggiore dalle foglie di vite infettate da *P. viticola* (**Tab. 1**). Hopeaphenol, un isomero strutturalmente molto simile, è stato isolato come stilbenoide costitutivo delle radici di *V. vinifera* cv. Chardon-nay, dove la sua concentrazione era nell'intervallo 0.5-8 mg/g di radice fresca (9).

*Ampelopsin H* (**14**). Lo spettro MS del picco isolato in frazione **7.1** (**Fig. 3**) corrispondeva con un resveratrolo tetramero, con cromoforo UV di media intensità ( $\epsilon_{281,0} = 12710 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), e  $A_{280}/A_{320} = 0.253$  (**Fig. 2**), in accordo con l'assenza di coniugazione tra gli anelli fenolici. Sia i dati NMR che CD erano in accordo con la presenza di un tetramero simmetrico, con la struttura di un derivato del pallidol, corrispondente a quella di ampelopsin H (**14**, **Fig. 6**) (23). Una struttura non osservata in precedenza nella vite.

Ampelopsin H è un tetramero simmetrico con un asse C2 che causa l'equivalenza chimica degli atomi di idrogeno e carbonio nelle unità A e B con quelle rispettivamente

delle unità D e C. Una evidente differenza con il pallidol, è che ampelopsin H mostra un forte effetto Cotton nel suo spettro CD, indicando che questo composto dovrebbe essere enantiomericamente puro.

Le unità A e D con identica configurazione relativa ed assoluta ai centri chirali 7a,8a e 7d, 8d legati al sistema ad anello interno del pallidol (unità B e C) sembra rafforzare la dissimmetria complessiva di questa molecola.

Questo tetramero potrebbe derivare dalla addizione di due intermedi ossidati *trans*-resveratrolo, entrambi con il radicale in posizione  $\alpha$ , sul doppio legame stilbenico, a ciascuno degli anelli *m*-difeno del dimero pallidol (2.2). La stereochimica del pallidol viene completamente conservata al centro del tetramero (**Fig. 6**), mentre entrambi gli anelli diidrofuranici di nuova formazione hanno la stereochimica *trans*, in base alle misure NOESY.

## I trimeri

*Un isomero di vaticanol-C* (**15**). Lo spettro MS del picco isolato in frazione **7.2** (**Fig. 3**) corrispondeva a quello di un resveratrolo tetramero, con un cromoforo UV di media intensità ( $\epsilon_{281,0} = 14832 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), ed  $A_{280}/A_{320} = 0.280$  (**Fig. 2**), in accordo con l'assenza di coniugazione tra gli anelli fenolici. Sia i dati NMR, CD che la rotazione ottica erano in accordo con la presenza di un tetramero asimmetrico, con un caratteristico sistema dibenzobicyclo[3.2.1]ottadiene, contenente due anelli diidrofuranici con i loro costituenti fenolici in configurazione *trans*- (**Fig. 6**). Mentre i dati NMR delle unità parziali A e D sono facilmente assegnabili attraverso tecniche 2D-NMR, l'interpretazione degli stessi dati era molto più complessa quando si rivolge l'attenzione alla parte centrale (unità B e C) di questo composto. L'analisi era complicata non solo dalla limitata quantità di questo tetramero ma, principalmente, dalla presenza di

svariati picchi di scambio-poco risolti, nel suo spettro  $^1\text{H}$  e per il basso rapporto segnale rumore negli spettri HSQC e HMBC. In particolare i segnali dei protoni accoppiati in orto ad H2c/H6c (6.92 ppm) e H3b/H5b (6.55 ppm) appaiono come dei doppietti molto larghi, indicando quindi una rotazione ostacolata attorno al legame singolo C1c-C7c. Dato che quattro atomi di idrogeno methine possono essere assegnati per la loro caratteristica risonanza H/C alle posizioni benzeniche 7b/8b e 7c/8c, assumiamo che la struttura di questo tetramero dovrebbe essere quella di un isomero di vaticanol C, ma sono necessarie più dettagliate misure NMR a partire da una quantità maggiore di standard di **15** per definire la sua struttura.

Il Vaticanol C non è mai stato riportato in *Vitis*, mentre è stato già isolato nel legno del fusto di *Vatica rassak* (Dipterocarpaceae) (35) durante una ricerca di stilbenoidi con proprietà anticancro ed epatoprotettive. È stato trovato recentemente che è un forte inibitore delle Matrix metalloproteinases (MMPs) (36). La particolare struttura dell'isomero di vaticanol C potrebbe forse derivare da una condensazione diretta di due unità di *E*- $\epsilon$ -viniferin, che condensando attraverso i doppi legami stilbenici, producono un sistema a dibenzobicyclo ottadiene. Questo sarebbe consistente con il fatto che i dati NMR sono compatibili con l'ipotesi che sia conservata la configurazione di **2** ad entrambi gli anelli diidrofuranici.

