



RAPPORTI ISTISAN 22|2

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Sostanze naturali e terapie integrate: spunti di riflessione dai seminari del gruppo di studio "Terapie Integrate e Sostanze Naturali"

A cura di

A. Geraci, A.M. Marella, F. Mondello, A. Stringaro



EPIDEMIOLOGIA
E SANITÀ PUBBLICA

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Sostanze naturali e terapie integrate:
spunti di riflessione dai seminari del gruppo di studio
“Terapie Integrate e Sostanze Naturali”**

A cura di

Andrea Geraci (a), Anna Maria Marella (b),
Francesca Mondello (b*, c), Annarita Stringaro (d)

(a) *Centro Nazionale Salute Globale, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Dipartimento Malattie Infettive, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(c) *Società Italiana per la Ricerca sugli Oli Essenziali, Roma*

(d) *Centro Nazionale per la Ricerca e la Valutazione Preclinica
e Clinica dei Farmaci, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

** in quiescenza dal 1° luglio 2020*

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Rapporti ISTISAN
22/2

Istituto Superiore di Sanità

Sostanze naturali e terapie integrate: spunti di riflessione dai seminari del gruppo di studio “Terapie Integrate e Sostanze Naturali”.

A cura di Andrea Geraci, Anna Maria Marella, Francesca Mondello, Annarita Stringaro
2022, iv, 120 p. Rapporti ISTISAN 22/2

I prodotti naturali hanno una lunga storia di utilizzo come farmaci, precursori di farmaci e/o coadiuvanti per il trattamento di varie condizioni patologiche e molti sono gli esempi di molecole derivate da sostanze naturali che hanno cambiato la storia della medicina, insieme ai relativi premi Nobel assegnati. L'interesse per le sostanze naturali è in progressiva crescita per ragioni culturali, scientifiche, economiche. Spesso alcuni prodotti di origine naturale, sotto forma commerciale di integratori alimentari, non sono né standardizzati, né studiati per tutte le loro possibili azioni, sia benefiche che avverse e si nota l'enorme richiesta da parte del consumatore di tali prodotti per uso “salutistico”. Questo volume vuole rappresentare uno strumento divulgativo delle ricerche recenti presentate in alcuni seminari organizzati dal Gruppo di Studio Terapie Integrate e Sostanze Naturali dell'Istituto Superiore di Sanità per stimolare una riflessione su luci e ombre nel campo delle terapie integrate che prevedono l'uso di sostanze naturali.

Parole chiave: Prodotti vegetali; Fitoterapia; Medicina integrativa

Istituto Superiore di Sanità

Natural substances and integrated therapies: food for thought from the seminars of the study group of Integrated Therapies and Natural Substances.

Edited by Andrea Geraci, Anna Maria Marella, Francesca Mondello, Annarita Stringaro
2022, iv, 120 p. Rapporti ISTISAN 22/2 (in Italian)

Natural products have a long history of use as drugs, drug precursors and/or adjuvants for the treatment of various pathological conditions and there are many examples of molecules derived from natural substances that have changed the history of medicine, along with the related Nobel Prize assigned. Interest in natural substances is growing progressively for cultural, scientific and economic reasons. Often some products of natural origin, in the commercial form of food supplements, are neither standardized nor studied for all their possible actions, both beneficial and adverse, and the enormous demand by the consumer of these products for “health-promoting use” is noted. This volume is intended to represent a popularizing tool of recent research presented in some seminars organized by the Study Group of Integrated Therapies and Natural Substances of the Istituto Superiore di Sanità (the National Institute of Health in Italy) to animate reflection on lights and shadows in the field of integrated therapies that involve the use of natural substances.

Key words: Vegetable products; Phytotherapy; Integrative medicine

Per informazioni su questo documento scrivere a: andrea.geraci@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it

Citare questo documento come segue:

Geraci A, Marella AM, Mondello F, Stringaro A (Ed.). *Sostanze naturali e terapie integrate: spunti di riflessione dai seminari del gruppo di studio “Terapie Integrate e Sostanze Naturali”*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2022. (Rapporti ISTISAN 22/2).

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Silvio Brusaferrò*

Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Sandra Salinetti, Manuela Zazzara*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.



INDICE

Prefazione	
<i>Giuseppe Arancia</i>	iii
Introduzione	
<i>Andrea Geraci, Anna Maria Marella, Francesca Mondello, Annarita Stringaro</i>	1
Dal principio attivo al metaboloma: evoluzione del fitocomplesso	
<i>Marcello Nicoletti</i>	3
HPTLC densitometrica per il controllo di qualità dei prodotti per la salute a base di piante	
<i>Francesca Romana Gallo, Giuseppina Multari, Giovanna Palazzino</i>	8
Meccanismi di resistenza dei tumori e impiego delle sostanze naturali nella terapia adiuvante	
<i>Maria Condello, Evelin Pellegrini, Giuseppe Arancia, Stefania Meschini</i>	22
Contributo alle conoscenze etnobotaniche in Italia	
<i>Paolo Maria Guarrera</i>	28
Attività biologiche del miele e peculiarità del miele di castagno etneo	
<i>Edmondo Lissandrello, Virginia Fuochi</i>	35
Funzione naturale, modificazioni strutturali e proprietà farmacologiche del climacostolo	
<i>Federico Buonanno, Claudio Ortenzi</i>	41
Medicamento avanzato a base di Neem e Iperico: dall'idea al mercato, dagli effetti ai meccanismi d'azione	
<i>Fiorella Carnevali, Stephen Andrew van der Esch</i>	47
Proprietà e limiti degli oli essenziali	
<i>Letizia Angiolella</i>	57
Oli essenziali fra autenticità e sicurezza	
<i>Stefania Benvenuti, Eleonora Truzzi, Lucia Marchetti, Davide Bertelli</i>	62
Oli essenziali: potenziali candidati per il trattamento antifungino?	
<i>Francesca Mondello, Maura Di Vito</i>	68
Pianificazione equilibrata delle diete vegetariane	
<i>Stefania Agrigento</i>	86

Verdura dimenticata da rivalutare: il caso del sedano selvatico (<i>Smyrniium olusatrum</i>) <i>Filippo Maggi, Eugenia Mazzara, Eleonora Spinozzi</i>	93
Aloe emodina: una molecola ad azione citotossica di potenziale interesse nella terapia oncologica <i>Giorgio Cinque, Marisa Colone, Maria Luisa Dupuis, Annarita Stringaro</i>	99
Azione antinfiammatoria e antalgica della curcumina orosolubile <i>Massimo Bonucci, Cristina Villivà Simona Dell'Arte, Alberto Siniscalchi</i>	111
Ildegarda di Bingen, pioniera della medicina integrata in epoca medievale <i>Andrea Geraci</i>	115

PREFAZIONE

Questo fascicolo dei *Rapporti ISTISAN*, realizzato su iniziativa dei cofondatori e coordinatori del gruppo di studio Terapie Integrate e Sostanze Naturali (TISNa) dell'Istituto Superiore di Sanità, contiene contributi scientifici di ricercatori interni ed esterni all'Istituto che hanno svolto attività di ricerca nel campo delle sostanze naturali e delle terapie integrate. Ciò allo scopo di offrire un aggiornamento dei risultati ottenuti nell'ambito di varie ricerche multidisciplinari svolte nel settore, porre le basi per iniziative future, favorire nuove collaborazioni e consolidare quelle già in atto.

Come è noto per terapie integrate si intende l'applicazione di protocolli terapeutici classici (trattamenti farmacologici e strumentali largamente riconosciuti) in combinazione con pratiche suggerite dalla tradizione internazionale quali agopuntura, tecniche di meditazione e, soprattutto, impiego di sostanze naturali di origine vegetale o animale.

Fino a pochi decenni fa le terapie integrate erano viste con molto scetticismo e diffidenza dalla medicina ufficiale. Ciò poteva essere giustificato dalla scarsità, o assoluta mancanza, di evidenze fornite dalla ricerca di base e clinica sull'effettiva efficacia farmacologica di tali prodotti e sui loro eventuali effetti indesiderati. Inoltre, quando la sostanza naturale impiegata era costituita da una complessa miscela di componenti a concentrazioni variabili, era del tutto impossibile studiarne i meccanismi d'azione a livello cellulare e molecolare nonché gli effetti sia positivi che negativi delle numerose interazioni tra tali componenti e le molecole del/i farmaco/i convenzionale/i. Quindi le sostanze naturali venivano impiegate sulla base di osservazioni empiriche e valutazioni soggettive.

Oggi la situazione è notevolmente cambiata. Grazie ai risultati ottenuti da ricerche condotte con rigoroso metodo scientifico in numerose istituzioni italiane ed estere, si può affermare che non esiste più una netta linea di demarcazione tra "farmaci" e "sostanze naturali" in quanto diverse strategie terapeutiche validate prevedono l'impiego combinato di entrambi i prodotti, ottenendo una favorevole sinergia dell'effetto farmacologico e/o una marcata riduzione degli effetti indesiderati. Del resto, era già noto che molti farmaci convenzionali di largo impiego e con elevata attività terapeutica contenevano principi attivi estratti o derivati da piante o funghi. Stiamo quindi assistendo a uno straordinario aumento incontrollato e incontrollabile dell'assunzione delle più disparate sostanze di origine naturale, generalmente definite "integratori alimentari", che spesso affiancano la terapia convenzionale. Tuttavia, raramente l'impiego di tali sostanze, da sole o in associazione, è suffragato da studi eseguiti allo scopo di valutarne tutte le possibili conseguenze sia benefiche che dannose sulla salute.

Già da alcuni anni, quindi, numerose istituzioni pubbliche, nazionali e internazionali, si sono attivate per seguire e controllare tale fenomeno, cercando di emanare linee guida e normative nonché di promuovere programmi di ricerca con relativa divulgazione dei risultati ottenuti.

Alcune di queste istituzioni hanno dimostrato anche fattivamente il loro reale interesse per i promettenti impieghi che la ricerca andava via via suggerendo mediante significativi finanziamenti di progetti specifici.

Il notevole incremento di persone che nell'ultimo decennio hanno fatto uso di prodotti a base di sostanze naturali e il progressivo aumento dell'interesse per le dimostrate proprietà terapeutiche di alcune di esse non sono ovviamente sfuggiti all'imprenditoria privata. Sono apparse sul mercato numerose nuove aziende produttrici di integratori a base di sostanze naturali, soprattutto vegetali, e molte case farmaceutiche hanno avviato nuovi settori produttivi di nutraceutica e fitoterapia investendo notevoli risorse economiche per finanziare ricerche sugli effetti terapeutici di svariati agenti naturali.

È doveroso riconoscere che tale massiccio intervento delle aziende private, pur se dettato principalmente da leciti e comprensibili interessi economici, ha in molti casi prodotto risultati scientificamente molto validi, anche mediante collaborazioni con vari enti pubblici di ricerca.

Ovviamente, mentre l'enorme quantità e diversità delle sostanze naturali impiegate, gli usi più disparati per cui vengono prodotte e acquistate, il crescente numero di informazioni scientifiche più o meno valide sui loro effetti sullo stato di benessere e sulla salute hanno contribuito alla individuazione di nuove e inaspettate strategie terapeutiche, d'altra parte hanno aumentato i complessi e interconnessi problemi comportamentali, economici e sanitari relativi al loro uso impegnando seriamente le strutture preposte all'emanazione di indispensabili linee guida, normative, regolamenti, controlli e valutazione dei dati scientifici.

Anche l'Istituto Superiore di Sanità che, in base all'art. 1 del proprio Statuto, è "organo tecnico-scientifico del Servizio Sanitario Nazionale e persegue la tutela della salute pubblica, in particolare attraverso lo svolgimento delle funzioni di ricerca, controllo, consulenza, regolazione e formazione", segue con particolare interesse questo importante fenomeno scientifico-sanitario espletando le suddette funzioni istituzionali. Vari gruppi di ricerca afferenti a diverse strutture stanno conducendo studi sugli effetti delle sostanze naturali. Alla luce di quanto detto finora, deve considerarsi particolarmente opportuna e lungimirante l'iniziativa di alcuni ricercatori dell'Istituto che circa tredici anni fa organizzarono un "gruppo di studio" allo scopo di riunire le esperienze multidisciplinari sui vari aspetti dell'uso di sostanze naturali, presenti nei vari dipartimenti, favorire lo scambio di informazioni tra ricercatori e stimolare proficue collaborazioni future. Nel 2008 si costituì quindi, il gruppo di studio denominato "Terapie Innovative e Sostanze Naturali" (TISNa). Dalle prime riunioni risultò presto evidente che il numero di ricercatori già impegnati in ricerche su tale tematica era più alto del previsto e che l'interesse per gli aspetti scientifici e normativi era notevole e in prevedibile crescita. Ciò stimolò i promotori dell'iniziativa a organizzare incontri, seminari e convegni che registrarono un crescente numero di partecipanti con la presenza di molti colleghi di altri enti di ricerca, promuovendo la nascita di varie collaborazioni. Più recentemente il nome del Gruppo, ormai consolidato, si è opportunamente modificato in "Terapie Integrate e Sostanze Naturali", mantenendo lo stesso acronimo TISNa.

