

# Metaboliti secondari in piante di interesse agrario: caratterizzazione e attività biologica

Aldo Tava\*

CRA – SLC Centro di Ricerca per le Produzioni Foraggere e Lattiero-Casearie  
Viale Piacenza 29, 26900 Lodi

Data di presentazione: 20 marzo 2005

Data di accettazione: 2 settembre 2005

---

## Riassunto

Nell'ambito di indagini sul valore nutrizionale di specie foraggere, si è dato sempre più ampio spazio allo studio di componenti minori, definiti metaboliti secondari, che possono influenzare alcuni aspetti nutrizionali del foraggio. Infatti, accanto ai componenti principali, protidi, glucidi, lipidi, fibre, che ne determinano le caratteristiche nutrizionali, vi sono i metaboliti secondari che ne possono influenzare, in alcuni casi, l'utilizzo. Il nome metaboliti secondari, deriva dal fatto che queste sostanze sono presenti nella pianta in concentrazione molto inferiore rispetto agli altri costituenti principali, ma sono indispensabili alla pianta stessa perchè entrano a far parte dei suoi complessi processi fisiologici. Queste sostanze sono spesso dotate di particolari attività biologiche e ciò li rende importanti dal punto di vista nutrizionale ed interessanti anche per il loro possibile utilizzo in ambito farmacologico. Nel presente lavoro sono riportati i vari metaboliti indagati, nonché indicazioni sui metodi di analisi, la loro presenza nel materiale vegetale e la loro attività biologica.

*Parole chiave:* metaboliti secondari, sostanze volatili, saponine, inibitori di proteasi, fitoestrogeni, glucosidi cianogenici, alcaloidi.

## Summary

### SECONDARY METABOLITES IN GRASSES: CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY

In a series of studies dealing on the nutritional value of forage species, more attention was focussed on several compounds, named secondary metabolites, that are important in determining nutritional characteristics. Secondary metabolites are compounds detected in the green materials in low concentration compared to primary metabolites (proteins, sugars, lipids, fibers), but of fundamental importance for the plant physiology. They possess several biological activities and this contributes to their possible pharmacological use. In the present paper studies on secondary metabolites from herbaceous plants are reviewed. Indications of the chemical methods used for their analyses, their presence in the green material and their biological activity are also reported.

*Key-words:* secondary metabolites, volatiles, saponins, protease inhibitors, phytoestrogens, cyanogenic glucosides, alkaloids.

\* Autore corrispondente: Tel.: +39 0371 404740; Fax: +39 0371 31853. Indirizzo e-mail: aldo.tava@entecra.it

## 1. Introduzione

Nell'ambito di indagini sul valore nutrizionale di specie foraggere, si è dato sempre più ampio spazio allo studio di componenti minori, definiti metaboliti secondari, che possono influenzare alcuni aspetti nutrizionali del foraggio. Infatti, accanto ai componenti principali, protidi, glucidi, lipidi, fibre, che ne determinano le caratteristiche nutritive (contribuiscono all'accrescimento corporeo, alla produzione di latte, ecc.), vi sono i metaboliti secondari che ne possono influenzare, in alcuni casi, l'utilizzo (Makkar, 1993; Sen et al., 1998).

È noto da tempo che alcune di queste sostanze possono influenzare l'appetibilità, ad esempio per il loro sapore, possono essere responsabili di tossicità, quali gli alcaloidi ed i composti cianogenici, o possono invece conferire caratteristiche positive, come nel caso dei tannini.

Il nome metaboliti secondari deriva dal fatto che queste sostanze sono presenti nella pianta in concentrazione molto inferiore rispetto agli altri costituenti principali, ma sono indispensabili alla fisiologia della pianta stessa, in quanto entrano a far parte dei vari processi biologici (es. enzimi, coenzimi, ecc.). Alcuni di questi composti, costituiscono i meccanismi di difesa della pianta, ed in genere sono accumulati in particolari organuli o sintetizzati come precursori ed immediatamente attivati ad opera di enzimi specifici in risposta ad attacchi esterni. Altri, come accennato, sono elementi importanti alla fisiologia della pianta, come nel caso dei composti odorosi emessi dai fiori quali attrattori di insetti pronubi ai fini dell'impollinazione. Negli ultimi anni, inoltre, si è rivalutato il concetto di "fitoterapia animale" e si cerca quindi di riconsiderare a tale scopo queste sostanze, soprattutto quelle che possono in qualche modo apportare effetti positivi all'animale e, di conseguenza, ai prodotti da esso derivati destinati all'alimentazione umana (Tedesco, 2001; Greathhead, 2003). D'altro canto questi composti sono molto spesso dotati di particolari "attività biologiche" (battericida, fungicida, citotossica) che li rendono interessanti anche in ambito farmacologico.

Dal punto di vista chimico i metaboliti secondari sono praticamente rappresentati da quasi tutte le classi di composti organici: idro-

carburi, aldeidi, acidi, alcoli, ammine, ammidi, composti eterociclici, ecc., mentre dal punto di vista della loro struttura e/o della loro via biosintetica, le sostanze più rappresentative appartengono alla classe dei terpeni e terpenoidi, alcaloidi e sostanze fenoliche (Goodwin e Mercer, 1985).

Lo studio dei metaboliti secondari è abbastanza complesso data la loro relativa bassa concentrazione nel materiale vegetale ed a causa della complessità della matrice organica dalla quale vanno estratti e purificati. Queste sostanze inoltre sono presenti in miscela e questo comporta l'uso di tecniche particolari che permettono la loro separazione, oltre che la loro caratterizzazione e quantificazione.

L'estrazione solitamente viene effettuata con l'impiego di solventi a partire dal materiale vegetale disidratato a basse temperature (di solito non oltre i 50 °C) o liofilizzato. L'uso del materiale vegetale fresco è indispensabile per quei composti, come ad esempio le sostanze volatili, che possono essere persi o subire alterazioni durante i processi di disidratazione. Dall'estratto grezzo si procede poi alla purificazione dei vari metaboliti mediante cromatografia in fase normale (silica gel) o in fase inversa (RP 18), mentre per le valutazioni quali-quantitative si utilizzano tecniche gascromatografiche (GC) e di gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC/MS), o di cromatografia liquida HPLC (High Performance Liquid Chromatography). La caratterizzazione della struttura chimica dei vari metaboliti è di solito effettuata mediante tecniche chimico-fisiche e spettroscopiche quali  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR (Nuclear Magnetic Resonance), massa, Infra Red spectroscopy (IR) e UltraViolet spectroscopy (UV) a partire dai vari composti purificati. Le tecniche di analisi usate sono stabilite di volta in volta a seconda del tipo di sostanze da analizzare.

Di seguito sono riportati i vari metaboliti indagati nonché indicazioni sui metodi di analisi, sulla loro presenza nel materiale vegetale e sulla loro attività biologica.

## 2. Classe di composti esaminati

### 2.1 Sostanze volatili

Lo studio delle sostanze volatili, è stato inizialmente condotto su una varietà di *Festuca arun-*

*dinacea*, per indagare la natura chimica di questi composti (Tava et al., 1991), ed è poi proseguito considerando alcune cultivars di questa foraggera a diversi stadi vegetativi per meglio valutare la relazione fra appetibilità e composizione chimica (Tava et al., 1993a; 1995). Tale studio ha dimostrato che i componenti principali della frazione volatile di *F. arundinacea* sono alcoli, aldeidi ed esteri a sei atomi di carbonio, fra cui *cis*-3-esenolo, *trans*-2-esenale e *cis*-3-esenil acetato sono i più rappresentativi. Questi composti sono caratteristici e tipici dell'odore di erba appena falciata, e sono prodotti in tutti i tessuti vegetali per rottura enzimatica della catena dell'acido linolenico (Hatanaka et al., 1987). L'indagine non ha mostrato differenze qualitative nella composizione dei volatili nelle diverse cultivars esaminate, ma ha evidenziato una notevole variabilità del loro contenuto durante la stagione di crescita (*cis*-3-esenolo 2.0-7.7 µg/g, *trans*-2-esenale 0.4-1.5 µg/g e *cis*-3-esenil acetato 0.3-1.2 µg/g, calcolati sul peso del materiale fresco). Queste valutazioni, insieme alle varie determinazioni bromatologiche (proteine, fibre, zuccheri solubili), non hanno permesso di stabilire una chiara relazione fra appetibilità e composizione chimica.

Al contrario, lo studio dei volatili da fiori di *Medicago sativa* (Tava e Pecetti, 1997; Tava et al., 2000a), condotto per meglio comprendere i meccanismi che regolano l'impollinazione di questa foraggera, ha mostrato interessanti correlazioni fra il contenuto in sostanze volatili ed il colore dei fiori (Pecetti e Tava, 2000). Le principali sostanze identificate sono: i composti a sei atomi di carbonio tipici del materiale vegetale (*trans*-2-esenale 6.7-59.8 µg/g peso fresco, esenale 1.7-17.3 µg/g, 2-metil-4-pentenale 1.4-21.1 µg/g, *cis*-3-esenolo 1.3-7.5 µg/g), alcuni composti a otto atomi di carbonio (1-otten-3-olo 1.0-9.2 µg/g, 1,5-ottadien-3-olo 1.0-11.5 µg/g, ottan-3-one 0.7-5.1 µg/g) e alcuni monoterpene (*trans*-ocimene 0.1-3.7 µg/g, limonene 0.1-3.3µg/g). In un lavoro successivo si è potuto inoltre stabilire anche quale tra i vari composti identificati, sia maggiormente responsabile dell'attività verso insetti pronubi (Pecetti et al., 2002).

Lo studio delle sostanze volatili ha previsto anche l'indagine di specie spontanee di prati polifiti, come nel caso di *Anthoxanthum odoratum*, dove la presenza di curarina, sostanza tossica, conferisce all'erba e al fieno un particolare gra-

devole odore. Questa sostanza rappresenta il 95% dell'olio essenziale estratto da materiale fresco (circa 43 mg/g ss) ed il 45% dell'olio essenziale dal fieno (circa 22 mg/g ss) (Tava, 2001). Tali concentrazioni non sono da considerarsi pericolose per l'animale.

Infine, lo studio dell'olio essenziale di *Bellis perennis*, altra specie spontanea di prati polifiti, ha portato all'identificazione di nuovi composti poliacetilenici (Fig. 1) (Avato e Tava, 1995) che hanno dimostrato interessanti proprietà antimicotiche (Avato et al., 1997).

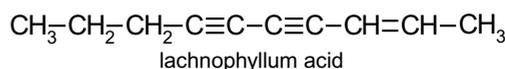
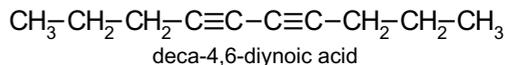
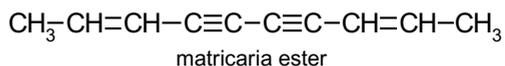
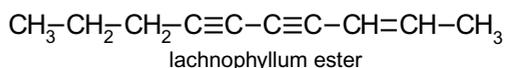
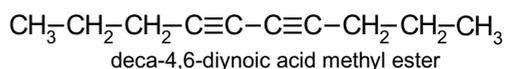


Figura 1. Composti poliacetilenici trovati in *Bellis perennis*.

Figure 1. Polyacetylenic compounds found in *Belli perennis*.

## 2.2 Saponine

Le saponine sono sostanze glicosidiche costituite da un triterpene pentaciclico o steroideo (aglicone) e da un numero variabile di unità monosaccaridiche, sia pentosi che esosi (Hostettmann e Marston, 1995). Le saponine sono state identificate in numerose specie vegetali, fra cui le *Leguminose*, dove sembra facciano parte dei vari meccanismi di difesa della pianta verso attacchi di erbivori e patogeni, soprattutto per le loro particolari attività biologiche. Nel genere *Medicago* l'unità agliconica è costituita da un triterpene pentaciclico (acido medicagenico, ederagenico, zanhico e soiasapogenoli) e da zuccheri (arabinosio, ramnosio, xilosio, glucosio, acido glucuronico, apiosio) fino ad un massimo di 7 unità (Oleszek, 1996) legati alla struttura triterpenica all'ossidrilico in posizione 3 e, quando presenti, al carbossile in posizione 28 (Fig.

2). È noto da tempo che le saponine sono associate a effetti antinutrizionali ed in *M. sativa* un notevole lavoro di breeder è stato svolto per abbassarne il contenuto (Rotili e Zannone, 1976). È stato infatti dimostrato che un alto contenuto di saponine nella dieta inibisce la crescita corporea in specie avicole e suini, e questo effetto può essere diminuito aggiungendo nella dieta colesterolo (Fenwick et al., 1991). È stato inoltre dimostrato che le saponine di erba medica sono responsabili della riduzione della fermentazione ruminale e della conseguente degradazione degli alimenti (Lu e Jorgensen, 1987), nonché di effetti di alterazione di assorbimento dei nutrienti a livello intestinale (Cheeke, 1996).

La valutazione del contenuto in saponine nel materiale vegetale risulta quindi di fondamentale importanza anche ai fini della selezione genetica. I metodi comunemente utilizzati a tale scopo sono i test biologici con *Trichoderma viride* (Zimmer et al., 1967) ed il blood test (Jurzysta, 1979) che sfruttano le proprietà antimicotiche ed emolitiche delle saponine di erba medica. Sebbene questi test siano relativamente veloci e permettano quindi una rapida valutazione di numerosi campioni, non danno però nessuna indicazione sulla natura e composizione dei costituenti la miscela di saponine.

Lo studio di queste sostanze ha previsto la messa a punto di tecniche analitiche GC e GC/MS (Tava et al., 1993b) e in elettroforesi ca-

pillare (Tava et al., 2000b) per la quantificazione in *M. sativa* anche ai fini del miglioramento genetico (Tava e Pecetti, 1998; Tava et al., 1999a) e la valutazione della loro attività emolitica e delle loro proprietà chimico-fisiche (Mella et al., 2002; Tava et al., 2003a) per meglio comprendere il loro effetto quali sostanze antinutrizionali.

Le saponine vengono estratte dal materiale vegetale con metanolo-acqua 30:70 e prepurificate su resina RP 18. Le singole saponine pure vengono ottenute dalla separazione della miscela mediante l'uso di colonne cromatografiche in fase normale (gel di silice) ed in fase inversa (RP 18) ed analizzate in spettrometria di massa per determinarne il peso molecolare e mediante tecniche  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR per determinarne la struttura chimica. Dalla miscela di saponine mediante idrolisi acida si ottengono le sapogenine che sono valutate con analisi GC e GC/MS per ottenere i dati quantitativi. A differenza dei vari test biologici, questo metodo permette la quantificazione dei vari agliconi che costituiscono la miscela di saponine.

Da queste indagini si è visto che il contenuto in saponine e sapogenine in erba medica varia in relazione a numerosi fattori intrinseci ed estrinseci. Le saponine sono contenute in maggior quantità nelle radici (3.0-3.7% DM) rispetto alle parti aeree della pianta (0.5-2.5% DM), dove il contenuto varia in modo significativo in funzione della varietà e dello stadio fisiologico.

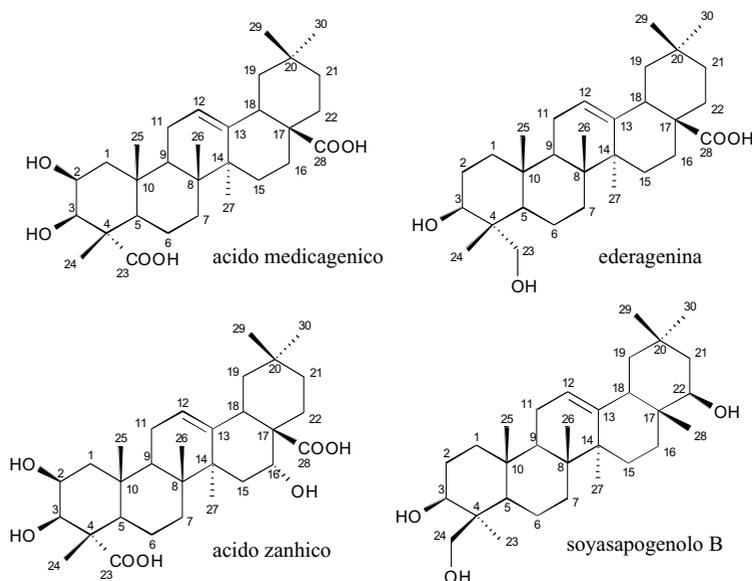


Figura 2. Principali sapogenine identificate in *M. sativa*. Nelle saponine gli zuccheri sono attaccati all'ossidrilico in C-3 e, quando presenti, al carbossile in C-28.

Figure 2. Most abundant sapogenins found in *M. sativa*. In saponins sugars are linked at C-3 position and, when present, at C-28.

Relativamente all'acido medicagenico, la saponina più abbondante riscontrata in *M. sativa*, si è visto che il suo contenuto varia da 0.2-1.0 mg/g DM in Sinesap, varietà selezionata per il basso tenore in queste sostanze, a 0.5-2.5 mg/g DM in varietà commerciali quali Boreal, Equipe, DuPuits, LaRocca, Lodi e Prosementi, fino ad arrivare a 0.5-3.5 mg/g DM in Romagnola (Tava et al., 1993b, 1999a, 1999b). È stato inoltre dimostrato che il contenuto in saponine varia durante la stagione di crescita mostrando un accumulo nel periodo estivo-autunnale. Le saponine dell'acido medicagenico aumentano dalla primavera, raggiungono la concentrazione massima nel periodo estivo e successivamente mostrano un lieve decremento, mentre le saponine dell'acido zanhico crescono con andamento pressoché uniforme fino a raggiungere il valore massimo in autunno (Tava et al., 1999a, 1999b).

È stata inoltre studiata la presenza di queste sostanze in altre specie del genere *Medicago*, quali *M. arabica* (Bialy et al., 2004a), *M. hybrida* (Bialy et al., 2004b) e *M. arborea* (Tava et al., 2004). Inoltre, in vista di un possibile utilizzo di queste sostanze per le loro proprietà biocide, le saponine sono state anche studiate quali agenti antimicrobici e di biocontrollo su microrganismi patogeni umani e vegetali e su insetti dannosi (Tava e Odoardi, 1996; Avato et al., 2003; Avato et al., 2004). Queste sostanze sono attualmente oggetto di studio per le loro proprietà citotossiche.

### 2.3 Inibitori di proteasi

Gli inibitori di proteasi, sono una classe di proteine a basso peso molecolare (6-9 KDa), presenti in piccola quantità nei semi e negli organi di riserva di piante appartenenti a diverse famiglie, fra cui le *Leguminose*. I semi di leguminose contengono infatti inibitori di proteasi a serina che possono essere distinti in due famiglie: quelli appartenenti al gruppo degli inibitori di proteasi tipo Kunitz, e quelli di tipo Bowman-Birk (Birk, 1994). Questi inibitori sembrano coinvolti nei meccanismi di difesa della pianta in quanto attivi anche sulle proteasi di insetti fitofagi (Ryan, 1990), sembra svolgano un ruolo di controllo sulle proteasi endogene durante le fasi metaboliche di stoccaggio delle proteine di riserva del seme e durante la fase di dormienza (Richardson, 1991). Infine, grazie al

loro alto contenuto in cisteina, pare che queste sostanze abbiano anche la funzione di proteine di riserva e vengano quindi degradate durante la germinazione del seme e le prime fasi di crescita della plantula (Papastoitis e Wilson, 1991). Fra le varie attività biologiche riscontrate, è inoltre noto che diversi inibitori di proteasi possiedono attività antitumorale (Kennedy, 1993; Clark et al., 1993).

Il lavoro è iniziato con una prima indagine volta alla valutazione dell'attività antitriptica in semi di alcune specie di *Medicago*, mostrando una notevole variabilità nel contenuto in queste sostanze (Odoardi et al., 1994). Lo studio si è quindi focalizzato sulla caratterizzazione di questa proteina da *M. scutellata*, in cui era stato riscontrato il valore più elevato di attività antitriptica. Si è quindi provveduto ad ottenere questa proteina nativa altamente purificata (MsTI) che è servita per la determinazione della sua sequenza amminoacidica e del suo peso molecolare. Ne è stata inoltre valutata l'attività su proteasi estratte da insetti fitofagi. Questa proteina è risultata essere un inibitore di proteasi a serina del tipo Bowman-Birk contenente sette ponti disolfuro e con un peso molecolare di 6925 Da (Ceciliani et al., 1997).

Lo sviluppo determinante a questo lavoro è stato affrontato con la valutazione dell'attività antitumorale di questa nuova proteina e con indagini più dettagliate sulla sua struttura tridimensionale nell'ambito di uno specifico programma di ricerca. Le ricerche *in vitro* su linee tumorali umane, hanno evidenziato l'effetto citotossico di questa proteina anche su linee cellulari che hanno sviluppato resistenza al cis-platino (Lanza et al., 2004).

Le indagini strutturali della proteina in soluzione a differenti pH mediante tecniche  $^1\text{H}$  NMR, hanno portato a definirne l'esatta sequenza amminoacidica (Catalano et al., 2002), nonché studiarne la sua struttura tridimensionale e le sue proprietà fisico-chimiche (Fig. 3). I risultati di questa indagine hanno evidenziato che: dalla sovrapposizione delle 15 strutture più probabili, nel primo dominio (Fig. 3c) è presente un legame idrogeno (evidenziato in verde) tra la Thr e la posizione P5, mentre nel secondo dominio (Fig. 3d) solo alcune delle 15 strutture mostrano questa possibilità. Ciò si traduce in una maggiore mobilità e flessibilità del secondo dominio rispetto al primo e quindi in una

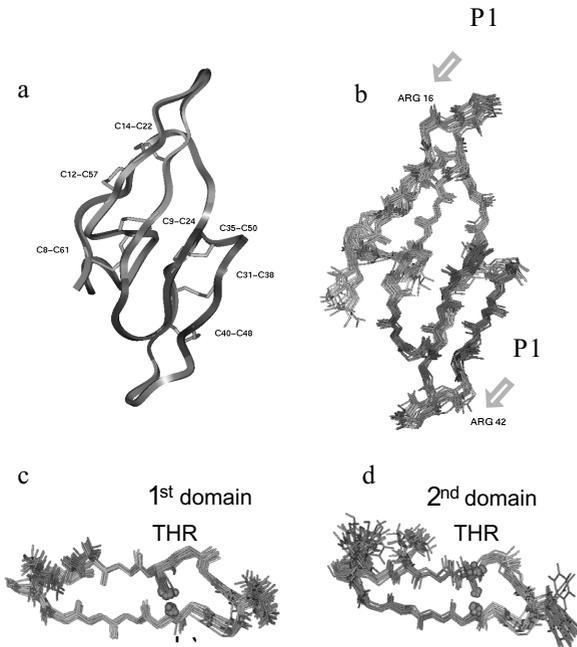


Figura 3. Struttura 3D dell'MsTI. a) ponti disolfuro. b) sovrapposizione delle 15 strutture finali nel range dei residui 6-61. I filamenti  $\beta$ -sheet sono indicati rispettivamente in giallo e in rosso. c) e d) mostrano le sovrapposizioni delle 15 strutture nei range dei residui che costituiscono i due domini.

Figure 3. MsTI 3D structure. a) Disulphide bridges b) Backbone superposition of the 15 final structures in the range of residues 6-61. The first three-stranded  $\beta$ -sheet is indicated in yellow while the second is shown in red. c) and d) superposition of the 15 structures in the range of residues that form the two domains.

minore affinità per la tripsina. Sulla base di queste evidenze sono state poi estrapolate importanti conclusioni in relazione alla sua attività anticellulare (Catalano et al., 2003; Tava et al., 2003b).

Successivamente, dalla proteina ad elevato grado di purezza è stato ottenuto il corrispondente anticorpo e dalla conoscenza dell'esatta sequenza amminoacidica, è stato possibile clonare il gene corrispondente (Balestrazzi et al., 2004) da potersi utilizzare in ulteriori programmi di ricerca.

#### 2.4 Fitoestrogeni

I fitoestrogeni, sono sostanze ad attività estrogenica e sono presenti in molte leguminose tra cui in trifoglio nelle specie *T. subterraneum* e *T. brachycalycinum* dove appartengono alla classe degli isoflavoni. Queste sostanze infatti se ingerite in quantità elevata provocano anomalie ri-

produttive soprattutto in ovini causando un decremento della fertilità e aborti spontanei. La loro attività estrogenica ha fatto sì che vengano considerate sostanze interessanti anche dal punto di vista farmacologico. La valutazione del contenuto in fitoestrogeni nel materiale vegetale è quindi di notevole importanza, non solo ai fini del loro utilizzo, ma anche in programmi di miglioramento genetico.

Con lo scopo di verificare la presenza di fitoestrogeni in una collezione di *Trifolium* di origine siciliana, sono stati valutati i principali isoflavoni: daidzeina, formononetina, genisteina e biochanina A (Fig. 4), mediante un metodo semi-quantitativo in TLC (Thin Layer Chromatography). Mediante l'uso di standards l'indagine è stata effettuata su diverse popolazioni di trifoglio a diversi stadi fenologici, per poter anche stabilire il picco di concentrazione di queste sostanze. Il metodo relativamente semplice prevede l'impiego di materiale fresco dove l'idrolisi dei precursori dei fitoestrogeni (glicosidi) viene fatta sfruttando le glicosidasi endogene macinando il materiale vegetale con della sabbia. Gli enzimi posti a contatto con i vari glicosidi liberano gli isoflavoni che, estratti con etanolo, vengono analizzati in TLC e rivelati mediante UV e/o con reazioni colorimetriche.

Da questa serie di analisi si è visto che il contenuto in daidzeina è risultato essere molto basso in tutti i campioni esaminati, mentre il contenuto degli altri tre composti è risultato essere variabile. Maggiori quantità di isoflavoni sono presenti alla fioritura, ed il contenuto in iso-

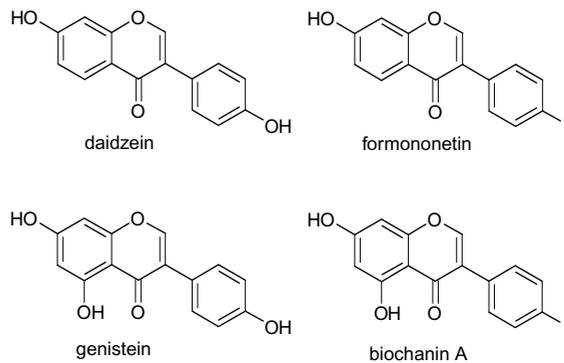


Figura 4. Struttura degli isoflavoni da *Trifolium subterraneum*.

Figure 4. Chemical structure of isoflavones from *Trifolium subterraneum*.

flavoni totali è risultato essere inferiore in *T. brachycalycinum* rispetto a *T. subterraneum* (0.25-1.62 mg/g ss e 0.28-2.35 mg/g ss, rispettivamente). In *T. subterraneum* inoltre, sono stati distinti due gruppi: piante che producono molta formononetina rispetto a genisteina e biochanina A e piante che producono molta genisteina e biochanina A rispetto alla formononetina (Spanu et al., 1993; Piano et al., 1993). Questo può fornire interessanti indicazioni sulla via biosintetica che porta alla formazione della formononetina, la sostanza a più alta attività estrogenica, e della genisteina insieme al suo metil derivato la biochanina A.

Infine, indagini quantitative mediante HPLC (dati non pubblicati) hanno mostrato un'ottima correlazione con i dati semi-quantitativi ottenuti dalle TLC, dimostrando che quest'ultimo metodo può essere usato soprattutto quando si ha a che fare con un grande numero di campioni, come richiedono i programmi di miglioramento genetico.

### 2.5 Glucosidi cianogenici

I glucosidi cianogenici sono sostanze che rilasciano acido cianidrico (HCN) per idrolisi enzimatica e sono presenti in diverse specie vegetali, fra cui anche in specie di trifoglio. In trifoglio bianco (*T. repens* L.) è accertata la presenza di linamarina e lotaustralina (Fig. 5) da cui per idrolisi si ottengono rispettivamente acetone e butan-2-one oltre a glucosio e HCN (Hughes e Conn, 1976). L'HCN è fortemente tossico se ingerito e crea notevoli problemi sul metabolismo, ed in alcuni casi la morte dell'animale.

L'indagine ha previsto innanzitutto la messa a punto di un metodo rapido, efficace e veloce per la valutazione del potenziale cianogenico nei diversi campioni vegetali. Il metodo sfruttava una reazione nota in letteratura per la valutazione dell'HCN e consisteva nel "catturare" l'HCN che si sviluppava da un quantitativo noto di foglie fresche poste in una provetta tappata, con cartine imbevute di una soluzione di sodio picrato che da giallo passava a rosso combinandosi con l'HCN. Le cartine venivano poi trattate con una quantità nota di acqua e l'intensità della soluzione rossa ottenuta veniva valutata allo spettrofotometro a 520 nm. I dati quantitativi venivano estrapolati da una curva di taratura ottenuta utilizzando quantità esattamente note di HCN fatto reagire allo stesso mo-

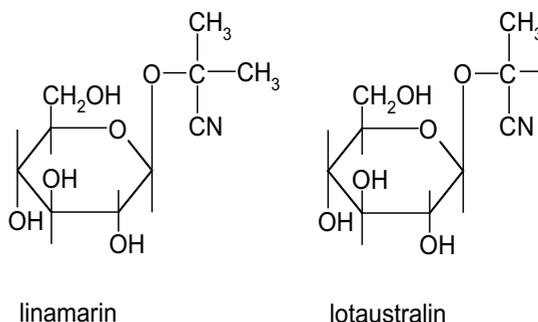


Figura 5. Glucosidi cianogenici di *Trifolium repens*.

Figure 5. Cyanogenic glucosides from *Trifolium repens*.

do dei campioni (Tava e Annicchiarico, 2000).

Il potenziale cianogenico di varie popolazioni naturali di trifoglio bianco raccolte in Italia è risultato essere molto variabile e compreso fra i 5 ed i 530 mg HCN/g ss (Annicchiarico e Tava, 2004). Questo metodo, rispetto ai metodi riportati in letteratura, permette di valutare con più esattezza e precisione il contenuto in glucosidi cianogenici nel materiale vegetale e di discriminare meglio fra i vari campioni esaminati.

### 2.6 Alcaloidi ergopeptidici e pirrolizzidini (loline)

Lo studio di queste sostanze è stato condotto su *F. arundinacea* in cui l'associazione con funghi endofiti del genere *Neotyphodium*, porta alla produzione di una vasta gamma di metaboliti (alcaloidi ergopeptidici e pirrolizzidini, peramine e lolitrem) che sono responsabili di fenomeni di tossicosi in animali. L'endofita vive interamente all'interno della pianta, ha abolito la fase riproduttiva e si propaga solo attraverso il seme infetto dell'ospite. La pianta fornisce protezione, nutrimento ed un facile mezzo di propagazione al fungo e questo conferisce alla pianta diversi vantaggi adattativi soprattutto in relazione alla resistenza a stress biotici e abiotici (Latch, 1997).

Questa indagine è stata effettuata in popolazioni di *F. arundinacea* di origine sarda, caratterizzate dalla presenza di endofiti a "conidi corti" ad a "conidi lunghi", ed ha previsto la determinazione del contenuto in alcaloidi pirrolizzidini (loline) ed alcaloidi ergopeptidici sia nelle cariossidi che nelle parti vegetative della pianta (Bertoli, 1999).

L'analisi delle loline è stata effettuata mediante GC col metodo dello standard interno. I

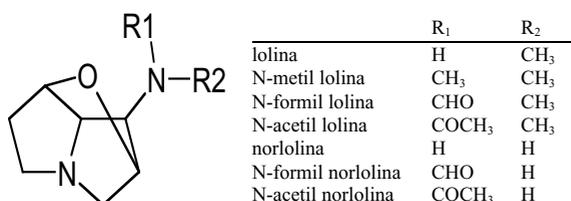


Figura 6. Struttura degli alcaloidi pirrolizidinici in *Festuca arundinacea*.

Figure 6. Chemical structure of pyrrolizidine alkaloids from *Festuca arundinacea*.

vari composti pirrolizidinici usati come standards (Fig. 6) sono stati sintetizzati dalla lolina preventivamente estratta e purificata da semi di piante infette. Dall'analisi quantitativa si è potuto valutare che il contenuto in loline totali in piante infettate da endofita a "conidi lunghi" varia da 1.4 a 4.3 mg g<sup>-1</sup> ss, mentre non sono presenti loline, o quantificate in tracce (< 10<sup>-3</sup> mg g<sup>-1</sup> ss), in piante infettate da endofita a "conidi corti". Non è stata trovata la presenza di loline nei campioni non infettati.

Le valutazioni del contenuto in ergopeptidi sono state invece effettuate mediante analisi HPLC utilizzando un detector a fluorescenza (Fig. 7). L'analisi quantitativa ha mostrato che

il contenuto in ergovalina in varietà controllo infettate da *N. coenophialum* è compreso fra 4.5 e 8.0 ppm e tali valori si confermano nelle accessioni sarde infettate dall'endofita a "conidi lunghi". Nelle accessioni infettate da *Neotyphodium* spp. a "conidi corti" tale valore risulta invece essere compreso tra 0.4 e 3.2 ppm. Non è stata registrata la presenza di ergopeptidi in campioni non infettati.

### 3. Conclusioni

Da quanto riportato, le indagini sul contenuto in metaboliti secondari in specie foraggiere hanno mostrato la diversa e complessa natura di queste sostanze e, come accennato, come la loro presenza nella pianta possa influenzarne in qualche modo le caratteristiche nutrizionali. Lo studio di queste sostanze si rende quindi necessario per una migliore conoscenza che porta ad un utilizzo appropriato delle materiale foraggero ai fini della nutrizione animale. D'altro canto le particolari attività biologiche di cui sono dotati rende questi composti interessanti anche per altri settori. Infatti, nella ricerca di nuove sostanze naturali ad attività biologica da impie-

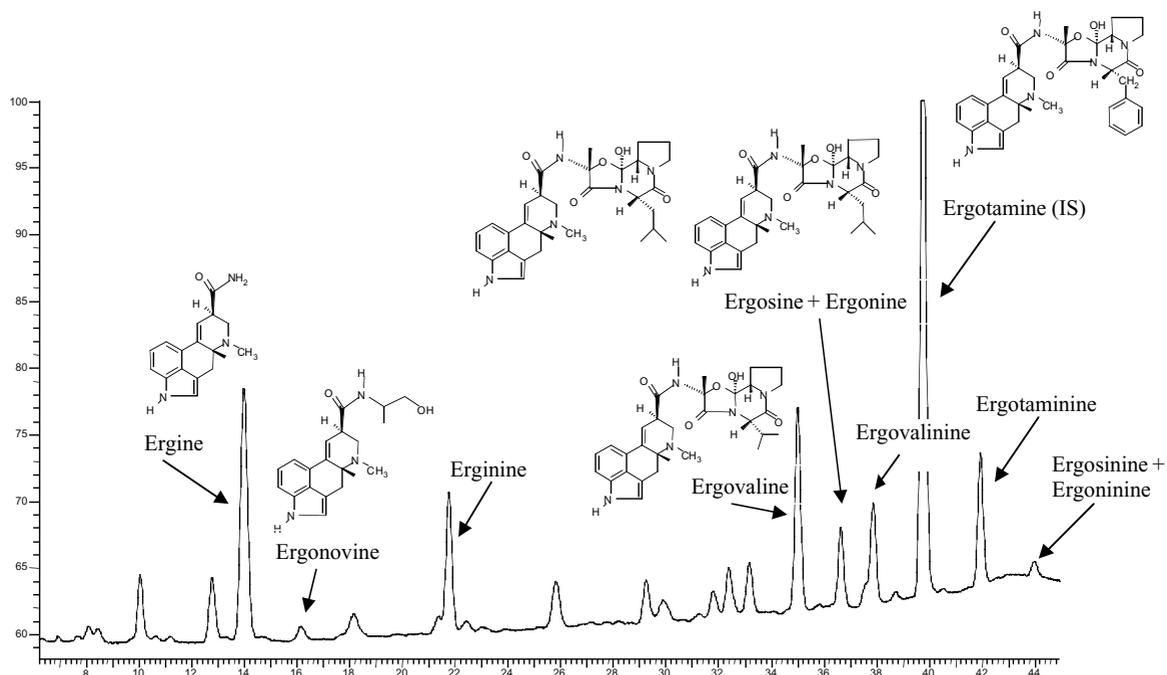


Figura 7. Analisi HPLC degli alcaloidi ergopeptidici da *Festuca arundinacea* infettata dal fungo endofita.

Figure 7. HPLC analyses of ergopeptine alkaloids from endohyte-infected tall fescue (*Festuca arundinacea*).

gare per usi diversi, in particolare come biocidi e/o farmaceutici, le specie foraggere costituiscono una ampia fonte di molecole utilizzabili. È proprio dallo studio dell'azione tossica o in varia misura nociva di queste sostanze che si sono acquisiti dati su una loro azione positiva, sia perché dotate di proprietà farmacologiche, sia per una benefica azione biocida o insetticida. E questo potrebbe portare anche all'uso non convenzionale di specie foraggere, con potenziali implicazioni economiche di indubbio interesse.

## Bibliografia

- Annicchiarico P., Tava A. 2004. Cyanogenic potential of Italian white clover natural populations. *J. Gen. & Breed.*, 58:17-22.
- Avato P., Tava A. 1995. Acetylenic and terpenoid constituents of *Bellis perennis*. *Phytochem.*, 40:141-147.
- Avato P., Vitali C., Mongelli P., Tava A. 1997. Antimicrobial activity of polyacetylenes from *Bellis perennis* and their synthetic derivatives. *Planta Medica*, 63:503-507.
- Avato P., Bucci R., Tava A., Rosato A., Bialy Z., Jurzysta M. 2003. Antimicrobial activity of saponins from *Medicago* sp. Proc. 3<sup>rd</sup> Int. Symp. on Natural Drugs. Napoli (I), 2-4 October 2003, 73.
- Avato P., Tava A., Bialy Z., Jurzysta M. 2004. Bioactive saponins from *Medicago* sp. Proc. Int. Conf. on Saponins "Phytochemistry & Application of Plant Saponins". Pulawy (PL), 8-10 September 2004, 53.
- Balestrazzi A., Confalonieri M., Odoardi M., Ressegotti V., Allegro G., Tava A., Carbonera D. 2004. A trypsin inhibitor cDNA from snail medic (*Medicago scutellata* L.): cloning and functional expression in response to wounding, herbivory, jasmonic and salicylic acid. *Plant Sci.*, 167:337-347.
- Bertoli F. 1999. L'associazione mutualistica pianta-funghi endofiti in germoplasma sardo di festuca arundinacea. Specificità e implicazioni nel miglioramento genetico. Tesi di Laurea in Agronomia, Facoltà di Agraria, Università di Milano.
- Bialy Z., Jurzysta M., Mella M., Tava A. 2004a. Triterpene saponins from aerial parts of *Medicago arabica* L. *J. Agric. Food Chem.*, 52:1095-1099.
- Bialy Z., Jurzysta M., Mella M., Tava A. 2004b. Triterpene saponins from the roots of *Medicago hybrida* L. Proc. International Conference on Saponins "Phytochemistry & Application of Plant Saponins". Pulawy (PL), 8-10 September 2004, 54.
- Birk Y. 1994. In: Kozłowska H., Formal J., Zdunczyk Z. (eds.): Bioactive Substances in Food of Plant Origin, 202.
- Catalano M., Ragona L., Molinari H., Tava A., Zetta L. 2002. 1MVZ: NMR 15 structures of Bowman-Birk type protease inhibitor MSTI. Protein Data Bank.
- Catalano M., Ragona L., Molinari H., Tava A., Zetta L. 2003. Anticarcinogenic Bowman Birk Inhibitor Isolated from Snail Medic Seeds (*Medicago scutellata*): Solution Structure and Analysis of Self-Association Behavior. *Biochem.*, 42:2836-2846.
- Ceciliani F., Tava A., Iori R., Mortorino M., Odoardi M., Ronchi S. 1997. A trypsin inhibitor from snail medic seeds active against pest proteases. *Phytochem.*, 44:393-398.
- Cheeke P.R. 1996. Biological effects of feed and forage saponins and their impact on animal production. In: Waller G.R., Yamasaki K. (eds.): Advances in Experimental Medicine and Biology. Vol. 405. Saponins used in food and Agriculture. Plenum Press, NY (USA), 377-385.
- Clark D.A., Day R., Seidah N., Moody T.W., Cuttitta F. 1993. Protease inhibitors suppresses in vitro growth of human small cell lung cancer. *Peptides*, 14:1021-1028.
- Fenwick G.R., Price K.R., Tsukamoto C., Okubo K. 1991. In: D'Mello F.J.P., Duffus C.M., Duffus J.H. (eds.): Toxicant substances in crop plants. Saponins. Royal Society of Chemistry, London, 285-327.
- Goodwin T.W., Mercer E.I. 1985. Introduction to plant biochemistry. Pergamon Press, New York (USA).
- Greathead H. 2003. Plant and plant extracts for improving animal productivity. *Proc. Nutr. Soc.* 62:279-290.
- Hatanaka A., Kajiwaru T., Sekiya J. 1987. Biosynthetic pathway for C6-aldehyde formation from linolenic acid in green leaves. *Chem. Phys. Lipids*, 44:341-361.
- Hostettmann K., Marston A. 1995. In: Chemistry and pharmacology of natural products. Saponins. Cambridge University Press.
- Huges M.A., Conn E.E. 1976. Cyanoglucoside biosynthesis in white clover (*Trifolium repens*). *Phytochem.*, 15:697-701.
- Jurzysta M. 1979. Haemolytic micromethod for rapid estimation of toxic alfalfa saponins. *Acta Agrobot.* 32:5-11.
- Kennedy A. R. 1993. Anticarcinogenic activity of protease inhibitors: overview. In: Troll W., Kennedy A.R. (eds.): Protease inhibitors as cancer chemopreventive agents, 9-64.
- Lanza A., Tava A., Catalano M., Ragona L., Gatti R., Singuaroli I., Robustelli della Cuna F.S., Robustelli della Cuna G. 2004. Effects of the *Medicago scutellata* trypsin inhibitor (MSTI) on cisplatin-induced cytotoxicity in human breast and cervical cancer cells. *Anticancer Res.*, 24:227-234.
- Latch G.C.M. 1997. An overview of *Neotyphodium* - grass interactions. In: Bacon C.W., Hill N.S. (eds.): *Neotyphodium* - Grass Interactions, Plenum Press, New York & London, 1-11.
- Lu C.D., Jorgensen N.A. 1987. Alfalfa saponins affect site and extent of nutrient digestion in ruminants. *Am. Inst. Nutr.* 117: 919-927.
- Makkar H.P.S. 1993. Antinutritional factors in foods for livestock. *Br. Soc. Anim. Prod.* 16:69-85.

- Mella M., Jurzysta M., Ricci M., Tava A. 2002. NMR investigations of saponins and sapogenins from *Medicago* species. Proc. XXXII Nation. Cong. on Magnetic Resonance, Pavia (I), 18-21 September 2002, P-3.
- Odoardi M., Cremona R., Cunico C., Pecetti L., Tava A., Valdicelli L. 1994. Characterization of trypsin inhibitors in seeds of different *Medicago* species. J. Gen. & Breed. 48:377-382.
- Oleszek W. 1996. Alfalfa saponins: structure, biological activity and chemotaxonomy. In: Advances in Experimental Medicine and Biology. Volume 405. Saponins Used in Food and Agriculture. G.R. Waller, K. Yamasaki ed., Plenum Press New York and London, 155-170.
- Papastoitis G., Wilson K.A. 1991. Initiation of the degradation of the soybean Kuntz and Bowman-Birk trypsin inhibitors by a cysteine protease. Plant Physiol., 96:1086-1092.
- Pecetti L., Tava A. 2000. Effect of flower color and sampling time on volatile emanation in alfalfa flowers. Crop Sci., 40:126-130.
- Pecetti L., Tava A., Felicioli A., Pinzauti M., Piano E. 2002. Effect of three volatile compounds from lucerne flowers on their attractiveness towards pollinators. Bullet. Insect., 55:21-27.
- Piano E., Tava A., Spanu F., Pecetti L. 1993. Variability of oestrogen content in large collections of subterranean clover and its implications in the selection work. Proc. XVII Int. Grass. Cong. Palmerston North (NZ), 8-21 February 1993, 1383-1384.
- Richardson M. 1991. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. In: Methods in plant biochemistry. Academic Press. New York, vol. 5, 259-305.
- Rotili P., Zannone L. 1976. Protein and saponin content in single and double crosses of lucerne (*Medicago sativa* L.). In: Protein quality from leguminous crops. Commission of the European Communities, EUR 5686,EN, Brussels, Belgium, 377-376.
- Ryan A.C. 1990. Protease inhibitors in plants: genes for improving defences against insect and pathogens, Annu. Rev. Phytopathol. 28:425-449.
- Sen S., Makkar H.P.S., Becker K. 1998. Alfalfa saponins and their implication in animal nutrition. J. Agric. Food Chem. 46:131-140.
- Spanu F., Tava A., Piano E., Pecetti, L. 1993. Variability of oestrogenic isoflavone content in a collection of subterranean clover from Sicily. J. Gen. & Breed. 47:27-34.
- Tava A., Berardo N., Odoardi M. 1991. Composition of essential oil of tall fescue. Phytochem. 30:1455-1458.
- Tava A., Berardo N., Odoardi, M. 1993a. Volatile constituents of tall fescue varieties in relation to palatability. Proc. XVII Int. Grass. Cong. Palmerston North (NZ), 8-21 February 1993, 1096-1097.
- Tava A., Berardo N., Odoardi M., Oleszek W., Jurzysta M. 1993b. Alfalfa saponins and sapogenins: isolation and quantification in two different cultivars. Phytochem. Anal., 4:269-274.
- Tava A., Berardo N., Cunico C., Romani M., Odoardi M. 1995. Cultivar differences and seasonal changes of primary metabolites and flavor constituents in tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) in relation to palatability. J. Agric. Food Chem., 43:98-101.
- Tava A., Odoardi M. 1996. Saponins from *Medicago* spp.: chemical characterization and biological activity against insects. In: Advances in Experimental Medicine and Biology. Volume 405. Saponins Used in Food and Agriculture. G.R. Waller, K. Yamasaki ed., Plenum Press New York and London, 97-109.
- Tava A., Pecetti L. 1997. Volatiles from *Medicago sativa* complex flowers. Phytochem., 45:1145-1148.
- Tava A., Pecetti L. 1998. Hemolytic activity and saponin content in lucerne (*Medicago sativa* complex) genotypes. J. Gen. & Breed., 52:33-37.
- Tava A., Odoardi M., Oleszek W. 1999a. Seasonal changes of saponin content in five alfalfa (*Medicago sativa*) cultivars. Agric. Mediterr., 129:111-116.
- Tava A., Corsi P., Annicchiarico P., Pecetti L. 1999b. Evolution over the growing season of sapogenin content in lucerne varieties. Proc. XIII Eucarpia *Medicago* spp. Group Meeting, Perugia, Italy, pp. 370-375.
- Tava A., Pecetti L., Povolo M., Contarini G. 2000a. Comparison between two systems of volatile sampling in flowers of alfalfa (*Medicago sativa* L.). Phytochem. Anal., 11:148-152.
- Tava A., Chiari M., Oleszek W. 2000b. Separation of alfalfa (*M. sativa* L.) saponins as their borate complexes by capillary electrophoresis. In: W. Oleszek, A. Marston (eds.): Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Chapter 5, 43-56.
- Tava A., Annicchiarico P. 2000. Spectrophotometer-aided evaluation of cyanogenic potential in white clover (*Trifolium repens* L.). Phytochem. Anal., 11:169-173.
- Tava A. 2001. Coumarin containing grass. Volatiles from sweet vernalgrass (*Anthoxanthum odoratum* L.). J. Ess. Oil Res., 13:367-370.
- Tava A., Mella M., Bialy Z., Jurzysta M. 2003a. Stability of saponins in alcoholic solutions: ester formation as artifacts. J. Agric. Food Chem., 51:1797-1800.
- Tava A., Catalano M., Ragona L., Lanza A., Robustelli della Cuna F.S., Molinari H., Zetta L. 2003b. <sup>1</sup>H NMR studies and anticarcinogenic properties of a trypsin inhibitor isolated from *Medicago scutellata* L. seeds. Proc. Int. Meeting Bioactive Chemistry from Nature, SCI Bioactive Science Group, Cambridge (UK), 31 March-2 April 2003, 21.
- Tava A., De Benedetto M.G., Mella M., Argentieri M.P., Avato P., Bialy Z., Jurzysta M. 2004. Chemical investigation of saponins from *Medicago arborea*. Proc. Int. Conf. on Saponins "Phytochemistry & Application of Plant Saponins". Pulawy (PL), 8-10 September 2004, 122.
- Tedesco D. 2001. The potentiality of herbs and plant extracts as feed additive in livestock production. Zootec Nutriz. Anim., 3-4: 111-133.
- Zimmer D.E., Pedersen M.W., McGuire C.F. 1967. A bioassay for alfalfa saponins using the fungus *Trichoderma viride* Pers. Crop Sci. 7:223-224.