In conclusione, tre tetrameri sono stati isolati per la prima volta da foglie di vite infettate con *P. viticola*. È probabile che uno di questi corrisponda con la viniferina non caratterizzata osservata da Langcake e Pryce (3). Le quantità erano decisamente elevate, cioè comparabili con quelle di *E*- $\epsilon$ -viniferin (**Tab. 1**).

**Meccanismo di formazione delle viniferine.** Gli enzimi necessari per la formazione delle viniferine sono

espressi sia nei patogeni che nelle piante. La evidenza della capacità della vite di sintetizzare direttamente le viniferine viene dalla loro presenza costitutiva in grandi quantità in alcune parti della pianta, considerando che svariati stilbeni (10,37) e stilbenoidi oligomeri (9) sono presenti a livelli di grammi per kg nelle radici di vite.  $\epsilon$ -viniferin è stata riportata essere uno stilbene costitutivo del raspo (38). Inoltre, la sintesi di 3 dimeri (due glucosidi di  $\delta$ -viniferin e pallidol) è stata dimostrata nelle colture cellulari di *V. vinifera* (39).

Viniferine "inducibili" possono derivare dalla oligomerizzazione del *trans*-resveratrolo nei tessuti della vite come una strategia di difesa attiva della pianta. Sono difficilmente rilevabili nelle foglie sane, e svariati articoli hanno provato la induzione di sostanziali accumuli di questi composti nelle foglie infette.

Viniferine "metabolizzate" possono essere prodotte o modificate dal rilascio di enzimi esocellulari rilasciati dal patogeno nel tentativo di eliminare indesiderabili composti tossici.

Il profilo delle viniferine trovato nelle foglie infette di vite non presenta alcune delle viniferine costitutive riportate nei tessuti di vite sani, quali ad esempio ampelopsin A e hopeaphenol (9), r-viniferin (37), r-2-viniferin (10), gnetin H (37), *trans*-miyabenol C (33), *trans*-amurensin B, amurensin G e ampelopsin F (45).

Mentre la presenza nei nostri genotipi parzialmente resistenti di numerose viniferine otticamente attive, piuttosto che di racemi, suggerisce un alto livello di controllo della biosintesi, supportando la teoria delle viniferine "inducibili", non è stato possibile escludere la possibile presenza di metaboliti dovuti a laccasi e perossidasi fungine. Non abbiamo osservato la presenza di  $\delta$ -viniferin né di alcun altro stilbenoide che sia formato attraverso il coinvolgimento di un radicale di resveratrolo del tipo C (21).

La differenza tra il pattern

delle viniferine nel nostro studio e quelli ottenuti negli studi precedenti (40,41,42, 43,44), potrebbe essere dovuta a differenze nelle varietà di vite e nei metodi utilizzati, ed è compatibile con l'ipotesi che sia la pianta, piuttosto che il patogeno, ad essere responsabile per il complesso pattern di viniferine osservato nelle viti infettate da *P. viticola*. In prospettiva, per valutare se il risultato di questo studio sia generalizzabile, sarebbe molto interessante studiare altri genotipi resistenti nel confronto con diversi patogeni, al fine di analizzare il profilo di accumulazione delle viniferine.

Le foglie infette accumulano una quantità sostanziale di viniferine. Si deve osservare che gli stilbenoidi, una classe di viniferine "orfane", trascurata negli studi precedenti, erano di gran lunga la classe più importante dal punto di vista quantitativo nei nostri genotipi di Merzling x Teroldego (Tab. 1).

Nonostante le inevitabili perdite che si producono in un complesso processo di isolamento, abbiamo potuto ricavare un totale di 14.74 mg di viniferine (stilbeni e stilbenoidi) a partire da 517 g di foglie, pari a 28.5 mg/kg FW. Una simile concentrazione è considerata importante per spiegare la resistenza della pianta, alla luce della bassa concentrazione - usualmente nell'intervallo dei  $\mu\text{g/mL}$  - richiesta per la bioattività verso *P. viticola*. Inoltre, si deve tenere in conto che questi valori sono stati prodotti a partire dall'intera foglia, ed è noto che sono assenti nelle foglie sane, mentre la loro presenza è limitata alla zona infetta e ad una sottile zona fluorescente vicinale (2). È necessario ulteriore lavoro per valutare la bioattività dei nuovi oligomeri, che nel caso di isohopeaphenol, E-miyabenol C, l'isomero di vaticanol C e pallidol, sono importanti metaboliti di stress che si accumulano nelle foglie infette dei genotipi parzialmente resistenti di Merzling x Teroldego.