Questo rapporto vuole offrire un aggiornamento sulle ricerche svolte sia da ricercatori dell'Istituto, sia da ricercatori esterni, anche nell'ambito di progetti in collaborazione, allo scopo di fornire elementi di riflessione su luci e ombre dell'importante tematica sanitaria relativa alle terapie integrate che prevedono l'uso di sostanze naturali.

Giuseppe Arancia
*già Dipartimento Tecnologia e Salute
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

INTRODUZIONE

Andrea Geraci (a), Anna Maria Marella (b), Francesca Mondello (b*, c), Annarita Stringaro (d)

(a) *Centro Nazionale Salute Globale, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Dipartimento Malattie Infettive, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(c) *Società Italiana per la Ricerca sugli Oli Essenziali, Roma*

(d) *Centro Nazionale per la Ricerca e la Valutazione Preclinica e Clinica dei Farmaci, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Fin dalla preistoria, gli esseri umani hanno utilizzato prodotti naturali, come piante, animali, microrganismi e organismi marini, per alleviare e curare le malattie. Secondo i reperti fossili, l'uso umano delle piante come medicinali può essere fatto risalire ad almeno 60.000 anni fa.

Ovviamente, l'uso di prodotti naturali come medicinali deve aver rappresentato una sfida enorme per i primi esseri umani, che furono in grado solo nel tempo di sviluppare le giuste conoscenze per lo sviluppo di farmaci.

Secondo il *National Center for Complementary and Integrative Health* (NCCIH) statunitense il termine "prodotti naturali" si riferisce a un gruppo ampio e diversificato di sostanze provenienti da varie fonti naturali come piante, batteri, funghi, insetti, aracnidi, organismi marini e animali di ordine superiore. Il termine comprende anche miscele complesse di questi prodotti e componenti isolati derivati da quest'ultimi e include inoltre vitamine, minerali e probiotici, ovvero microrganismi vivi, batteri nella maggior parte dei casi, che hanno lo scopo di avere benefici per la salute. I prodotti naturali hanno quindi una lunga storia di utilizzo come farmaci, precursori di farmaci e/o coadiuvanti per il trattamento del cancro, delle malattie infettive e di altre varie condizioni patologiche e sempre più vi è un ampio interesse da parte della comunità scientifica per lo studio delle loro attività biologiche, compresi gli studi in modelli preclinici per un'ampia varietà di potenziali indicazioni cliniche.

È da notare che i prodotti naturali sono utilizzati anche dalle medicine tradizionali, praticate in tutto il mondo da centinaia o addirittura migliaia di anni e risultano di grande importanza in quanto, nelle loro varie forme, sono ancora una preziosa fonte di conoscenza umana, come dichiarato World Health Organization (WHO), ai fini di collegamenti per altre pratiche sanitarie complementari e integrative. Attualmente molti prodotti naturali sono anche ampiamente commercializzati e prontamente disponibili per i consumatori come integratori alimentari, pur non esistendo prove evidenti della loro utilità e sicurezza.

Alla luce di quanto detto sopra, nel 2008 si costituì in Istituto il gruppo di studio "Terapie Integrate e Sostanze Naturali" (TISNa), promosso e coordinato dal Dott. Andrea Geraci (Centro Nazionale Salute Globale), dalla Dott.ssa Francesca Mondello (già Dipartimento di Malattie Infettive) e dalla Dott.ssa Annarita Stringaro (Centro Nazionale Ricerca e Valutazione Preclinica e Clinica dei Farmaci). Il gruppo di studio TISNa nacque con lo scopo primario di favorire lo scambio di informazioni relative alle ricerche in corso, tenendo conto delle diverse competenze presenti all'interno dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) e con il fine ultimo di stimolare la nascita di future collaborazioni e progetti di ricerca nell'ambito di nuovi approcci preventivi e terapeutici nel campo del "naturale" per migliorare la risposta al bisogno di salute, oltre che a soddisfare il bisogno di nuove conoscenze scientifiche.

Il gruppo di studio TISNa si è fatto quindi promotore, oltre che di congressi nazionali, anche di seminari mensili, che si sono svolti regolarmente in ISS, dal 2008 ad oggi (anche in modalità

* in quiescenza dal 1° luglio 2020

webinar online a causa della pandemia COVID-19) attraverso i quali sono stati analizzati numerosi aspetti inerenti alle sostanze naturali, coinvolgendo altri Istituti di ricerca sanitaria come gli IRCCS, il mondo accademico e industriale. Tutte le attività svolte dal gruppo TISNa hanno contribuito a mettere in luce come il prodotto naturale possa essere utile, salutare, terapeutico, ma possa anche rappresentare una causa di rischio per la salute umana. Abbiamo visto che, proprio per carenza di regolamentazione, molti prodotti naturali, a volte di dubbia formulazione, per la loro supposta azione di tipo “salutistico” e non terapeutico, vengono venduti senza chiare finalità d’uso e senza specifiche indicazioni e precauzioni d’impiego, e ciò può portare a rischi specie nei casi di automedicazione, di inappropriata prescrizione, di uso di altri farmaci o quando si assumono prodotti non sottoposti alle buone pratiche di preparazione. Attualmente le sostanze naturali vengono utilizzate con molteplici destinazioni di impiego (alimentare, farmaceutico, erboristico, cosmetico, come dispositivo medico e perfino come biocida) e quindi ricadono nell’ambito di normative e regolamentazioni diverse, che spesso si sovrappongono. Ciascun’area d’interesse pone una serie di problematiche inerenti alla qualità, alla sicurezza, all’efficacia.

Questo volume dei *Rapporti ISTISAN* raccoglie parte delle relazioni dei seminari organizzati dal TISNa con lo scopo di riportare gli argomenti di alcuni interventi presentati negli anni, nell’ambito dell’attività di divulgazione scientifica del gruppo. Nel volume i lettori potranno trovare delle informazioni validate da solide evidenze scientifiche, ottenute soprattutto dal “duro” lavoro svolto, con passione e sacrificio, dai Ricercatori intervenuti in qualità di oratori nei seminari TISNa e forse spunti per incentivare le proprie ricerche nel campo del “naturale” per nuove soluzioni preventive e/o terapeutiche.

DAL PRINCIPIO ATTIVO AL METABOLOMA: EVOLUZIONE DEL FITOCOMPLESSO

Marcello Nicoletti

già Dipartimento di Biologia Ambientale, Sapienza Università di Roma, Roma

Introduzione

Il panorama costituito dai prodotti di origine naturale per fini salutistici si è arricchito di molte nuove proposte. La nuova situazione, parzialmente in continua evoluzione, richiede, quindi, un ripensamento riguardanti alcuni concetti fondamentali.

Tra le questioni aperte, c'è quella della definizione del ruolo che le sostanze naturali, in particolare quelle vegetali, possono svolgere e l'ambito nel quale considerarle utili e adatte. Per questo il passaggio dal paradigma del "proiettile magico", il principio attivo, a quello di fitocomplesso richiede un'attenta valutazione.

Per affrontare direttamente l'argomento fitocomplesso si deve partire dalla domanda chiave: "Le piante curano?", che può tradursi nella più oggettiva: "Quale azione hanno le piante medicinali su di noi?". Prima di rispondere va ricordato che qualsiasi farmaco (generalmente una molecola di piccole dimensioni) per avere effetto deve necessariamente agire su alcuni centri, i recettori, che poi distribuiscono l'azione nell'organismo (1). Un'evidenza convincente è nel fatto che bastano quantità minime del farmaco per ottenere forti effetti sull'intero individuo.

Non va anche dimenticato che per sostanze naturali di origine vegetale si intendono i metaboliti generati dal metabolismo secondario presenti nelle piante. Generalmente si tratta di molecole a basso peso molecolare che possono avere un'elevata attività biologica. In virtù di questo, per lungo tempo le sostanze naturali, come materie prime in toto o singoli componenti isolati, sono stati farmaci o modelli per nuovi farmaci o fonte di molecole attive che oggi hanno assunto una propria nuova dimensione autonoma, grazie a una serie di prodotti apparsi sul mercato. Questi prodotti si articolano in categorie diverse a seconda del target di applicazione, quali nutraceutici, cosmeceutici, prebiotici, probiotici, che si affiancano a quelli classici, come gli integratori alimentari, i prodotti dietetici, i prodotti erboristici. In particolare, l'impiego delle sostanze naturali è andato affermandosi in prodotti destinati alla salute come gli integratori alimentari, che hanno visto ampliare il loro classico ruolo di complementi all'ordinaria alimentazione.

Ruolo delle sostanze naturali alla luce delle attuali conoscenze

Le sostanze naturali in generale svolgono un ruolo centrale nelle interazioni biotiche, maggiormente negli organismi con dimensioni e/o movimenti limitati, oppure con sede fissa, come le piante. Gli organismi si parlano chimicamente e i messaggi sono insiti nella struttura delle molecole messaggere, generalmente micromolecole, che assumono un ruolo nei differenti *habitat*, da quelli micro a quelli macro. Di questo linguaggio chimico impiegato si conosce solo un vocabolario molto ristretto e spesso limitato alle semplici parole ovvero a poche strutture

chimiche identificate e catalogate. Non è noto come la parola chimica si sia evoluta, come si accordi con le altre nelle frasi e nel discorso, e come tutte queste particolari parole riescano a creare un messaggio, complesso e significativo; tutto questo è un percorso ancora da esplorare, soprattutto per il ruolo che queste parole chimiche hanno nel sistema biochimico che chiamiamo metabolismo. Tuttavia, si è capito che il problema va affrontato da un punto di vista inverso rispetto a quanto fatto finora, ovvero si deve considerare la sostanza naturale non come chiave di volta isolata di un singolo fenomeno, ma come parte organica di un complesso sistema dinamico basato su un unico logos ordinativo. Così si può usare il particolare per spiegare il tutto. Per questo bisogna adottare un metodo deduttivo, come quello ben collaudato dai paleontologi, i quali da un dente fossile possono trarre informazioni su abitudini alimentari, dimensioni, comportamenti e *habitat* dell'animale estinto, oppure come quello adottato nei film polizieschi quando si delinea la tipologia del serial killer da pochi minimi indizi.

Per le sostanze naturali il metodo deduttivo è molto complesso perché si intersecano piani diversi, quali la funzione vitale della sostanza per l'organismo produttore, gli effetti sugli altri organismi che lo ospitano o che si trovano a interagire, l'influenza della situazione ambientale, e altri fattori imprevedibili. Grazie all'intelligenza artificiale questa mole di dati può essere accumulata, gestita e utilizzata, seguendo ad esempio i concetti della *Systems Biology*. Solo così si potranno tra breve interpretare i messaggi, utilizzando appieno il vocabolario immagazzinato, e magari scoprire sintassi e grammatica del meraviglioso linguaggio chimico dei viventi. Per il momento, però, date le nostre lacune, si dovrà continuare a trattare con rispetto e accortezza le piccole molecole naturali, essendo consapevoli del loro ruolo biotico centrale.

Andando a considerare la questione scientificamente si vede che negli ultimi anni diverse importanti ricerche hanno delucidato alcune interazioni "piccole molecole/recettori", accumulando una quantità enorme di dati relativi. I recettori sono in realtà proteine che possono essere interconnesse in *network* più o meno ampi. Più le attività sono fisiologiche di base, più il *network* è ampio e l'azione sul *network* viene così a interessare funzionalità complesse, anche se di base.

A questo proposito, nell'aprile del 2010 sulla prestigiosa rivista scientifica *Journal of the American Chemical Society* (JACS) è apparso un articolo chiave, scritto da ricercatori provenienti dalla Harvard University e dal Massachusetts Institute of Technology (2). Questo gruppo di matematici, quindi né farmacologi, o biochimici o clinici, ha affrontato la problematica riguardante il ruolo delle sostanze naturali contrapposte a quelle di sintesi. Il confronto tra gli estimatori entusiasti delle prime da una parte e i loro denigratori dall'altra, come portatori della razionalità e della provata efficacia, non ha, infatti, ancora portato ad alcuna certezza. Così gli autori hanno provato a mettere tutte le conoscenze scientifiche affidabili riguardanti farmaci approvati e prodotti naturali dentro un computer e chiedere a lui cosa ne "pensassee".

Dall'elaborazione dei dati è risultato che "i target proteici dei farmaci approvati, che non sono target anche delle sostanze naturali, esibiscono una distribuzione di connettività molto più vicina al caso dei geni di malattia umana, che non a quella dei target proteici delle sostanze naturali, che rimangono i più altamente connessi", ovvero i prodotti naturali presentano target recettoriali altamente più connessi in confronto alla connettività intermedia dei geni di malattia o delle piccole molecole farmacologiche di sintesi. In generale per connettività si intende la proprietà e il grado di interscambio tra strutture biologiche

Deduzione più logica per gli autori è che l'azione dei prodotti naturali su target di *network* proteina/proteina ad alta connettività si rivolge a *network* maggiormente essenziali per l'organismo. Gli autori concludono che i risultati computazionali non fanno altro che confermare la vecchia "intuizione" che le sostanze naturali funzionano come "meccanismi di difesa di base verso un invasore in assenza di specializzazione tissutale o di una risposta immune avanzata", perché "agendo su target proteici altamente connessi bloccano l'attività di proteine essenziali per

l'invasore stesso" (2). Per questo le azioni fisiologiche non altamente specifiche si traducono in tossiche sull'attività di funzioni essenziali per l'organismo estraneo e nutrizionali per le attività fisiologiche "di base" dell'ospite. D'altra parte, secondo gli autori, i loro risultati implicano che i prodotti naturali possono non avere abbastanza versatilità da essere utilizzabile contro malattie umane come ad esempio quelle ereditarie. Da ciò si può banalmente dedurre che per malattie gravi e su distretti specifici bisogna ricorrere al farmaco (che a volte può essere anche una sostanza naturale o un suo derivato variamente collegato) che possa andare alla radice del problema, mentre per disfunzioni fisiologiche come patologie lievi è più adatto l'approccio "a largo spettro" delle sostanze naturali.

Alla luce di questo articolo, può essere assegnato un ruolo diverso al farmaco come sostanza singola/piccola molecola, sia essa composto definito di sintesi o naturale, e al prodotto naturale in particolare di origine vegetale ove, in quanto miscela di sostanze, è il fitocomplesso che assume la funzione di principio attivo.

Queste considerazioni portano a dire che i prodotti naturali come quelli derivati dalle piante non hanno effetti curativi diretti, ma hanno "effetti volti a ottimizzare le funzioni dell'organismo nell'ambito dell'omeostasi", ovvero nel loro normale svolgimento (3).

Altri aspetti collaterali rimarrebbero comunque da definire più in dettaglio, quali il concetto "moderno" di cura e di farmaco, le origini genetiche (e quindi anche quelle fenotipiche) della malattia come ben riporta l'articolo del JACS (2), l'evoluzione della farmacologia nella sperimentazione su soggetti sani, ma anche il riflettere sul valore del modello animale, o sul concetto di "superorganismo" che ci riguarda così direttamente, in modo da poter tracciare la linea sottile che divide una molecola naturale a sé stante da quella nel contesto metabolico.

Nella continua contrapposizione tra le sostanze naturali come le piante medicinali e i medicinali allopatrici, i denigratori delle piante e dei loro derivati in molti casi arrivano a una negazione delle proprietà delle sostanze naturali vegetali, fino a una colpevolizzazione generalizzata delle piante medicinali considerate in generale dotate di potenziale tossicità. Per valutare questo aspetto, si torni a considerare i dati riportati sulle riviste scientifiche. Alcuni anni fa nel *Journal of Natural Products* (4), da sempre rivista leader nel campo delle sostanze naturali, è stato riportato uno studio sulla natura dei farmaci registrati nel periodo 1981-2014, dividendoli in base alla correlazione con la loro origine o derivazione dal mondo naturale. È stato evidenziato che il 28% dei farmaci derivano direttamente dalle sostanze naturali del metabolismo secondario, il 12% dal metabolismo primario, il 24% da prodotti di sintesi in qualche modo correlati ai prodotti naturali e solo il 33% deriva da un puro progetto sintetico. In alcuni campi il predominio appare schiacciante, come nel caso degli importanti farmaci antitumorali (62% di origine naturale) e antibatterici (71%). La *review* conferma quanto evidenziato in altri articoli che hanno valutato negli anni i prodotti naturali come sorgente di nuovi farmaci.

Una validazione scientifica, secondo la metodologia farmacologica e medicinale, delle sostanze naturali deve tener conto della loro particolare natura. Così parlando di sostanze naturali di origine vegetale, lo studio dei componenti molecolari di una droga vegetale, come di qualsiasi suo derivato, costituisce il cuore di ogni possibile sua validazione scientifica. Solo grazie all'analisi chimica dei componenti, che sia chiamata ricerca fitochimica, o determinazione farmacognostica, oppure semplicemente determinazione analitico vegetale, è stato possibile mettere in relazione l'utilizzazione medicinale o fisiologica di una droga vegetale con la sua reale attività, e proprio le specie appartenenti al Regno Vegetale si sono rivelate così prodighe nella produzione di sostanze naturali attive.

Recentemente, lo studio delle sostanze naturali ha registrato importanti cambiamenti, determinati da due fattori principali: l'ampliamento dei possibili impieghi e l'avanzamento della capacità degli strumenti di indagine. Nel primo caso, si è registrata "un'esondazione" di sostanze naturali principalmente dall'ambito terapeutico, per la presenza crescente di nuove proposte

commerciali caratterizzate da target salutistici e di benessere. I nuovi prodotti, collocati attualmente nel settore *food*, sottosettore integratori alimentari, hanno occupato lo spazio creatosi tra il farmaco allopatico e l'alimento, nonché hanno costretto ad aprire nuove strade per una validazione scientifica documentata. Anche in questo caso, la qualificazione chimica ha avuto un ruolo centrale nella loro validazione.

Negli ultimi anni, questa situazione ha determinato una evoluzione nell'individuazione della ragione molecolare dell'attività dei prodotti di origine vegetale, comportando una profonda revisione di alcune interpretazioni dell'interazione tra le molecole e l'organo bersaglio.

Chimica come strumento di comprensione dei fenomeni biologici

Dai tempi di Paracelso, ma soprattutto grazie agli studi e agli scritti di Boyle, la chimica è considerata la chiave per la comprensione dei processi biologici. Alla variabilità e alla indeterminatezza della materia vivente, viene opposta la certezza della formula chimica, autentico baluardo di una conoscenza chiaramente affidabile e autoreferenziata. Infatti, nel primo momento la chimica organica ha dato la possibilità di affidare un nome e una struttura da memorizzare alle sostanze naturali isolate, in modo da affidarle alla memoria di un foglio, portando a un campionario/catalogo di mezzo milione di molecole organiche strutturalmente determinate e universalmente riconosciute. Tuttavia, proprio le molecole organiche naturali sono una miniera di variabilità conformazionale e ibridazioni.

I progressi congiunti della fitochimica e della moderna farmacognosia hanno portato a una definizione di farmaco, ancorché di origine naturale, basata sulla presenza di determinate molecole isolate dalla materia organica, considerate come responsabili dell'impiego terapeutico.

In pratica, tutti gli sforzi sono stati per lungo tempo concentrati nella definizione del *quid* chimico da mettere in correlazione con l'attività biologica, dando al *quid* il nome di principio attivo, in pieno accordo con la fase di "molecolarizzazione" del concetto di farmaco, dominante nella chimica farmaceutica e nella terapia farmacologica. In questa accezione, il farmaco è considerato come sostanza unica, chimicamente definita e della quale siano state completamente determinate dose e attività, compresi gli eventuali effetti collaterali immediati e nel tempo. Come conseguenza, per lungo tempo le piante sono state considerate semplicemente fonte di molecole da passare al chimico farmaceutico, affinché quest'ultimo potesse utilizzarle come modelli, o *template*, per nuovi farmaci a elevata attività, da convertire in prodotti commerciali. Il passaggio dalla molecola vegetale a quella farmaceutica, generalmente, porta alla sintesi di strutture la cui attività è stata in modo artefatto amplificata oltre al limite dettato dall'evoluzione, finanche a sorpassare i limiti della tossicità.

Questo approccio rimane dominante a livello normativo, nonostante l'insorgere di diversi problemi ed evidenti esagerazioni di semplificazione, come nel caso delle piante contenenti alcaloidi che sono considerate nel loro insieme potenzialmente tossiche e quindi di specifica competenza del medico e del farmacista, ovvero bandite d'ufficio dall'impiego erboristico, anche in caso di ampie evidenze di un impiego consolidato.

Tuttavia, come in molti altri casi non necessariamente scientifici, questa semplificazione è stata da tempo messa in discussione, a favore di una progressiva accettazione della complessità. Si è compreso che la quantità e varietà della composizione chimica di un materiale vegetale non può essere limitata a un singolo costituente e si riflette nella multiattività delle droghe vegetali, declinata in vari modi, quali sinergismo, additività, ecc. Oltre al concetto di principio attivo, quale unica sostanza responsabile delle proprietà biologiche, si è via via affermato il concetto di

fitocomplesso, inteso come l'insieme dei costituenti che si ritengono in qualche modo implicati in una data attività.

Per conseguenza, nell'impiego, il singolo composto naturale è stato sostituito dal materiale vegetale, come tale o in forma di estratto, più o meno modificato o arricchito nei componenti considerati come i principi attivi. In pratica, l'attività viene ricondotta non più a un unico principio attivo ma a più principi attivi riuniti nel fitocomplesso. Questo nuovo approccio è coinciso con il passaggio dei prodotti della tradizione erboristica ai nuovi prodotti che comprendono integratori alimentari, nutraceutici, *botanical* e così via.

Come in tutti gli studi scientifici, però, la realtà percepita e acquisita dipende dalle capacità di ispezione per trovare una realtà oggettiva, al di là dei nostri sensi che, come si sa, ci ingannano. Con l'acquisizione di nuove strumentazioni nelle tecniche di indagine, dalla cromatografia fino alla *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR), è stato possibile studiare il fitocomplesso come quadro metabolico, pur mantenendo intatte le potenzialità individuali dei singoli componenti.

Conclusioni

Da quanto detto sopra ne consegue che il ruolo dovuto ai singoli costituenti viene inserito nell'insieme della produzione metabolica, proprio come funziona in natura. Si tende quindi sempre più a parlare di metaboloma, o semplicemente di -oma adattandolo al nome della pianta, come conseguenza diretta delle Scienze Omiche. Così si comincia a parlare di cannabidioma, oppure di aglioma. In pratica, guardando finalmente dentro l'insieme della produzione metabolica, si è trovato un mondo molto più complesso di quanto si era immaginato, con conseguente rivisitazione del concetto di principio attivo. Il nuovo approccio richiede necessariamente di cambiare il punto di osservazione, ovvero considerare come soggetto di riferimento la pianta e quanto i suoi metaboliti siano stati prodotti per la sua utilità e necessità, evitando di considerare il mondo vegetale come fabbrica di farmaci o cibi a noi destinati. Certamente, il concetto di fitocomplesso diventa per conseguenza un organico complesso di metaboliti secondari, organizzati per funzionare da mediatori chimici. Si tratta quindi di considerare un nuovo paradigma farmacologico e medico, che cerca faticosamente di occupare il posto che merita, ma come tutti i paradigmi nascenti potrà affermarsi solo sulla base delle evidenze scientifiche e quindi ci sarà ancora molto da lavorare in questa direzione (4).

Bibliografia

1. Nicoletti M. Una storia commentata del farmaco. *Phyto J* 2020;5:8-14.
2. Dančik V, Petri Seiler K, Young DW, Schreiber SL, Clemons PA. Distinct biological network properties between the targets of natural products and disease genes. *J Am Chem Soc* 2010;132:9259-61.
3. Italia. Ministero della Salute. Decreto dirigenziale 26 luglio 2019. Allegato 1 del DM 10 agosto 2018, concernente la "Disciplina dell'impiego negli integratori alimentari di sostanze e preparati vegetali". *Gazzetta Ufficiale Serie Generale* 224 del 26/9/2018. Disponibile all'indirizzo: <https://www.trovanorme.salute.gov.it/norme/renderNormsanPdf?anno=2019&codLeg=70165&parte=2&serie;ultima consultazione 24/02/2021>.
4. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J N Prod* 2016;79:629-61.

HPTLC DENSITOMETRICA PER IL CONTROLLO DI QUALITÀ DEI PRODOTTI PER LA SALUTE A BASE DI PIANTE

Francesca Romana Gallo, Giuseppina Multari, Giovanna Palazzino
Centro Nazionale per la Ricerca e la Valutazione Preclinica e Clinica dei Farmaci,
Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Le piante e i loro derivati possono costituire sostanze attive presenti in molti prodotti naturali utilizzati per la salute umana, dai medicinali agli integratori alimentari, ai nutraceutici fino ai dispositivi medici. Ognuna di queste categorie di prodotti è regolamentata da una legislazione propria. Ad esempio un integratore, dal punto di vista normativo, non è un farmaco, ma un alimento e quindi non può contenere sostanze farmacologicamente attive. A tal proposito un richiamo è doveroso alla definizione che ne fanno le due normative italiane che regolano queste due categorie di prodotti.

La legislazione sui prodotti medicinali è regolata dal DL.vo 219 del 2006, che definisce medicinale “ogni sostanza o associazione di sostanze”, anche di origine vegetale, “presentata come avente proprietà curative o profilattiche delle malattie umane da somministrare all’uomo allo scopo di ripristinare, correggere o modificare funzioni fisiologiche” (che possono supporre alterate), “esercitando un’azione farmacologica, immunologica o metabolica” (1).

La definizione di integratore alimentare data nel DL.vo 169 del 2004 recita così: “sono prodotti alimentari destinati a integrare la comune dieta e che costituiscono una fonte concentrata di sostanze nutritive, quali le vitamine e i minerali, o di altre sostanze aventi un effetto nutritivo o fisiologico, in particolare, ma non in via esclusiva, aminoacidi, acidi grassi essenziali, fibre ed estratti di origine vegetale, sia monocomposti che pluricomposti, in forme predosate” (2).

Nell’ambito dei prodotti integratori alimentari sono però escluse le piante con una chiara attività farmacologica e sono ammesse solo le piante riportate nell’Allegato 1 del Decreto del Ministero della Salute DM 10 agosto 2018 (3) sulla “disciplina dell’impiego negli integratori alimentari di sostanze e preparati vegetali”, aggiornato con Decreto dirigenziale del 9 gennaio 2019 e poi con Decreto del 26 luglio 2019.

Nell’Allegato aggiornato al 2019 sono state aggiunte nell’ultima colonna le “Linee guida ministeriali di riferimento per gli effetti fisiologici” che non fanno parte integrante del predetto Decreto del 2018, precisando nella premessa che tali effetti, impiegabili in attesa della definizione dei *claims* sui *botanical*, sono volti a ottimizzare le funzioni dell’organismo nell’ambito dell’omeostasi secondo il modello definito dal Consiglio d’Europa (47).

Andando a considerare i dati sulle vendite dei prodotti per la salute degli ultimi tempi, si è potuto notare che nel periodo luglio 2019-giugno 2020 è il canale delle farmacie e parafarmacie online, in particolare, ad aver avuto un incremento di fatturato del 53,6% rispetto allo stesso periodo nell’anno precedente. Soprattutto le vendite di integratori hanno registrato un incremento del 34% nel primo semestre 2020 e addirittura dell’80,3% nel solo mese di giugno 2020 rispetto allo stesso periodo del 2019, in controtendenza rispetto a quanto rilevato nel canale offline (4).

Ogni integratore, venduto online o in un negozio fisico, secondo il DL.vo 169 del 2004 (2) deve avere un’etichetta che contenga: il nome del prodotto; l’elenco degli ingredienti; il termine

minimo di conservazione; le istruzioni per l'uso (compresa la dose raccomandata giornaliera); una dichiarazione nutrizionale (ovvero l'indicazione dei tenori per dose massima giornaliera dei vari ingredienti); le avvertenze che gli integratori non vanno intesi come sostituti di una dieta variata e che i prodotti devono essere tenuti fuori dalla portata dei bambini; l'effetto nutritivo o fisiologico attribuito al prodotto sulla base dei suoi costituenti in modo idoneo a orientare correttamente le scelte dei consumatori.

Il Regolamento 1924/2006 stabilisce le regole per l'utilizzo delle indicazioni nutrizionali e di salute tramite i *claims*, cioè le frasi indicanti le proprietà salutistiche che possono essere proposte sulle etichette degli alimenti oppure nella pubblicità (5).

Tuttavia, in rete, da siti di vendite online, si possono acquistare centinaia di preparati che dichiarano disparate proprietà benefiche, a volte non veritiere. Inoltre, i prodotti acquistati su Internet, che spesso costituisce una vetrina per prodotti italiani ed esteri, non sempre riportano le descrizioni in italiano. Alcuni di questi siti, ponendosi come semplice "vetrina" per il produttore, non ritengono che spetti a loro la responsabilità, di rendere pubbliche le indicazioni obbligatorie per legge, spetti a loro. Acquistando integratori o farmaci in rete da siti non attendibili, quindi, si può incorrere in molti rischi, *in primis* quello di acquistare prodotti falsificati, che invece delle sostanze dichiarate contengono sostanze parenti o vietate o adulteranti. Per gli integratori in particolare si rischia di trovare preparati con sostanze farmacologicamente attive o con sostanze, ad esempio quelle vegetali, che in Italia non sono ammesse e con le relative potenziali serie ripercussioni sulla salute. Non dimentichiamo poi che, se alcuni siti hanno la grave pecca di vendere integratori privi di descrizioni appropriate, molti altri descrivono il loro prodotto con proprietà e caratteristiche che non gli appartengono.

Per evitare problemi è opportuno rivolgersi ai canali classici: la farmacia, la parafarmacia, la grande distribuzione, oppure siti di vendita online italiani che siano riconosciuti attendibili. Per i farmaci acquistati online un sito autorizzato alla vendita deve avere come requisito sia la presenza di un negozio fisico nel territorio italiano sia il "bollino" di garanzia cioè un bollino con un logo apposito che rimanda tramite link all'elenco pubblicato sul sito del Ministero della Salute di siti riconosciuti e validati per questa attività. Questo logo permette di procurarsi online in modo sicuro un farmaco, ma anche altri prodotti normalmente acquistabili in farmacia (6).

Sistema di allerta

Per gli integratori alimentari non conformi alla Direttiva 2002/46/CE (7) o che danno "problemi" a livello europeo, ci si deve riferire al Sistema di allerta rapido per alimenti e mangimi (*Rapid Alert System for Food and Feed*, RASFF), un network costituito tra le autorità sanitarie dei Paesi membri dell'Unione Europea, l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (European Food Safety Authority, EFSA) e la Commissione Europea. Il RASFF permette agli Stati membri e alle istituzioni europee di essere costantemente informati sulla presenza di rischi alimentari sul territorio, e conseguentemente prendere provvedimenti in situazioni di emergenza. Le segnalazioni condivise attraverso il RASFF vengono rese pubbliche e consultabili attraverso un sito web dedicato, il RASFF portal (8).

Nell'anno 2019 sono pervenute 4000 notifiche di cui 3506 hanno riguardato l'alimentazione umana, 322 l'alimentazione animale e 172 i materiali e oggetti destinati a venire a contatto con gli alimenti. Le segnalazioni che hanno coinvolto i prodotti dietetici e gli integratori alimentari sono state 339. Le principali irregolarità hanno riguardato le sostanze non autorizzate comprese nella voce "composizione" (in particolare sostanze ad attività farmacologica), seguite da *novel food* non autorizzati. In alcuni prodotti sono state riscontrate più irregolarità. Come si può vedere

in un documento pubblicato dal Ministero della Salute (9), le segnalazioni hanno riguardato in particolare 57 prodotti di origine USA, 45 Cina (45) e 36 Regno Unito.

In Italia nel sito “Epicentro” dell’Istituto Superiore di Sanità, dedicato all’epidemiologia per la sanità pubblica, è presente la pagina sulla Fitosorveglianza da cui si può accedere al portale VigiErbe (www.vigierbe.it) dove segnalare, online, le sospette reazioni avverse che si verificano dopo l’assunzione di prodotti di origine naturale, di integratori alimentari a base vegetale, di prodotti erboristici e altri (10).

Caso Chaparral

Fatte queste premesse viene presentato un caso connesso ai problemi sopraesposti. In seguito a una denuncia da parte di un consumatore per aver avuto seri problemi epatici dopo l’assunzione di un prodotto denominato “Chaparral”, acquistato su Internet da un famoso sito di vendite online, il campione “incriminato” è stato posto sotto sequestro dai Nuclei Antisofisticazioni e Sanità (NAS), che hanno fatto richiesta di analisi chimico-fisiche all’Istituto Superiore di Sanità.

Da una prima verifica è emerso che il nominativo Chaparral non era presente nel Registro degli integratori alimentari per prodotto aggiornato al 01/06/2020 presso il Ministero della Salute, né era ritrovato nel Registro transitorio degli integratori per prodotto aggiornato al 15/01/2020 per cui, anche se apparentemente ne avesse le caratteristiche, il prodotto non risultava tra gli integratori venduti in Italia (11).

Per Chaparral, nome comune nella medicina tradizionale, s’intende il cespuglio di creosoto, o legno grasso negli Stati Uniti, *governadora* o *hediondilla* in Messico. Il nome botanico della pianta è *Larrea tridentata* Coult o (DC) Cov., sinonimo *Larrea mexicana* Moric, appartenente alla Famiglia delle *Zygophyllaceae*, un arbusto sempreverde che cresce nelle aree desertiche del continente americano. In particolare è abbondante nelle aree desertiche degli Stati messicani come San Luis Potosi, Coahuila, Chihuahua, Durango, Sonora, Zacatecas, Baja California Norte e Sur, e negli stati sud-occidentali degli Stati Uniti come Arizona, California, Nevada, Texas e Nuovo Messico (12).

Il cespuglio di creosoto è una pianta con una lunga storia di uso medicinale. Molte tribù indigene del Nord America hanno utilizzato estratti e preparazioni di questa pianta per trattare un’ampia varietà di disturbi tra cui varicella, piaghe della cute, diabete, cancro, malattie sessualmente trasmissibili, tubercolosi, raffreddore. Gli usi della pianta come antimicrobico, per i sintomi premestruali delle donne, allergie, malattie autoimmuni e reumatismi sono ancora presenti in diverse culture indigene. Il Chaparral tè è comunemente usato per trattare i calcoli della cistifellea e renali (12, 13).

Il creosoto è una ricca fonte di sostanze naturali, circa il 50% del peso delle foglie essiccate è estraibile. Le foglie sono lucide con uno spesso rivestimento resinoso, che emana un forte odore e ha un sapore aspro. La resina che copre le foglie è costituita da molteplici agliconi di flavonoidi, oli essenziali, alcaloidi e diversi lignani. Tra questi ultimi, in particolare, l’acido nordiidroguaiaretico (NDGA). L’NDGA rappresenta circa il 5-10% del peso secco delle foglie e corrisponde all’80% di tutti i fenoli nella resina (12).

L’NDGA e altri fenoli della superficie fogliare nella pianta hanno la funzione di agenti antimicrobici e di protezione contro fattori biotici (erbivori, insetti, ecc.) e abiotici (radiazioni UV, perdita d’acqua) (14, 15).

L’NDGA è un composto naturale con varie proprietà biologiche, ma la sicurezza e l’eventuale tossicità per un uso terapeutico devono ancora essere vagliate tramite studi clinici. Tra le proprietà medicinali proposte per NDGA ci sono quelle dovute alla sua attività come antiossidante (16, 17).

Nel corso degli anni, questo composto è stato studiato e ha guadagnato popolarità e interesse anche per le sue proprietà antineoplastiche, antivirali e antinfiammatorie (18, 19).

Esistono però numerosi dati di epatotossicità attribuibili a prodotti a base di erbe contenenti *L. tridentata* foglie (20). Negli anni '90 del secolo scorso, la Food and Drug Administration (FDA) statunitense ha registrato una serie di casi di epatotossicità correlata all'uso di "Chaparral", che andavano da lievi aumenti delle concentrazioni sieriche di enzimi epatici a epatiti fulminanti, che hanno richiesto un successivo trapianto di fegato per insufficienza epatica. La tossicità di "Chaparral" viene attribuita all'acido nordiidroguaiaretico (17, 21-23).

La fisiopatologia della tossicità del Chaparral è ancora sconosciuta. Attualmente vengono discusse diverse possibilità: il principio attivo del Chaparral, l'acido nordiidroguaiaretico, può inibire la trasformazione dell'acido arachidonico per interferenza con la ciclo-ossigenasi. Inoltre, è stata descritta l'inibizione del citocromo P450 (24, 19). Entrambi gli effetti inibitori possono essere responsabili dei danni agli epatociti. Inoltre, alcuni metaboliti del Chaparral rivelano attività estrogenica e gli stessi estrogeni possono essere epatotossici (25, 26).

L'acido nordiidroguaiaretico è un componente polifenolico contenuto come tale in ingenti quantità nelle piante del genere *Larrea* (9-15%). Chimicamente è un catecolo lignanico, a cui sono attribuite le lesioni linfatiche e renali che si osservano quando viene somministrato cronicamente ad alte dosi ai roditori (27). Altre documentazioni scientifiche suggeriscono, inoltre, che il consumo cronico di acido nordiidroguaiaretico può causare tossicità epatica negli esseri umani. L'acido nordiidroguaiaretico probabilmente subisce una biotrasformazione nella specie chimica più reattiva di chinone, che è responsabile della sua tossicità (16).

Analisi del campione

Di fronte al campione denominato Chaparral (*Larrea tridentata*), costituito da un barattolo contenente "180 capsule da 500 mg", la cui vendita non è permessa in Italia come integratore alimentare, ma neanche come farmaco (3, 11), è parso giusto innanzitutto verificare se ciò che veniva dichiarato in etichetta corrispondesse al vero. Per procedere in questa direzione ci si è procurato da una ditta tedesca, fornitrice di piante certificate, le foglie della pianta *L. tridentata* Coult (*syn L. mexicana* Moric) utilizzata come standard analitico, per confrontarla con la specie botanica presente nel prodotto denominato Chaparral. Oltre alla pianta è stato acquistato, come marker identificativo, l'acido nordiidroguaiaretico il componente più abbondante e responsabile della maggior parte degli effetti biologici della *L. tridentata*, per ottenere insieme alla valutazione qualitativa anche una stima del suo contenuto nel campione da esaminare.

Le farmacopee di vari Paesi – Europa, Stati Uniti, Cina – e World Health Organization (WHO) nelle linee guida su "Quality control methods for herbal materials" per definire la qualità di prodotti a base di piante raccomandano la tecnica della cromatografia su strato sottile (*Thin Layer Chromatography*, TLC) o quella ad alta prestazione (*High Performance Thin Layer Chromatography*, HPTLC), e l'utilizzo del "fingerprint" per l'identificazione di una pianta o una miscela di piante, e la determinazione della presenza di eventuali impurezze nei preparati vegetali (28).

L'idoneità di un metodo analitico dipende dalla matrice del campione da analizzare e dagli obiettivi da raggiungere con l'analisi. Mentre la parte di pianta o la sua forma in polvere, che costituiscono le materie prime, possono essere identificate da caratteristiche macroscopiche o microscopiche, ciò non è possibile quando tale materiale viene estratto o lavorato. In questi casi, le tecniche cromatografiche, come la cromatografia su strato sottile ad alta prestazione (HPTLC) o la cromatografia liquida ad alta prestazione HPLC sono le più idonee per studiare la qualità del materiale vegetale, valutarne l'identità, la composizione e non per ultimo individuare la presenza

di adulteranti. La HPTLC è una metodica che permette flessibilità, sensibilità specifica, e una semplice preparazione del campione.

La HPTLC accoppiata alla densitometria, una tecnica ormai in uso dalla nostra unità operativa da parecchi anni, si è rivelata molto indicata per ottenere, in un tempo relativamente breve e analizzando più campioni in contemporanea, un *identikit* delle specie vegetali tramite il riconoscimento della loro impronta digitale ovvero del loro tracciato cromatografico (29-31).

Nel caso del Chaparral il primo passo è stato ricercare in letteratura se già fosse stato sviluppato un metodo analitico in HPTLC per la *Larrea*. La ricerca ha evidenziato metodi analitici per la parte di pianta utilizzata e per l'acido nordiidroguaiaretico. Tra i vari metodi è stato utilizzato, dopo la messa a punto e la riconvalida nel nostro laboratorio, quello della Camag, sviluppato in HPTLC per la ricerca del NDGA nell'estratto metanolico di campioni di foglie di Chaparral (32).

Le tracce cromatografiche, come profili definiti "fingerprints", ottenute per il campione Chaparral e il riferimento della pianta sono risultati simili in intensità e R_f (*Retention factor*) delle macchie separate sulla lastra e nei densitogrammi (Figura 1 e Figura 2). Si è perciò potuto affermare che nel campione sequestrato fosse presente la pianta *L. tridentata* come riportato in etichetta. Non risultavano, peraltro, dalla lastra ulteriori bande attribuibili ad altre eventuali sostanze aggiunte.

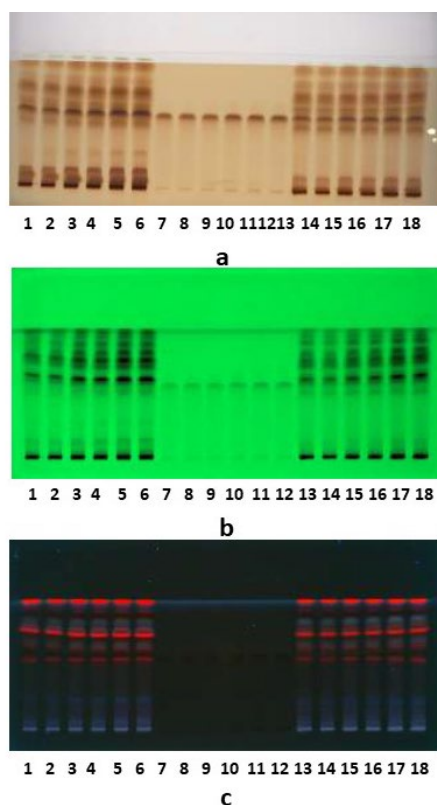


Figura 1. Lastra HPTLC 60 F 254 in gel di silice su vetro 20,0 x 10,0 cm eluita con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 70:9,2 letta al visualizer: a) dopo derivatizzazione con il reattivo Fast Blu salt B a luce bianca, b) a λ 254 nm e c) a λ 365 nm; tracce 1-6 *Larrea tridentata* deposizioni in doppio di 200, 300 e 400 μg ; tracce 7-12 acido nordiidroguaiaretico std da 3, 4 μg ciascuna concentrazione applicata in triplicato; tracce 13-18 campione Chaparral deposizioni in doppio di 200, 300 e 400 μg

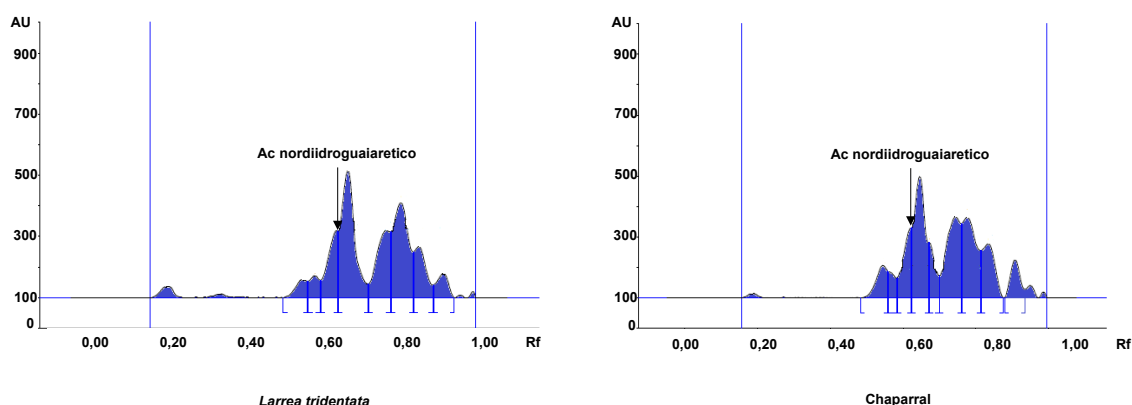


Figura 2. Densitogrammi a confronto tra la pianta *Larrea tridentata* di riferimento e il campione Chaparral

Il caso esposto porta a ribadire la necessità di rivolgersi per l'acquisto di un integratore ai canali autorizzati e di consultare il medico o il farmacista prima dell'assunzione: ciò è particolarmente importante in considerazione del fatto che alcuni prodotti acquistati sul web possono essere non conformi ai criteri stabiliti dalla Direttiva 2002/46/CE per la loro produzione e commercializzazione (33).

Come il Chaparral, molti preparati presenti online provengono da stati esteri dove i controlli sulla sicurezza e qualità potrebbero essere carenti. È evidente come la figura di un professionista della salute fornisca la garanzia di un acquisto sicuro, e inoltre permetta al consumatore di avere le indicazioni necessarie di come e quanto assumere il preparato anche in concomitanza con altri farmaci (34).

Caso “Curcuma”

Circa 27 casi di epatite colestatica acuta, tutti presumibilmente attribuiti a diversi nuovi integratori alimentari a base di curcuma e curcumina, sono stati segnalati nel giugno 2019 al sistema di Fitosorveglianza, VigiErbe.it (www.vigierbe.it), coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità. Dopo la segnalazione alcuni di questi prodotti sono stati ritirati dalle aziende.

Una prima lista di integratori fu redatta dal Ministero della Salute che invitò i consumatori “a sospendere temporaneamente a titolo precauzionale il consumo” delle confezioni acquistate sia nei canali tradizionali, sia online e affermò che erano in corso le verifiche per individuare la causa delle epatiti (35).

I preparati incriminati, responsabili dei casi di epatiti segnalati erano prodotti a base di estratti di curcuma diversi tra di loro, e avevano manifestato tali reazioni avverse dopo l'assunzione di dosi molto variabili di curcumina, principio attivo in essi contenuto, anche se nella maggior parte dei casi la dose assunta era anche più alta di quella raccomandata e spesso associato ad altri ingredienti volti ad aumentarne l'assorbimento.

Su questi prodotti, pervenuti all'Istituto Superiore di Sanità, sono state effettuate diverse analisi per escludere la presenza di contaminanti o di sostanze farmaceutiche volontariamente aggiunte, a cui si potevano ricondurre le cause del danno epatico (36).

In base a ricerche bibliografiche e a informazioni fornite dagli altri Stati membri, però, emersero altre segnalazioni di casi di epatiti acute a impronta colestatica correlati all'uso di estratti di curcuma.

Per questa ragione una commissione di esperti facenti capo al Ministero della Salute ha stabilito di inserire una specifica avvertenza nell'etichetta degli integratori a base di curcuma come quelli in questione, volta a sconsigliarne l'uso a soggetti con alterazioni della funzione epato-biliare o con calcolosi delle vie biliari e, in caso di concomitante assunzione di farmaci, a sentire sempre il parere del medico.

Per la curcuma venduta come spezia (polvere del rizoma della pianta) e come colorante alimentare (E100 nella codifica europea degli additivi alimentari), dato il consumo ridotto, non sono emersi elementi per particolari raccomandazioni. Tuttavia la situazione continua a essere seguita con attenzione in relazione all'emergere di possibili nuovi elementi o dati scientifici da considerare al fine di tutelare la sicurezza dei consumatori (35).

I prodotti sequestrati a base di curcuma pervennero al Dipartimento di sicurezza Alimentare Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria (SANV) dell'Istituto Superiore di Sanità affinché fossero effettuate le dovute analisi di controllo in riferimento alla composizione dei preparati, al fine di verificare se la causa scatenante dei casi di epatite fosse ascrivibile alla loro composizione e, in collaborazione con il Centro Nazionale Ricerca e Valutazione Preclinica e Clinica dei Farmaci, fu formulata una risposta.

Esaminando, per prima cosa, le etichette dei prodotti implicati di diverse ditte produttrici, si constatò che presentavano una composizione quali-quantitativa differente. Alcuni dichiaravano contenere curcuma, altri curcumina, altri curcuma addizionata di piperina che, come noto, migliora l'assorbimento della curcumina altrimenti poco solubile e poco biodisponibile. Data la variabilità delle diciture nella composizione, importante era verificare se tali prodotti contenessero effettivamente curcuma nella specie *Curcuma longa*, autorizzata a essere immessa negli integratori alimentari (Allegato 1 DM 10 agosto 2018. *Disciplina dell'impiego negli integratori alimentari di sostanze e preparati vegetali*).

La *Curcuma longa* L. (curcuma) è una pianta della stessa famiglia dello zenzero (*Zingiberaceae*) e appartiene al gruppo delle più antiche piante aromatiche coltivate nei Paesi del sud-est asiatico (37). Per molti anni il rizoma di questa pianta, che rappresenta la parte sotterranea del fusto, è stato utilizzato per trattare: disturbi biliari, ittero, anoressia, tosse, ulcere diabetiche, disturbi epatici, reumatismi, infiammazione, sinusite, disturbi mestruali, ematuria, ed emorragia.

La curcuma o curcumin è anche usata come antisettico, analgesico, antinfiammatorio, antimalarico, repellente per insetti (38) e nella cura del diabete mellito (37).

Il principio attivo della curcuma è un diferuloilmetano, la curcumina, a cui possono essere attribuite le molteplici proprietà terapeutiche. Negli ultimi anni, sono state effettuate molte ricerche, oggetto di numerose pubblicazioni, correlate da test *in vitro* e *in vivo* e da studi clinici, che hanno rivelato che le attività biologiche si manifestano soprattutto come proprietà antinfiammatorie, antiossidanti e come prevenzione nel cancro (39, 40).

La curcumina è un polifenolo lipofilo, quasi insolubile in acqua, ma abbastanza stabile nel pH acido dello stomaco.

A causa della sua rapida coniugazione e *clearance* plasmatica, e quindi alla sua rapida eliminazione, la sua utilità terapeutica è stata alquanto limitata, portando i ricercatori a indagare sull'opportunità di complessare la curcumina con altre sostanze per aumentarne la biodisponibilità sistemica.

Una sostanza che è stata studiata per ovviare a questa difficoltà è l'alcaloide piperina, un costituente del pepe nero e del pepe lungo (*Piper nigrum* e *Piper longum*, rispettivamente).

Nell'uomo somministrando 20 mg di piperina in associazione a 2 g di curcumina si determina un aumento della biodisponibilità sierica pari a 20 volte quella della curcumina da sola, capacità che è stata attribuita all'inibizione da parte della piperina della glucuronidazione epatica e del metabolismo intestinale (41).

Un altro metodo attualmente in fase di studio, sempre volto a eliminare il problema della insolubilità in acqua della curcumina, complessa quest'ultima con un fosfolipide, noto come fitosoma capace di creare un sistema di trasporto innovativo per principi attivi poco biodisponibili.

Il complesso fosfatidilcolina-curcumina è più facilmente assorbito nelle membrane cellulari lipofile, rendendolo in modo significativo più biodisponibile della curcumina non legata. In esperimenti fatti da alcuni ricercatori sui ratti, la concentrazione plasmatica massima e la durata dell'azione in base all'*Area Under the time/Concentration Curve* (AUC), di questo complesso risultavano cinque volte maggiori rispetto alla curcumina non legata (41).

La ricerca mostra che la curcumina è una molecola altamente pleiotropica in grado di interagire con numerose molecole bersaglio coinvolte nell'infiammazione. Il meccanismo d'azione con cui la curcumina modula la risposta infiammatoria sembra sia quello della sottoregolazione (*down-regulation*) delle attività della cicloossigenasi-2 (COX-2), delle lipossigenasi, degli enzimi inducibili di ossido nitrico sintetasi (iNOS) e dell'inibizione della produzione delle citochine infiammatorie (41).

Attualmente, è stata dedicata grande attenzione alla curcumina come bloccante del Fattore della Necrosi Tumorale (*Tumour Necrosis Factor*, TNF-s) citochina che entra in gioco durante i processi infiammatori del nostro organismo, mediatore della maggior parte dei disturbi legati all'infiammazione (42).

La causa principale del blocco delle indagini farmacologiche e cliniche sulla curcumina è dovuta alla sua solubilità estremamente bassa in acqua e nei fluidi organici (37). I principi attivi più abbondanti della curcumina rizoma polvere sono i curcuminoidi, con il costituente principale, la curcumina (77%) e i suoi derivati naturali: demetossicurcumina (DMC) (17%) e bisdemetossicurcumina (BDMC) (6%) (37).

Farmacopea e saggio di identificazione

La *Curcuma longa* L. (*syn. Curcuma domestica* Valetton) rizoma è presente come monografia nella Farmacopea Europea nona edizione (43) e come saggio di identificazione al paragrafo C) prevede il metodo di cromatografia su strato sottile (TLC; 2.2.27).

Tale saggio di identificazione viene effettuato per evidenziare l'eventuale presenza di altre specie di curcumina come per esempio la *C. zanthorrhiza* che in TLC non presenterebbe a differenza della *C. longa* alcuna zona marrone appena al di sotto della zona corrispondente al timolo, utilizzato come soluzione di riferimento (43).

Con la tecnica della HPTLC densitometrica, utilizzata nel nostro laboratorio, le singole macchie presenti sulla lastra e corrispondenti ai componenti separati dall'estratto vengono trasformate in tracciati cromatografici, definiti densitogrammi capaci di mostrare curve analogiche simili ai picchi della più comune tecnica dell'HPLC. Nell'HPTLC, la porosità più fine della silice, posta su una lastra in vetro, rende questa tecnica più sensibile rispetto alla TLC e tale da permettere di identificare e quantificare quantità molto piccole dei campioni di CURCUMA A, B, C e D da esaminare nell'ordine dell'intervallo di nanogrammi (Figura 3).

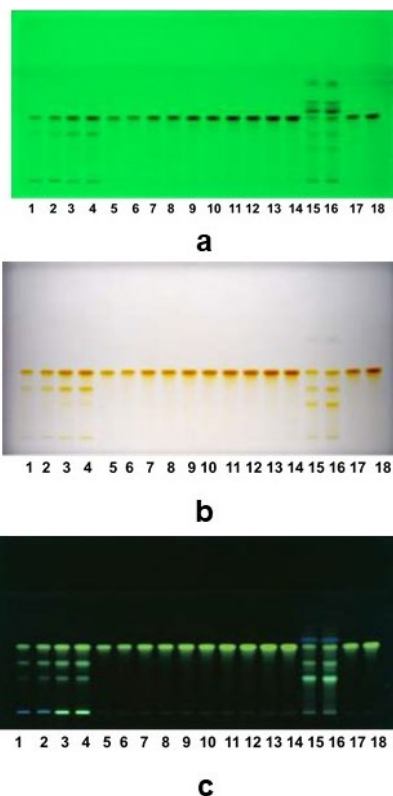


Figura 3. Lastra HPTLC 60 F 254 in gel di silice su vetro 20,0 x 10,0 cm: a) letta al visualizer a 254 nm, b) letta al visualizer alla luce bianca e c) letta al visualizer a 365 nm; tracce 1, 2 estratto contenente CURCUMA campione A, 25 μg e 37,5 μg rispettivamente; tracce 3, 4 estratto contenente CURCUMA campione B, 12,5 μg e 15 μg rispettivamente; tracce 5-14 Curcumina std USP da 1 μg a 3 μg , in doppio, con incremento di 0,5 μg ; tracce 15, 16 estratto contenente CURCUMA e PIPERINA campione C, 40 μg e 60 μg rispettivamente; tracce 17, 18 estratto contenente CURCUMA campione D, 3 μg e 4 μg rispettivamente

Dai densitogrammi riportati in Figura 4, dei campioni incriminati e analizzati secondo il metodo TLC descritto per la curcumina nella monografia relativa di Farmacopea Europea, si evince che:

- è stata utilizzata per alcuni campioni veramente la pianta *Curcuma longa* L., perché per questi sono presenti i picchi dei tre principali costituenti di questa specie, i trecurcuminoidi curcumina, demetossicurcumina e bisdemetossicurcumina.
- si è potuto escludere la presenza delle altre due specie riportate in letteratura come adulteranti, in quanto se fosse stata utilizzata *Curcuma zanthorrhiza* Roxb. in luogo di *C. longa* non sarebbe stata presente la bisdemetossicurcumina, mentre sarebbe stata rivelata con il reattivo anisaldeide una banda in più nel terzo superiore della corsa cromatografica tipica della *C. zanthorrhiza* (monografia n. 01/2015: 1441 di Farmacopea Europea); se invece fosse stata utilizzata la *Curcuma zedoaria* Rosc. la demetossicurcumina corrispondente alla banda a R_f centrale sarebbe stato il curcuminoide prevalente sugli altri due (*Botanical Adulterants Bulletin*, May 2018).
- si evidenzia per altri campioni la presenza della sola curcumina, essendo il densitogramma costituito da un solo picco a R_f corrispondente allo *standard* di riferimento utilizzato, la curcumina *standard* USP della *United States Pharmacopeia*, chimicamente il (E,E)-1,7-bis(4-idrossi-3-metossifenil)-1,6-eptadiene-3,5-dione).

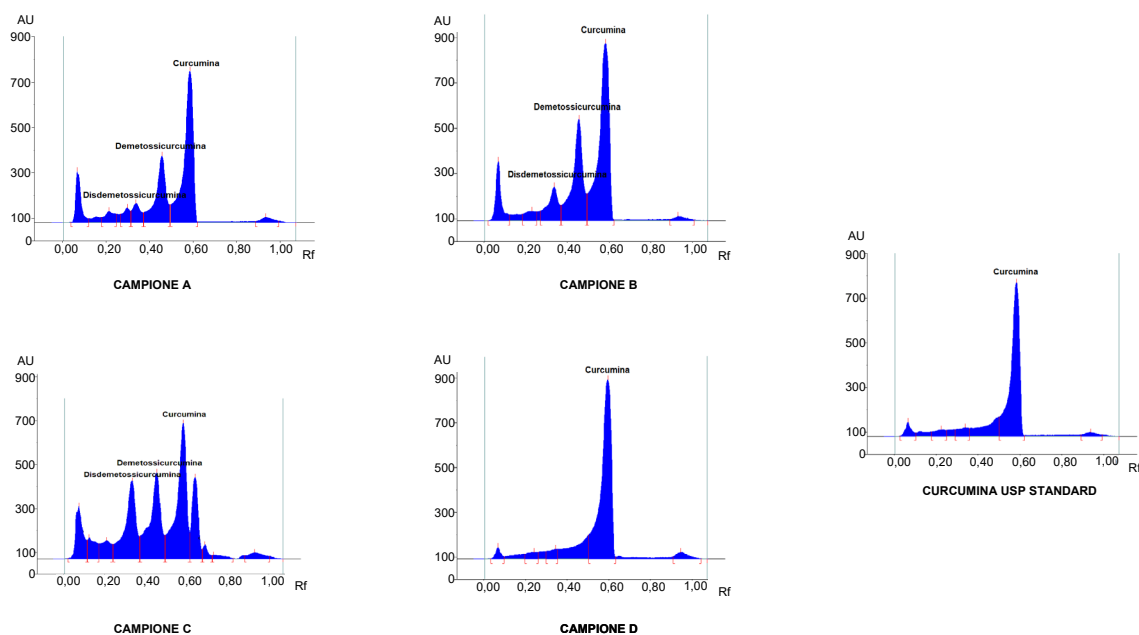


Figura 4. Densitogrammi dei campioni A), B), C) e D) a confronto con la curcumina USP standard di riferimento letti al densitometro a 365 nm

Dalla nostra analisi non è stato possibile capire se la curcumina fosse di origine naturale o di sintesi. È noto che gli organismi vivi o vissuti recentemente fanno parte del ciclo del carbonio, e contengono una quantità nota di carbonio-14. Questo radioisotopo decade col tempo: il petrolio e i suoi derivati sono infatti di origine così antica che il carbonio-14 è completamente assente. Misurando quindi il carbonio-14 si ha un'indicazione precisa del contenuto naturale di una sostanza organica naturale come la curcumina (44). Così su quei campioni che non mostravano nei cromatogrammi i 3 picchi dei curcuminoidi presenti nella pianta fu eseguita, da altri laboratori, l'analisi del C14 mediante spettrometria di massa. Questa tecnica ha chiarito definitivamente che la curcumina nei campioni in esame fosse di origine naturale e non di sintesi in quanto, nella curcumina di origine naturale, il C14 è più abbondante.

Il Ministero della Salute, in base ai risultati delle analisi interdisciplinari condotte, ha quindi escluso la presenza di contaminanti nei prodotti analizzati a base di curcuma che potevano aver provocato quei casi di epatite denunciati. Nella nota pubblicata il 26 luglio 2019 sul sito del Ministero della Salute si afferma che “le cause erano verosimilmente da ricondurre a particolari condizioni di suscettibilità individuale, di alterazioni preesistenti, anche latenti, della funzione epato-biliare o anche alla concomitante assunzione di farmaci” (45). Nella stessa nota veniva comunicata l'intenzione del Ministero di adottare una specifica avvertenza per l'etichettatura degli integratori contenenti estratti e preparati di *Curcuma longa*, poi riportata nella colonna “Prescrizione etichetta” dell'Allegato 1 al DM 10 agosto 2018 sulla “Disciplina dell'impiego negli integratori alimentari di Sostanze e preparati vegetali”, nell'ultimo aggiornamento del Decreto 26 luglio 2019: “In caso di alterazioni della funzione epatica, biliare o di calcolosi delle vie biliari, l'uso del prodotto è sconsigliato. Se si stanno assumendo farmaci, è opportuno sentire il parere del medico.” (3). Nello stesso Allegato 1 aggiornato al luglio 2019 nella colonna sulle “Linee guida ministeriali di riferimento per gli effetti fisiologici” vengono tolti tutti i riferimenti a “funzione epatica”, “funzione digestiva” e “funzionalità del sistema digerente” (46).

Conclusioni

A causa della complessità di una pianta o un suo derivato, per caratterizzare le diverse classi di metaboliti in essa presenti, una singola tecnica analitica è generalmente insufficiente. In uno studio di metabolomica la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare e la spettrometria di massa sono le più frequentemente utilizzate pur presentando, ognuna in modo diverso, dei limiti nel rilevare tutte le classi chimiche. Tra i sistemi introdotti di recente, la cromatografia su strato sottile ad alta prestazione unita alla densitometria (HPTLC densitometrica) ha mostrato un potenziale interessante come strumento complementare e più completo per uno studio di metabolomica e ci ha permesso di individuare velocemente, nel caso del Chaparral, la corrispondenza del prodotto alla pianta certificata, per la curcuma le differenze nella composizione tra i prodotti presenti in commercio.

Bibliografia

1. Italia. Decreto Legislativo 24 aprile 2006, n.219. Attuazione della direttiva 2001/83/CE (e successive direttive di modifica) relativa a un codice comunitario concernente i medicinali per uso umano, nonché della direttiva 2003/94/CE. *Gazzetta Ufficiale* n. 142 del 21-6-2006 - Suppl. Ordinario n.153.
2. Italia. Decreto Legislativo 21 maggio 2004, n. 169. Attuazione della direttiva 2002/46/CE relativa agli integratori alimentari. *Gazzetta Ufficiale* n. 164 del 15 luglio 2004.
3. Ministero della Salute. DM 10 agosto 2018. Disciplina dell'impiego negli integratori alimentari di sostanze e preparati vegetali, Allegato 1, come aggiornato con Decreto 9 gennaio 2019 e Decreto 26 luglio 2019. *Gazzetta Ufficiale Serie Generale* 224 del 26/9/2018.
4. FederSalus. *Le farmacie e parafarmacie online trainano il mercato degli integratori alimentari*. Roma: Federsalus; 2021. Disponibile all'indirizzo: <https://www.federsalus.it/le-farmacie-e-parafarmacie-online-trainano-il-mercato-degli-integratori-alimentari/>; ultima consultazione 24/02/2021.
5. Ministero della Salute. *Etichettatura e Claims*. Roma: Ministero della Salute; 2016. Disponibile all'indirizzo: http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_5.jsp?area=nutrizione&menu=etichettatura; ultima consultazione 24/02/2021.
6. Ministero della Salute. *Vendita on line di medicinali*. Roma: Ministero della Salute; 2016. Disponibile all'indirizzo: http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_5.jsp?lingua=italiano&area=farmaci&menu=online; ultima consultazione 24/02/2021.
7. Europa. Direttiva 2002/46/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 10 giugno 2002 per il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri relative agli integratori alimentari. *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* L 183 del 12/7/2002.
8. European Commission. *RASFF-Food and Feed safety alerts*. RASFF portal. Bruxelles: European Commission; 2020. Disponibile all'indirizzo: https://ec.europa.eu/food/safety/rasff/portal_en; ultima consultazione 24/02/2021.
9. Ministero della Salute. *RASFF - Sistema di allerta rapido per alimenti e mangimi*. Roma: Ministero della Salute; 2020. Dati disponibili all'indirizzo: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2914_allegato.pdf; ultima consultazione 24/02/2021.
10. Istituto Superiore di Sanità, ISS-Epicentro. *Fitosorveglianza*. Roma: ISS-Epicentro; 2021. Disponibile all'indirizzo: <https://www.epicentro.iss.it/fitosorveglianza/>; ultima consultazione 24/02/2021.

11. Ministero della Salute. *Registro degli integratori alimentari*. Roma: Ministero della Salute; 2020. http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?lingua=italiano&id=3668&area=Alimenti%20particolari%20e%20integratori&menu=registri; ultima consultazione 24/02/2021.
12. Arteaga S, Andrade-Cetto A, Cárdenas R. *Larrea tridentata* (Creosote bush) an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. *J Ethnopharmacol* 2005;26;98(3):231-9.
13. Gnabre J, Bates R, Huang RC. Creosote bush lignans for human disease treatment and prevention: Perspectives on combination therapy. *J Tradit Complement Med* 2015; 5(3):119-126.
14. Zuravnsky KN. *Understanding the roles of polyploidy and the environment on nordihydroguaiaretic variation in Larrea tridentata*. [Unpublished master's thesis]. Salisbury, MD: Salisbury University; 2014.
15. Mabry TJ, Hunziker JH, DiFeo DR (Ed.). *Creosote bush: biology and chemistry of Larrea in New World deserts*. Dowden: Hutchinson & Ross, Inc.; 1978.
16. Billinsky JL, Marcoux MR, Krol ES. Oxidation of the lignan nordihydroguaiaretic acid. *Chem Res Toxicol* 2007;20(9):1352-8.
17. Lambert JD, Zhao D, Meyers RO, Kuester RK, Timmermann BN, Dorr RT. Nordihydroguaiaretic acid: hepatotoxicity and detoxification in the mouse. *Toxicol* 2002;40(12):1701-8.
18. Manda G, Rojo AI, Martínez-Klimova E, Pedraza-Chaverri J, Cuadrado A. Nordihydroguaiaretic Acid: From herbal medicine to clinical development for cancer and chronic diseases. *Front Pharmacol* 2020;11:151.
19. Agarwal Rajesh, Wang Zy, Bik DP, Mukhtar Hasan. Nordihydroguaiaretic acid an inhibitor of lipoxygenase also inhibits cytochrome P-450-mediated monooxygenase activity in rat epidermal and hepatic microsomes. *Drug Metab Dispos* 1991;19(3):620-4.
20. Stickel F, Egerer G, Seitz HK. Hepatotoxicity of botanicals. *Public Health Nutr* 2000;3(2):113-24.
21. Navarro VJ, Seeff LB. Liver injury induced by herbal complementary and alternative medicine. *Clin Liver Dis* 2013;17(4):715-35.
22. Seeff L, Stickel F, Navarro VJ. Hepatotoxicity of herbs and dietary supplements. In: Kaplowitz N, DeLeve LD (Ed.). *Drug-induced liver disease*, 3rd edn. Amsterdam: Elsevier; 2013. p. 631-58.
23. Estes JD, Stolpman D, Olyaei A, *et al*. High prevalence of potentially hepatotoxic herbal supplement use in patients with fulminant hepatic failure. *Arch Surg* 2003;138(8):852-8.
24. Capdevila J, Gil L, Orellana M, Marnett LJ, Mason JI, Yadagiri P, Falck JR. Inhibitors of cytochrome P-450-dependent arachidonic acid metabolism. *Arch Biochem Biophys* 1988;261(2):257-63.
25. Obermeyer WR, Musser SM, Betz JM, Casey RE, Pohland AE, Page SW. Chemical studies of phytoestrogens and related compounds in dietary supplements: flax and chaparral. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995;208(1):6-12.
26. Sheikh NM, Philen RM, Love LA. Chaparral-associated hepatotoxicity. *Arch Inter Med* 1997;157(8):913-9.
27. Kang I, Park M, Yang SJ, Lee M. Lipoprotein lipase inhibitor nordihydroguaiaretic acid aggravates metabolic phenotypes and alters HDL particle size in the western diet-fed db/db mice. *Int J Mol Sci* 2019;20(12):3057.
28. World Health Organization. *Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials*. Geneva: World Health Organization; 1998.
29. Nicoletti M., Toniolo C, Gallo FR, Multari G, Palazzino G. Traceability in multi-ingredient botanicals by HPTLC fingerprint approach. *JPC* 2013; 26(3):243-7.

30. Gallo FR, Multari G, Panusa A, Pagliuca G, Palazzino G, Giambenedetti M, Petitto V, Nicoletti M. Bearberry identification by a multidisciplinary study on commercial raw materials. *Nat Prod Res* 2013;27(8):735-42.
31. Gallo FR, Multari G, Federici E, Palazzino G, Giambenedetti M, Petitto V, Nicoletti M. Chemical fingerprinting of *Equisetum arvense* L. using HPTLC Densitometry and RP-LC. *Nat Prod Res* 2011;(13):1261-70.
32. HPTLC Association. *Chaparral Leaf (Larrea tridentata)*. 2017. Disponibile all'indirizzo: https://www.hptlc-association.org/media/3K5E87I2/Larrea_tridentata_Chaparral_leaf_HPTLC_Association_31_Aug_2017.pdf; ultima consultazione 21/02/2022.
33. Unione Italiana Food. *Linea guida sulla qualità degli integratori alimentari*. 33. Milano: Unione Italiana Food; 2019. Disponibile all'indirizzo: <http://www.integratoriitalia.it/wp-content/uploads/2019/02/Linee-Guida-Qualita%CC%80-Integratori-febbraio-2019.pdf>; ultima consultazione 24/02/2021.
34. Ministero della Salute. *Decalogo per un corretto uso degli integratori alimentari*. Roma: Ministero della Salute; 2019. http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_opuscoliPoster_191_allegato.pdf; ultima consultazione 01/02/2021.
35. Ministero della Salute. *Integratori alimentari contenenti estratti e preparati di Curcuma longa*. Roma: Ministero della Salute; 2021. Disponibile all'indirizzo: http://www.salute.gov.it/portale/news/p3_2_1_1_1.jsp?lingua=italiano&menu=notizie&p=dalministro&id=3842; ultima consultazione 24/02/2021.
36. Menniti-Ippolito F, Ippoliti I, Pastorelli AA, Altieri I, Scalise F, De Santis B, Debegnach F, Brera C, Pacifici R, Pichini S, Pellegrini M, Rotolo MC, Graziano S, Palazzino G, Multari G, Gallo FR, Neri B, Giannetti L, Russo K, Fedrizzi G, Bonan S, Mazzanti G, Moro PA, Salvi E, Firenzuoli F, Valeri A, Moretti U, Traversa G, Silano M, Stacchini P, Boniglia C. Turmeric (*Curcuma longa* L.) food supplements and hepatotoxicity: an integrated evaluation approach. *Ann Ist Super Sanità* 2020;56(4):462-9.
37. Karłowicz-Bodalska K, Han S, Freier J, Smolenski M, Bodalska A. Curcuma longa as medicinal herb in the treatment of diabetic complications. *Acta Pol Pharm* 2017;74(2):605-10.
38. Damalas CA. Potential uses of turmeric (*Curcuma longa*) products as alternative means of pest management in crop production. *Plant Omics* 2011;4(3):136-41.
39. Mahmood K, Zia KM, Zuber M, Salman M, Anjum MN. Recent developments in curcumin and curcumin based polymeric materials for biomedical applications: a review *Int J Biol Macromol* 2015;81:877-90.
40. Shanmugam MK, Rane G, Kanchi MM, Arfuso F, Chinnathambi A, Zayed ME, Alharbi SA, Tan BKH, Kumar AP, Sethi G. The multifaceted role of curcumin in cancer prevention and treatment. *Molecules* 2015;20:2728-69.
41. Jurenka JS. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Altern Med Rev* 2009;14 (2):141-53.
42. Aggarwal BB, Gupta SC, Sung B. Curcumin: an orally bioavailable blocker of TNF and other pro-inflammatory biomarkers. *Br J Pharmacol* 2013;169:1672-79.
43. Council of Europe. *Curcumae zanthorrhizae rhizoma Monographs 1441 e Curcumae longae rhizoma 2543*. In: *European Pharmacopoeia. 9th Edition*. Strasbourg: Council of Europe; 2020. p. 1545.
44. Beta Analytic Testing Laboratory. *Analisi al carbonio-14 della curcumina*. Miami, FL: Beta Analytic; 2021. Disponibile all'indirizzo: <https://www.betalabservices.com/italiano/prodotti-naturali/curcumina-analisi.html>; ultima consultazione 24/02/2021.
45. FederSalus. *Integratori alimentari a base di curcuma ed epatite: il Ministero della Salute esclude una relazione di causa-effetto*. Roma: FederSalus. Disponibile all'indirizzo:

<https://www.federsalus.it/integratori-alimentari-a-base-di-curcuma-ed-epatite-il-ministero-della-salute-esclude-una-relazione-di-causa-effetto/>; ultima consultazione 24/02/2021.

46. Farmacovigilanza.eu. *Epatiti acute colestatiche associate a prodotti a base di curcuma*. Verona: Farmavigilanza.eu; 2019; Disponibile all'indirizzo: <https://www.farmacovigilanza.eu/content/epatiti-acute-colestatiche-associate-prodotti-base-di-curcuma>; ultima consultazione 24/02/2021.
47. Council of Europe. *Homeostasis, a model to distinguish between food, including food supplements, and medicinal products*. Strasbourg: Council of Europe; 2008. p. 8.

MECCANISMI DI RESISTENZA DEI TUMORI E IMPIEGO DELLE SOSTANZE NATURALI NELLA TERAPIA ADIUVANTE

Maria Condello (a), Evelin Pellegrini (a), Giuseppe Arancia (b), Stefania Meschini (a)

(a) Centro Nazionale per la Ricerca e la Valutazione Preclinica e Clinica dei Farmaci,
Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) già Dipartimento Tecnologia e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Sebbene vengano introdotti sempre nuovi protocolli terapeutici per la cura dei tumori, il cancro rappresenta ancora la terza causa di morte nel mondo. L'elevato tasso di mortalità è dovuto all'inefficacia dei trattamenti farmacologici e all'instaurarsi del fenomeno della polifarmacoresistenza (*Multidrug Resistance*, MDR).

I chemioterapici usati nella terapia contro il cancro possono essere molto tossici con effetti collaterali che ne limitano l'efficacia. Tra gli effetti più noti vi sono la cardiotoxicità della doxorubicina e la nefrotossicità e immunosoppressione del cisplatino. La chemioterapia adjuvante ha lo scopo di ridurre il rischio di ricaduta a livello locale e generale successivo all'intervento chirurgico. Se la malattia, invece, è localmente avanzata e non è facilmente operabile, viene effettuato un trattamento chemioterapico preoperatorio (chemioterapia neoadiuvante). Quando la malattia non è limitata a un solo organo ma coinvolge anche altre sedi (osso, polmone, fegato, ecc.), sia perchè recidivata sia perchè già presente al momento della diagnosi, si effettua direttamente il protocollo chemioterapico proprio della malattia metastatica. Molti sono i farmaci a disposizione per i diversi trattamenti che vengono utilizzati in combinazione o in modo sequenziale. Nonostante l'avanzamento tecnologico e le numerose ricerche in tale ambito, gli effetti dannosi sugli organi sani impongono l'uso limitato dei chemioterapici a dosi elevate. L'uso contemporaneo di più farmaci a basso dosaggio, con la speranza di ottenere un effetto sinergico, è spesso limitato dalla combinazione di effetti dovuti all'attivazione di *pathway* molecolari, non facilmente prevedibili, responsabili dei fenomeni di resistenza. La resistenza dei tumori ai chemioterapici può essere intrinseca o acquisita. La resistenza intrinseca si instaura, prima del trattamento farmacologico, per effetto delle alterazioni genetiche che il *DeoxyriboNucleic Acid* (DNA) sviluppa durante la trasformazione tumorale e che è la causa dell'insorgere della resistenza a terapie specifiche. La resistenza acquisita è quella indotta in seguito al trattamento farmacologico ed ha anch'essa un ruolo fondamentale nel fallimento della terapia oncologica. Quando una cellula tumorale diventa resistente a farmaci strutturalmente e funzionalmente diversi tra loro, si ha la polifarmacoresistenza.

Allo scopo di superare questi problemi e ottimizzare i protocolli in clinica oncologica, la ricerca preclinica è orientata verso la sperimentazione di combinazioni farmacologiche a dosaggi subcitotossici, con limitati effetti collaterali ed effetti terapeutici mirati verso target intracellulari specifici.

Principali meccanismi della polifarmacoresistenza

Sono stati individuati diversi meccanismi cellulari alla base della resistenza ai farmaci, molti dei quali possono determinare contemporaneamente il fenotipo resistente (Wang, 2019):

- *Resistenza mediata da molecole di trasporto*: la polifarmacoresistenza è spesso associata alla ridotta concentrazione intracellulare del chemioterapico per un aumentato efflusso o per un ridotto ingresso del farmaco nella cellula bersaglio. Le proteine di trasporto coinvolte sono pompe d'efflusso appartenenti alla superfamiglia di proteine transmembrana ATP-dipendenti, dette *ATP-binding cassettes* (ABC) (Gottesman, 2002). Finora sono stati identificati, nel cariotipo umano, geni per 49 proteine ABC che sono state suddivise in 7 famiglie (ABC A-G) (Chen, 2016). Uno dei trasportatori più studiati è la P-glicoproteina (P-gp), proteina di membrana di 170 kDa, prevalentemente localizzata nella membrana plasmatica delle cellule tumorali. Tuttavia è stata trovata anche nelle vescicole intracitoplasmatiche, nel reticolo endoplasmatico, nei mitocondri e nell'apparato del Golgi dove gioca un ruolo nel trasporto del farmaco dal nucleo verso la periferia cellulare e nel nucleo dove è coinvolta nella rimozione della sostanza citotossica dal *DeoxyriboNucleic Acid* (DNA) (Meschini, 2000; Guo, 2019). Tra gli innumerevoli substrati espulsi dalla P-gp ricordiamo gli alcaloidi della Vinca (vinblastina e vincristina), i taxani (paclitaxel e docetaxel), gli antibiotici antraciclinici (doxorubicina, epirubicina e daunorubicina), gli inibitori delle topoisomerasi (etoposide, topotecano) e gli inibitori delle tirosin chinasi (disatinib e gefitinib) (Eckford, 2009). La P-gp è formata da due domini transmembrana omologhi, ciascuno dei quali contiene 6 α -eliche e due domini di legame per i nucleotidi, che legano e idrolizzano ATP. L'interazione tra le due metà della P-gp è essenziale per il corretto funzionamento della pompa (Esser, 2017).
- *Resistenza mediata dall'esocitosi del farmaco mediante vescicole*: alcuni farmaci vengono intrappolati in vescicole di esocitosi, che riversano il farmaco al di fuori dalla cellula tumorale riducendone la concentrazione intracellulare e di conseguenza l'effetto citotossico (Zhitomirsky, 2017).
- *Resistenza metabolica*: un'alterata espressione degli enzimi metabolici di fase I (come le isoforme del citocromo P450) e quelli di fase II (enzimi del glutatione transferasi) è stata trovata in diversi tumori resistenti a una varietà di chemioterapici (Ramsay, 2014; Pathania, 2018).
- *Resistenza all'apoptosi* è mediata da una serie di mutazioni geniche che rendono la cellula incapace di morire per apoptosi in seguito al trattamento con i farmaci (Wilson *et al.*, 2009). Le principali mutazioni interessano il *pathway* di p53 e i geni che codificano per le proteine proapoptotiche (come Bax e Bak) e antiapoptotiche (Bcl-2, Bcl-xl) (Fanourakis *et al.*, 2018).
- *Resistenza mediata dallo stress ossidativo*: le specie reattive dell'ossigeno (ROS) provocano danni al *DeoxyriboNucleic Acid* (DNA) nei geni coinvolti nella proliferazione e nel controllo della crescita cellulare, inducendo resistenza al farmaco (Yang, 2018).
- *Microambiente tumorale nella MDR*: numerose evidenze scientifiche suggeriscono il ruolo determinante del microambiente tumorale nella MDR (Al-Akra, 2019). Il microambiente tumorale è una fitta trama dinamica di cellule tumorali, cellule stromali e matrice extracellulare caratterizzato da regioni scarsamente ossigenate (regioni ipossiche), povere di nutrienti, di glucosio (regioni ipoglicemiche) e con pH acido. Di conseguenza le cellule all'interno della massa tumorale, scarsamente irrorate dai vasi sanguigni, ricevono una limitata dose di farmaco con conseguente riduzione dell'effetto della terapia. Il principale

regolatore molecolare della MDR nel microambiente tumorale è la proteina HIF- α in grado di regolare l'espressione dei trasportatori di membrana e degli enzimi del metabolismo del farmaco di fase II (Shen, 2009; Bhattacharya, 2016).

- *Sopravvivenza e l'adattamento delle cellule tumorali*: nelle regioni ipossiche di alcuni tumori solidi, la sopravvivenza e l'adattamento delle cellule tumorali alla mancanza di ossigeno e di nutrienti viene favorita dall'autofagia (Li, 2017). L'autofagia è un processo altamente dinamico che, in condizioni di stress, interviene permettendo alla cellula di riciclare i pochi nutrienti a disposizione per produrre nuova energia (Klionsky, 2016). Inoltre, gli organelli cellulari danneggiati sono degradati in vacuoli autofagici in modo che non siano letali per la cellula stessa (Wei, 2018). È stato dimostrato che l'autofagia promuove la farmacoresistenza favorendo la selezione di cellule staminali tumorali, come osservato nel glioblastoma e nel tumore del seno (Smith, 2019). Le cellule staminali tumorali sono una piccola popolazione del tumore che, grazie all'autofagia, sopravvive alla scarsità di ossigeno o nutrienti, mantiene le caratteristiche di pluripotenza e, avendo un elevato indice invasivo e metastatico, continuano a sopravvivere e a invadere i tessuti circostanti (Nazio, 2019). In particolare, le cellule staminali tumorali utilizzano la mitofagia (eliminazione selettiva dei mitocondri) per eliminare i mitocondri danneggiati, mantenendo basso il livello di ROS e prevenendo l'attivazione della morte cellulare programmata (Liu, 2017).
- *Resistenza mediata da alterazioni epigenetiche*: le alterazioni genetiche sono cambiamenti nelle sequenze del DNA e includono la metilazione del DNA, le modificazioni istoniche e le modificazioni del microRNA (miRNA). Dopo il trattamento chemioterapico possono verificarsi alterazioni epigenetiche che modificano l'espressione dei geni coinvolti nella MDR (Wengong, 2019).

Sostanze naturali nella terapia adiuvante dei tumori farmacoresistenti

La conoscenza approfondita dei meccanismi alla base della farmacoresistenza dei tumori ha permesso di trovare diverse strategie terapeutiche per il loro superamento. Esse sono basate sull'uso dei modulatori dei trasportatori ABC, sul silenziamento genico, sul trattamento con anticorpi monoclonali e sulla veicolazione dei farmaci tramite nanoparticelle di diversa natura (Condello, 2020). Numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato che sostanze naturali (flavonoidi, fenoli, terpenoidi, alcaloidi, carotenoidi, lignani), se somministrate in associazione con i convenzionali chemioterapici, possono ridurre il fenomeno della resistenza, agendo sui diversi meccanismi (Lin, 2020). Per esempio, per ridurre la cardiotoxicità e la resistenza alla doxorubicina, numerosi estratti vegetali sono stati somministrati in associazione con questo chemioterapico: un lignano naturale estratto dal *Silybum marianum* ha ridotto la farmacoresistenza del tumore della prostata (Gioti, 2019).

Studi recenti evidenziano come la Curcumina in associazione con il 5-Fluorouracile sia efficace nei confronti delle cellule umane di carcinoma esofageo e in associazione con il Paclitaxel verso le cellule tumorali della vescica (Pendleton, 2019; Khan, 2020).

In particolare, i nostri studi hanno valutato l'attività chemiosensibilizzante della voacamina (VOA), un alcaloide bisindolico estratto dalla corteccia di una pianta infestante del Brasile, la *Peschiera fuchsiaeifolia*. I primi studi hanno dimostrato che la VOA, a concentrazioni subcitotossiche (1 $\mu\text{g/mL}$), era in grado di aumentare l'effetto della doxorubicina nei confronti di cellule di osteosarcoma umano farmacoresistenti, U2-OS/DX (Meschini, 2003). L'effetto

chemiosensibilizzante della VOA era dovuto a un duplice meccanismo: (a) capacità di inibire, in maniera competitiva, la funzionalità della P-gp, aumentando l'accumulo intracellulare del chemioterapico (Meschini *et al.*, 2005); (b) effetto depolimerizzante sui microtubuli, attraverso il quale, si alterava il flusso di esocitosi delle vescicole contenenti il farmaco doxorubicina (Condello, 2020).

L'effetto chemiosensibilizzante della vocamina nei confronti della doxorubicina è stato inoltre dimostrato anche su altre linee farmacoresistenti di osteosarcoma (SAOS-2-DX) e su linee intrinsecamente resistenti di melanoma (Me30966) (Condello, 2014). Studi successivi hanno dimostrato che i due monomeri (voacangina e vobasina), che costituiscono l'alcaloide dimerico VOA, e il legame chimico che li unisce, sono necessari affinché la VOA abbia effetto chemiosensibilizzante (Condello, 2020).

Infine, la VOA, a concentrazioni elevate (10 µg/mL), induceva un meccanismo di morte cellulare per autofagia sulle stesse linee farmacosensibili e farmacoresistenti di osteosarcoma umano, dimostrando l'importanza dell'uso a dosi subcitotossiche in combinazione con i chemioterapici per favorire il potenziamento dell'attività dei chemioterapici stessi (Meschini, 2008). Alla stessa concentrazione e tempo di incubazione usati per l'effetto chemiosensibilizzante, la VOA non ha avuto alcun effetto tossico sui fibroblasti umani (Condello, 2014), incoraggiando il proseguimento degli studi su linee tumorali di diverso istotipo e in associazione con farmaci chemioterapici diversi dalla doxorubicina.

Conclusioni

Da questa breve rassegna emerge l'importanza delle sostanze naturali quando date in associazione con i convenzionali chemioterapici. Esse infatti possono aumentare, in determinate condizioni, l'effetto tossico dei chemioterapici consentendo da una parte di superare il fenotipo farmacoresistente delle cellule tumorali, dall'altra di diminuire la dose di chemioterapico che potrebbe essere tossico per le cellule sane.

Nonostante tali studi *in vitro* siano promettenti, bisogna sempre ricordare che le sostanze naturali possono essere di per sé tossiche nei confronti dei tessuti sani e bisogna valutare con molta attenzione e cautela le possibili interazioni con i farmaci chemioterapici. Pertanto la successiva sperimentazione animale rappresenta una tappa fondamentale prima di poter sperimentare sul malato l'efficacia della terapia combinata.

Bibliografia

- Al-Akra L, Bae D, Leck LYW, Richardson DR, Jansson PJ. The biochemical and molecular mechanisms involved in the role of tumor micro-environment stress in development of drug resistance. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2019;1863(9):1390-7.
- Bhattacharya B, Omar MFM, Soong R. The Warburg effect and drug resistance. *Br J Pharmacol* 2016;173:970-9.
- Chen Z, Shi T, Zhang L, Zhou P, Deng M, Huang C, Hu T, Jiang L, Li J. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: a review of the past decade. *Cancer Lett* 2016;370:153-64.
- Condello M, Cosentino D, Corinti S, Di Felice G, Multari G, Gallo FR, Arancia G, Meschini S. Voacamine modulates the sensitivity to doxorubicin of resistant osteosarcoma and melanoma cells and does not induce toxicity in normal fibroblasts. *J Nat Prod* 2014;77:855-62.

- Condello M, Pellegrini E, Multari G, Gallo FR, Meschini S. Voacamine: alkaloid with its essential dimeric units to reverse tumor multidrug resistance. *Toxicol in Vitro* 2020;65:104819.
- Eckford PD, Sharom, FJ. ABC efflux pump-based resistance to chemotherapy drugs. *Chem Rev* 2009;109:2989-3011.
- Esser L, Zhou F, Pluchino, KM, Shiloach J, Ma J, Tang WK, Gutierrez C, Zhang A, Shukla S, Madigan JP, Zhou, T, Kwong PD, Ambudkar SV, Gottesman MM, Xia D. Structures of the multidrug transporter P-glycoprotein reveal asymmetric ATP binding and the mechanism of polyspecificity. *J Biol Chem* 2017;292:446-61.
- Fanourakis G, Saetta A, Lazaris AC, Miaouli M, Voutsinas GE, Patsouris E, Tseleni-Balafouta S. Resistance to Fas-mediated apoptosis does not correlate to structural alterations or expression changes of the death receptor in papillary thyroid carcinomas. *Pathobiology* 2018;85:304-10.
- Gioti K, Papachristodoulou A, Benaki D, Havaki S, Beloukas A, Vontzalidou A, Aligiannis N, Skaltsounis AL, Mikros E, Tenta R. Silymarin enriched extract (*Silybum marianum*) additive effect on doxorubicin-mediated cytotoxicity in PC-3 prostate cancer cells. *Planta Med* 2019;85:997-1007.
- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002;2:48-58.
- Guo W, Dong W, Li M, Shen Y. Mitochondria P-glycoprotein confers paclitaxel resistance on ovarian cancer cells. *Onco Targets Ther* 2019;12:3881-91.
- Khan K, Quispe C, Javed Z, Iqbal MJ, Sadia H, Raza S, