

Inibizione da fenilpropani sulla crescita di microalghe: osservazioni preliminari sul rapporto struttura attività

*ANTONINO POLLIO, *GABRIELE PINTO, **MARINA DELLA GRECA

*Dipartimento di Biologia Vegetale, Facoltà di Scienze, Università degli Studi di Napoli Federico II, via Foria 223, 80139 Napoli.

**Dipartimento di Chimica Organica e Biologica, Facoltà di Scienze, Università degli Studi di Napoli Federico II, via Mezzocannone 16, 80100 Napoli.

Abstract

A preliminary study of structure-biological activity relationship of 15 natural or synthetic phenylpropanoids has been planned. The compounds have been tested for their *in vitro* anti-algal activity against 18 strains of freshwater microalgae. Natural phenylpropanoids with three substituents have evidenced the highest antialgal activity. From a taxonomic point of view cyanobacteria showed a marked sensitivity to phenylpropanoids whilst among green algae the most sensitive strain was *Selenastrum capricornutum*.

INTRODUZIONE

Lo studio delle interazioni tra i vegetali ha evidenziato come molte piante siano potenzialmente in grado di rilasciare nell'ambiente sostanze chimiche che influenzano la crescita di altre specie (allelopatia).

In particolare, i composti derivati dalla via biosintetica del

l'acido scichimico, soprattutto acidi fenolici e cumarine, sono da lungo tempo indicati tra le sostanze allelochimiche più attive nel mondo vegetale (RICE, 1984). Le modalità di diffusione di questi composti negli ecosistemi terrestri sono state studiate (DAO, 1987), così come i loro effetti tossici sulla germinazione dei semi (BEWLEY & BLACK, 1985; ALIOTTA *et al.*, 1992a) e sulla crescita delle plantule (EINHELLIG, 1986).

Lo studio delle interazioni possibili tra i componenti vegetali di ecosistemi acquatici ha invece evidenziato una marcata attività antialgale di altri composti fenolici, i fenilpropani, presenti in numerose piante acquatiche quali: *Acorus gramineus* Soland (DELLA GRECA *et al.*, 1989), *Pistia stratiotes* L. (ALIOTTA *et al.*, 1991) e *Myriophyllum verticillatum* L. (ALIOTTA *et al.*, 1992b).

La tossicità esercitata dai fenilpropani sulle microalghe sembra essere selettiva: prove effettuate *in vitro* hanno dimostrato che i cianobatteri sono sensibili sia all'azione dei fenilpropani liberi che di quelli glucosilati, mentre le alghe verdi risultano inibite soltanto dai primi (ALIOTTA *et al.*, 1992b). Inoltre composti con numero diverso di sostituenti sull'anello benzenico o con uguale numero di sostituenti ma con differente configurazione presentano attività biologica differenziata; in particolare l' α -asarone (2,4,5 trimetossi-E-propenil benzene) è più attivo del suo stereoisomero β -asarone (2,4,5 trimetossi-Z-propenilbenzene) e quest'ultimo risulta essere più attivo dell'isoeugenolo metil etere (3,4-dimetossi-E-propenilbenzene) (DELLA GRECA *et al.*, 1989; ALIOTTA *et al.*, 1991).

In questo lavoro 15 fenilpropani, naturali e di sintesi, variamente sostituiti, sono stati saggiati contro 18 ceppi di microalghe, appartenenti alle Cyanochloronta, Rhodophycophyta, Chrysophycophyta e Chlorophycophyta, allo scopo di verificare in maggior dettaglio sia la relazione tra struttura chimica ed attività antialgale di questi composti, sia una loro eventuale tossicità selettiva sulle microalghe.

MATERIALI E METODI

Gli esperimenti sono stati eseguiti su 18 ceppi di microalghe

di acqua dolce (Tab. 1) provenienti dalla Collezione del laboratorio di algologia del Dipartimento di Biologia Vegetale di Napoli (PINO et al., 1992).