## Riassunto

Nelle Vitaceae, le viniferine rappresentano un gruppo relativamente ristretto di oligomeri del *trans*-resveratrolo dotati di proprietà antifungine, che permettono alle piante di resistere all'attacco dei patogeni.

Lo scopo di questo studio era di realizzare l'isolamento e caratterizzazione strutturale dell'intera classe delle viniferine che si accumulano nelle foglie dei genotipi degli ibridi *V. vinifera* (Merzling x Teroldego) infettati con *Plasmopara viticola*. Le foglie infette sono state raccolte dalle piante resistenti 6 giorni dopo l'infezione. Alla estrazione con metanolo segue una prima purificazione mediante cromatografia flash usando le resine ENV+ e Toyopearl HW. Due frazionamenti complementari, rispettivamente via cromatografia preparativa in fase normale seguita da cromatografia preparativa in fase inversa, hanno permesso di isolare 14 picchi.

I composti isolati sono stati identificati utilizzando tecniche avanzate di spettrometria di massa, misure estensive di risonanza magnetica nucleare mono e bidimensionale, UV, CD, proprietà ottiche e calcolo delle meccaniche molecolari. I risultati hanno dimostrato la presenza nelle foglie infette di sette dimeri (sei stilbeni e uno stilbenoide), dei quali 4 nuovi per la vite (ampelopsin D, quadrangularin A, E- $\omega$ -viniferin e Z- $\omega$ -viniferin), quattro trimeri (tre stilbeni e uno stilbenoide), dei quali due (Z-miyabenol C e E-*cis*-miyabenol C) nuovi nella vite, quattro stilbenoidi tetrameri, tutti nuovi nella vite, isohopeaphenol, ampelopsin H e un isomero simile al vaticanol C.

L'isolamento di un dimero che deriva dalla condensazione della (+)-catechina con l'acido *trans*-caffeoico indica inoltre che altri composti fenolici presenti vengono modificati strutturalmente nei tessuti infettati da *P. viticola*.

**Finanziamento.** Questo lavoro ha avuto il supporto dai Progetti "Resveratrol" e ADP 2010, entrambi finanziati dalla Provincia Autonoma di Trento, Italia.

**Ringraziamenti.** I nostri ringraziamenti a Francesco Berghi per la sua collaborazione alla definizione dei metodi di HPLC preparativo.

**Supporting Information (in inglese).** S1: Schema dell'esperimento. S2: Dati strutturali addizionali dei composti isolati. Questo materiale è disponibile gratuitamente via Internet (<http://pubs.acs.org>).

## Riferimenti bibliografici

1. Bavaresco, L.; Fregoni, C.; Van Zeller de Macedo Basto Goncalves, M.I.; Vezzulli, S. Physiology and molecular biology of grapevine stilbenes: an update. *In Grapevine Molecular Physiology and Biotechnology*, 2nd edn., K.A., Roubelakis-Angelakis (ed.), Springer Science + Business Media B.V., London, UK 2009, 341-364.
2. Langcake, P.; Cornford, C.A.; Pryce, R.J. Identification of pterostilbene as a phytoalexin from *Vitis vinifera* leaves. *Phytochemistry* 1979, 18, 1025-1027.
3. Langcake, P.; Pryce, R.J. A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia* 1977, 33, 151-152.
4. Jeandet P.; Douillet-Breuil, A.C.; Bessis, R.; Debord, S.; Sbaghi, M.; Adrian, M. Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 2731-2741.
5. Pezet, R.; Perret C.; Jean-Denis, J.B.; Tabacchi, R.; Gindro, K.; Viret, O. Delta-viniferin, a resveratrol dehydromer: one of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 5488-5492.
6. Chong, J.; Poutaraud, A.; Huguency, P. Metabolism and

- roles of stilbenes in plants. *Plant Sci.* 2009, 177, 143-155.
7. Dell'Agli, M.; Galli, G.V.; Vrhovsek, U.; Mattivi, F.; Bosio, E. In vitro inhibition of human cGMP-specific phosphodiesterase-5 by polyphenols from red grapes. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53, 1960-1965.
8. Mattivi, F.; Reniero, F.; Korhammer, S. Isolation, characterization, and evolution in red wine vinification of resveratrol monomers. *J. Agric. Food Chem.* 1995, 43, 1820-1823.
9. Reniero, F.; Rudolph, M.; Angioni, A.; Bernreuther, A.; Cabras, P.; Mattivi, F. Identification of two stilbenoids from *Vitis* roots. *Vitis*, 1996, 35, 125-127.
10. Korhammer, S.; Reniero, F.; Mattivi, F. An oligostilbene from *Vitis* roots. *Phytochemistry* 1995, 38, 1501-1504.
11. Hillis, W.E.; Ishikura, N. The chromatographic and spectral properties of stilbene derivatives. *J. Chromatogr.* 1968, 32, 323-336.
12. Mattivi, F.; Reniero, F. Relationship between UV spectra and molecular structure of resveratrol oligomers. *Polyphenols Communications* 1996, 96, 125-126.
13. Stevens, J. D.; Fletcher, H.G. Proton magnetic resonance spectra of pentofuranose derivatives. *J. Org. Chem.* 1968, 33, 1799-1805.
14. Wehrli, F.W.; Wirtlin, T. In: Interpretation of Carbon-13-NMR-Spectra. Heyden Verlag, London New York Rheine, 1976, 28-37.
15. Agati, G.; Cerovic G.Z.; Dalla Marta, A.; Di Stefano, V.; Pinelli, P.; Traversi, M.L.; Orlandini, S. Optically-assessed preformed flavonoids and susceptibility of grapevine to *Plasmopara viticola* under different light regimes. *Funct. Plant Biol.* 2008, 35, 77-84.
16. Goetz, G.; Fkyerat, A.; Métais, N.; Kunz, M.; Tabacchi, R.; Pezet, R.; Pont, V. Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase. *Phytochemistry* 1999, 52, 759-767.
17. Khan, M.A.; Nabi, S.G.; Prakash S.; Zaman, A. Pallidol, a resveratrol dimer from *Cissus pallida*. *Phytochemistry* 1986, 25, 1945-1948.
18. Ohyama, M.; Tanaka, T.; Iinuma, M.; Goto, K. 2 novel resveratrol trimers, leachianol-A and Leachianol-B, from *Sophora-Leachiana*. *Chem. Pharm. Bull.* 1994, 42, 2117-2120.
19. Snyder, S.A.; Zografos, A.L.; Lin, Y. Total synthesis of resveratrol-based natural products: a chemoselective solution. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 46, 8186-8191.
20. Cichewicz, R. H.; Kouzi, S. A.; Hamann, M. T. Dimerization of resveratrol by the grapevine pathogen *Botrytis cinerea*. *J. Nat. Prod.* 2000, 63, 29-33.
21. Takaya, Y.; Terashima, K.; Ito, J.; He, Y.H.; Tateoka, M.; Yamaguchi, N.; Niwa, M. Biomimetic transformation of resveratrol. *Tetrahedron* 2005, 61, 10285-10290.
22. N. I. Kulesh, N.I.; Veselova, M.V.; Fedoreev, S.A.; Denisenko, V.A. Polyphenols from *Vitis amurensis* stems. *Chem.Nat.Comp.* 2006, 42, 235-237.
23. Oshima, Y.; Ueno, Y. Ampelopsin-D, Ampelopsin-E, Ampelopsin-H and cis-ampelopsin-E, oligostilbenes from *Ampelopsis brevipedunculata* var. *Hancei* roots. *Phytochemistry* 1993, 33, 179-182.
24. Takaya, Y.; Yan, K.X.; Terashima, K.; Ito, J.; Niwa, M. Chemical determination of the absolute structures of resveratrol dimers, ampelopsins A, B, D and F. *Tetrahedron* 2002, 58, 7259-7265.
25. Adesanya, S. A.; Nia, R.; Martin, M.-T.; Boukamcha, N.; Montagnac, A.; Pais, M. Stilbene Derivatives from *Cissus quadrangularis*. *J. Nat. Prod.* 1999, 62, 1694-1695.
26. Tanaka, T.; Iinuma, M.; Murata, H. Stilbene derivatives in the stem of *Parthenocissus quinquefolia*. *Phytochemistry* 1998, 48, 1045-1049.
27. Niwa, M.; Ito, J.; Terashima, K.; Koizumi, T.; Takaya, Y.; Yan, K.X. (-)-ampelopsin D is different from (-)-quadrangularin A. *Heterocycles*, 2000, 53, 1475-1478.
28. Li, X.C.; Ferreira, D. Stereoselective cyclization of stilbene derived carbocations. *Tetrahedron*, 2003, 59, 1501-1507.
29. Pryce, R.J.; Langcake, P.  $\alpha$ -viniferin: an antifungal resveratrol trimer from grapevines. *Phytochemistry*, 1977, 16, 1452-1454.
30. Langcake, P.; Pryce, R.J. The production of resveratrol and the viniferins by grapevine in response to ultraviolet irradiation. *Phytochemistry* 1977, 16, 1193-1196.
31. Kurihara, H.; Kawabata, J.; Ichikawa, S.; Mishima, M.; Mizutani, J. Oligostilbenes from *Carex kobomugi*. *Phytochemistry* 1991, 30, 649-653.
32. Suzuki, K.; Shimizu, T.; Kawabata, J.; Mizutani, J. New (3,5,4')-Trihydroxystilbene (Resveratrol) oligomers from *Carex fedia* Nees var. *miyabei* (Franchet) T. Koyama (Cyperaceae). *Agric. Biol. Chem.* 1987, 51, 1003-1008.
33. Barjot, C.; Tournaire, M.; Castagnino, C.; Vigor, C.; Vercauteren, J.; Rossi, J.F. Evaluation of antitumor effects of two vine stalk oligomers of resveratrol on a panel of lymphoid and myeloid cell lines: Comparison with resveratrol. *Life Sci.* 2007, 81, 1565-1574.
34. Ito, J.; Niwa, M.; Oshima, Y. A new hydroxystilbene tetramer named isohopeaphenol from *Vitis vinifera* 'Kyohou'. *Heterocycles* 1997, 45, 1809-1813.
35. Tanaka, T.; Ito, T.; Nakaya, K.; Iinuma, M.; Riswan, S. Oligostilbenoids in stem bark of *Vatica rassak*. *Phytochemistry* 2000, 54, 63-69.
36. Abe, N.; Ito, T.; Ohguchi, K.; Nasu, M.; Masuda, Y.; Oyama, M.; Nozawa, Y.; Ito, M.; Iinuma, M. Resveratrol oligomers from *Vatica albiramis*. *J. Nat. Prod.* 2010, 73, 1499-1506.
37. Mattivi, F.; Reniero, F. Oligostilbenes from the roots of genus *Vitis*. *Bull. Liaison Groupe Polyphenols* 1992, 16, 116-118.
38. Bavaresco, L.; Cantù, E.; Fregoni, M.; Trevisan, M. Constitutive stilbene contents of grapevine cluster stems as potential source of resveratrol in wine. *Vitis* 1997, 36, 115-118.
39. Waffo-Teguo, P.; Lee, D.; Cuendet, M.; Merillon, J.M.; Pezzuto, J.M.; Douglas King-horn, A.D. Two new stilbene dimer glucosides from grape (*Vitis vinifera*) cell cultures. *J. Nat. Prod.* 2001, 64, 136-138.
40. Pezet, R.; Gindro, K.; Viret, O.; Spring, J.-L. Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2004, 65, 297-303.
41. Pezet, R.; Gindro, K.; Viret, O.; Richter, H. Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *Vitis* 2004, 43, 145-148.
42. Gindro, K.; Spring, J.L.; Pezet, R.; Richter, H.; Viret, O. Histological and biochemical criteria for objective and early selection of grapevine cultivars resistant to *Plasmopara viticola*. *Vitis* 2006 45, 191-196.
43. Bavaresco, L.; Vezzulli, S.; Civardi, S.; Gatti, M.; Battilani, P.; Pietri, A.; Ferrari, F. Effect of lime-induced leaf chlorosis on ochratoxin A, trans-resveratrol, and epsilon-viniferin production in grapevine (*Vitis vinifera* L.) berries infected by *Aspergillus carbonarius*. *J. Agric. Food Chem.* 2008 56, 2085-2089.
44. Alonso-Villaverde, V.; Voinesco, F.; Viret, O.; Spring, J. L.; Gindro, K. The effectiveness of stilbenes in resistant *Vitaceae*: Ultrastructural and biochemical events during *Plasmopara viticola* infection process. *Plant Physiol Biochem* 2010 49, 265-274.
45. Ha, D.T.; Chen, Q.C.; Hung, T.M.; Youn, U.J.; Ngoc, T.M.; Thuong, P.T.; Kim, H.J.; Seong, Y.H.; Min, B.S.; Bae, K.H. Stilbenes and oligostilbenes from leaf and stem of *Vitis amurensis* and their cytotoxic Activity. *Arch Pharm Res.* 2009, 32, 177-183.

"Translated, adapted and reproduced with permission from *J. Agric. Food Chem.*, 2011, 59, 5364-5375. Copyright 2011 American Chemical Society. This is an unofficial translation of an article that appeared in an ACS publication. ACS has not endorsed the content of this translation or the context of its use."