Tutte le alghe erano coltivate su mezzo di coltura Bold Basal Medium (BBM) (NICHOLS, 1973) modificato per il ceppo T656 (*Navicula minima*) con aggiunta di Na_2CO_3 (0,2mg/l) e Na_2SiO_3 (0,25 mg/l).

Tab. 1 - Microalghe utilizzate nei saggi biologici.

Phylum	Ceppo	Specie
Cyanochloronta	T 485	<i>Plectonema boryanum</i>
	T 584	<i>Nostoc commune</i>
	T 625	<i>Synechococcus leopoliensis</i>
	T 1444	<i>Anabaena flos-aquae</i>
	T 1547	<i>Lyngbya kuetzingii</i>
	T 1580	<i>Phormidium autumnale</i>
	T 1816	<i>Porphyrosiphon notarisii</i>
	T 1824	<i>Aulosira terrestre</i>
	T 2349	<i>Scytonema hofmanni</i>
	Rhodophycophyta	T 755
Chrysochycophyta	T 656	<i>Navicula minima</i>
Chlorophycophyta	A 489	<i>Chlorella saccharophila</i>
	C 202-7a	<i>Ankistrodesmus braunii</i>
	C 249.1	<i>Muriella aurantiaca</i>
	T 76	<i>Scenedesmus quadricauda</i>
	T 88	<i>Asterococcus superbus</i>
	T 1075	<i>Closterium acerosum</i>
	T 1648	<i>Selenastrum capricornutum</i>

A= Culture Collection of Algae, Charles University, Praha, Cecoslovacchia.

C= Culture Centre of Algae and Protozoa, Ambleside, U.K.

T= Culture Collection of Algae, Austin, University of Texas (USA).

Ciascuna alga era posta su di un piano oscillante (cfr. SHIHIRA & KRAUSS, 1969) in beute (100ml) contenenti circa 40 ml di BBM, tenute a $23\text{ }^\circ\text{C} \pm 1$ ed illuminate dal basso con lampade Philips TLD 36W/54 con intensità luminosa pari a $190\ \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ e con fotoperiodo 16h luce-8h buio. La crescita delle alghe era misurata con un colorimetro Bausch & Lomb Spectronic 20 mediante letture della assorbanza alla λ di 550 nm. Durante la tarda fase esponenziale (pari circa a 0,7 unità di assorbanza), 1 ml di ogni

coltura era inoculato in una capsula Petri contenente 30 ml di BBM solidificato con agar (1,5%). I fenilpropani da saggiare erano preliminarmente sciolti in etere etilico (40 μ l/mg). Da ogni soluzione così ottenuta volumi contenenti 0,3 mg del composto da saggiare, erano posti ad adsorbire su di un dischetto di carta da filtro sterile (Difco Bacto Disks, sterile blanks, Ø6mm). Dopo l'evaporazione totale del solvente, i dischi erano posti sterilmente nelle capsule Petri, precedentemente inoculate con una microalga. Nei blanks i dischi furono imbevuti solo con il solvente.

Le capsule erano incubate in una stanza termostata a 23 °C \pm 1 su di un piano di cristallo, illuminato dal basso con intensità luminosa e fotoperiodo simili a quelli usati per le colture algali di arricchimento.

Le capsule erano controllate giornalmente per seguire la crescita delle alghe. L'inibizione, quando presente, era registrata come diametro dell'area di non crescita algale, incluso il dischetto.

I fenilpropani, naturali e di sintesi saggiati sulle alghe, sono stati scelti in base o alla reperibilità commerciale o, se sintetizzati in laboratorio, in base alla loro elevata stabilità. Per la precisione i composti ottenuti commercialmente sono: allilbenzene, 2-idrossi-allilbenzene, 4-metossi-allilbenzene, 3-metossi-4-idrossi-propenilbenzene, acido 4-idrossi-3-metossi cinnamico (acido ferulico), 3,4-dimetossi-allilbenzene (isoeugenolo metiletere), 3,5-dimetossi-4-idrossi-allilbenzene, acido 2,4,5-trimetossi cinnamico, 2,4,5-trimetossi-E-propenilbenzene (α -asarone), 2,4,5-trimetossi-propenilbenzene (β -asarone).

Il 2-metossi-allilbenzene è stato preparato per metilazione con dimetilsolfato dal 2-idrossi-allilbenzene.

La demetilazione del 4-metossi-allilbenzene con boro tribromuro ha portato al 4-idrossi-allilbenzene.

Per ottenere il 2,5-diidrossi-allilbenzene e il 2,5-dimetossi-allilbenzene si è partiti dal 4-metossi-fenolo; quest'ultimo è stato trattato in mezzo alcalino con allil bromuro e si è ottenuto l'etere allilico corrispondente. L'isomerizzazione di Claisen di quest'ultimo ha dato il 2-idrossi-5-metossi-allilbenzene, che per demetilazione ha dato il 2,5-diidrossi-allilbenzene e per metilazione ha portato al 2,5-dimetossi-allilbenzene.

Con la stessa sequenza sintetica descritta per i due composti

disostituiti, partendo dal 2,3-dimetossi-fenolo si è ottenuto il 3,4-dimetossi-2-idrossi-allilbenzene, che per demetilazione in condizioni controllate con boro tribromuro ha dato il 2,4-diidrossi-3-metossi-allilbenzene.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Gli effetti dei fenilpropani metossi o idrossi sostituiti su 18 ceppi di microalghe sono riportati in Tab. 2.

Ogni sostanza attiva determinava sulle capsule Petri una zona anulare di completa inibizione della crescita, intorno alla quale si osservava una omogenea crescita algale. Il diametro di questi anelli di inibizione era compreso tra 10 e 25 mm.

L'unico fenilpropano non sostituito è risultato inattivo su tutte le alghe utilizzate.

Per quanto riguarda i fenilpropani metossi sostituiti la presenza di un solo gruppo metossilico sia in posizione 2 che 4 determinava una lieve inibizione sulla crescita algale del solo ceppo T 1648 *Selenastrum capricornutum*. Un'attività anti algale più pronunciata era causata dai fenilpropani dimetossi sostituiti, in particolare dal 3,4 dimetossi allilbenzene, che inibiva la crescita di tre ceppi di cianobatteri (T485, T1444, T1816) e di una Rhodophyta *Porphyridium aerugineum* (T755), e ancor più dai composti trisostituiti, in particolare dall' α -asarone, fortemente attivo su tredici alghe appartenenti a vari taxa.

L'incremento di tossicità osservato nei fenilpropani metossi sostituiti all'aumentare del numero dei sostituenti non è stato riscontrato sui composti idrossi sostituiti. Infatti, il più attivo è risultato il 2 idrossi allilbenzene, che inibiva la crescita di tredici ceppi algali. Di contro, il fenilpropano disostituito 2,5 diidrossi allilbenzene aveva effetti tossici meno pronunciati, ed era attivo solo su 8 ceppi algali. Va precisato comunque che la relazione tra numero di sostituenti e tossicità nei fenilpropani idrossi sostituiti è stata studiata soltanto parzialmente, poichè non è stato possibile sintetizzare composti triidrossi sostituiti stabili.

Per comprendere in maggior dettaglio l'influenza del tipo di sostituyente sulla tossicità della molecola sono stati saggiati,

anche fenilpropani misti, sul cui anello molecolare sono presenti sia gruppi ossidrilici che metossilici. Nel caso dei fenilpropanoidi bisostituiti, la compresenza dei due tipi di sostituenti accentua notevolmente la tossicità. Infatti l'isocugenolo risultava il più attivo fenilpropano bisostituito, inibendo la crescita di 15 ceppi algali. La situazione si presenta, invece più complessa nel caso dei fenilpropani trisostituiti. In questo caso, infatti, la tossicità dei composti misti è influenzata dal rapporto numerico tra i sostituenti. Infatti dal confronto tra 3,5 dimetossi, 4 idrossi allilbenzene e 2,4 diidrossi 3 metossi allilbenzene appare evidente che l'effetto antialgale aumenta considerevolmente se nella molecola due dei sostituenti sono costituiti da gruppi metossilici. Nessuno dei composti misti, comunque, risultava più tossico dei fenilpropani trimetossi sostituiti.

Nel complesso la tossicità dei fenilpropani appare più pronunciata verso i cianobatteri. Anche tra le Cyanochloronta, comunque, la sensibilità si presenta molto variabile, soprattutto tra le Nostocaceae. Infatti, appartengono a questa famiglia ceppi estremamente sensibili, come T1444 *Anabaena flos-aquae*, e ceppi molto resistenti, in particolare T 584 *Nostoc commune*.

Più omogenei risultano i dati ottenuti su ceppi appartenenti alle Oscillatoriaceae ed alle Scytonemataceae, pur permanendo una certa variabilità nella risposta alle sostanze saggiate. Interessante è anche la resistenza ai fenilpropani mono e bisostituiti dell'unica Chroococcacea presa in esame, T 625 *Synechococcus leopoliensis*, anche se saranno necessarie prove su ceppi appartenenti ad altri generi di questa stessa famiglia, per confermare se si tratti di una caratteristica tipica delle Chroococcaceae.

Per quanto riguarda Rhodophyceae e Chrysophyceae sono stati utilizzati soltanto un ceppo per classe. Le risposte ottenute devono quindi considerarsi puramente indicative. Ci limiteremo ad osservare che mentre su T 755 *Porphyridium aeruginum* numerosi fenilpropani variamente sostituiti hanno avuto effetti inibenti sulla crescita, la diatomea T 656 *Navicula minima* ha mostrato una particolare sensibilità verso un solo composto, l'isocugenolo.

Tra le alghe verdi saggiate, i ceppi più resistenti appartengono ai generi *Chlorella* (A 489) e *Muriella*, (T249-1) molto vicini

Tab. 2 - Effetti dei fenilpropani metossi e idrossi sostituiti su 18 ceppi di microalghe.

	T 485	T 584	T 625	T 1444	T 1547	T 1580	T 1816	T 1824	T 2349	T 755	T 656	A 489	C 202.7a	C 240.1	T 76	T 88	T 1075	T 1648
Allilbenzene	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2- Metossi-allilbenzene	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	X
2- Idrossi -allilbenzene	X	0	X	XX	X	0	X	X	X	X	0	X	XX	0	XXX	X	0	0
4-metossi -allilbenzene	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	X
4 -Idrossi- allilbenzene	X	X	0	X	X	0	0	0	X	X	0	X	X	0	XX	0	0	XX
2,5- diIdrossi- allilbenzene	X	0	0	0	X	0	X	0	0	XXX	X	0	X	0	0	X	XX	0
2,5- dimetossi- allilbenzene	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	X	XX
4-Idrossi-3metossicinnamico	X	0	0	XX	X	0	XX	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	XX
3- metossi- 4- idrossi-propenilbenzene	X	0	XXX	X	X	X	XXX	X	X	XX	XXX	0	0	X	X	X	XX	XX
3,4- dimetossi -allilbenzene	XX	0	0	X	0	0	XXX	0	0	XX	0	0	0	0	0	0	0	0
3,5- dimetossi -4 -idrossi- allilbenzene	XXX	0	XXX	XXX	XXX	0	XX	X	0	XXX	0	0	0	X	X	0	XX	0
2,4- diIdrossi -3-metossi allilbenzene	0	0	X	0	0	0	0	0	X	0	X	0	X	0	0	0	0	0
acido 2,4,5- trimetossicinnamico	0	0	X	X	0	0	X	0	0	X	X	0	0	0	0	0	0	XX
2,4,5 -trimetossi-E- propenilbenzene	0	0	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	X	XX	XXX	XX	XX	XXX	XXX	XXX
2,4,5 trimetossi -Z -propenilbenzene	XX	0	0	XXX	0	XX	XXX	0	0	X	0	0	0	0	X	X	XX	XXX

Diametro di inibizione della crescita algale: 0 = nessuna inibizione; X = 7-14mm; XX = 15-23mm; XXX > 23mm

da un punto di vista tassonomico, mentre la maggiore sensibilità a queste sostanze è stata evidenziata da *Selenastrum capricornutum* (T 1648). La elevata sensibilità di questo ceppo ad agenti chimici di natura diversa è nota. Per questo motivo è consigliato come organismo standard nelle analisi di tossicità che si effettuano per gli ecosistemi acquatici (WALSH & MERRIL, 1984).

In conclusione, in base a tali dati preliminari, va evidenziato che i fenilpropani naturali presentano una maggiore attività in relazione a quelli di sintesi ed, in particolare, i trisostituiti sono i più tossici in assoluto. Inoltre tali composti sembrano presentare un'attività specie-specifica: ciò potrebbe risultare utile nel regolare mediante composti naturali la crescita di microalghe di acqua dolce.

Studi più approfonditi sono comunque necessari, in particolare sui ceppi più sensibili, onde poter studiare una più stretta relazione struttura-attività.

RIASSUNTO

E' stata studiata l'attività inibente di 15 fenilpropani naturali e di sintesi su 18 ceppi di microalghe di H₂O dolce. Da un'analisi preliminare del rapporto struttura-attività di tali composti, si evince l'elevata tossicità dei fenilpropani naturali e trisostituiti e la loro attività specie-specifica relativamente alle microalghe saggiate.

BIBLIOGRAFIA

- ALIOTTA G., FUGGI A. and S. STRUMIA, 1992a. *Coat-imposed dormancy by coumarin in radish seeds: the influence of light*. Giorn. Bot. Ital. **126**(5): 631-637.
- ALIOTTA G., MOLINARO A., MONACO P., PINTO G. and L. PREVITERA, 1992b. *Three biologically active phenylpropanoid glucosides from Myriophyllum verticillatum*. Phytochemistry **31**(1): 109-111.
- ALIOTTA G., MONACO P., PINTO G., POLLIO A. and L. PREVITERA, 1991. *Potential allelochemicals from Pistia stratiotes L.* Journal of Chemical ecology, **17**(11): 2223-2234.

- BEWLEY J.D. and M. BLACK, 1985. *Seeds physiology of development and germination*. Plenum Press, New York.
- DAO T. H., 1987. *Sorption and mineralization of plant phenolic acids in soil*. In: *Allelochemicals: role in Agriculture and Forestry* (Ed. G.R. Waller) American Chemical Society, Washington D.C.: 358-370.
- DELLA GRECA M., MONACO P., PREVITERA L., ALIOTTA G., PINTO G. and A. POLLIO, 1989. *Allelochemical activity of phenylpropanes from Acorus gramineus*. *Phytochemistry* **28**(9): 2319-2321.
- EINHELLIG F. A., 1986. *Mechanisms and modes of action of Allelochemicals*. In: *The science of allelopathy* (Eds. Putnam A.R. e Tang C.S.) John Wiley & Sons. New York: 171-188.
- NICHOLS H. W., 1973. *Growth media-freshwater*. In: *Phycological methods* (Ed. Stein J.R.) Cambridge University press. London: 7-24.
- PINTO G., POLLIO A. and R. TADDEI, 1992. *List of algae from low pH environments cultivated at the University "Federico II" at Naples (Italy)*. *Bollettino Soc. Adriatica di Scienze*, vol **XXII**(1): 5-24.
- RICE E. L., 1984. *Chemical nature of allelopathic agents*. In: *Allelopathy* (Ed. Rice E.L) Academic Press, Orlando: 267-291.
- SHIHIRA I. and R. W. KRAUSS, 1965. *Chlorella. Physiology and taxonomy of forty-one isolates*. University of Maryland, Port City Press, Baltimore.
- Walsh G. E. and R. G. MERRIL, 1984. *Algal bioassay of industrial and energy process effluents*. In: *Algae as Ecological Indicators* (Ed. Shubert L.E.) Academic Press, London: 329-362.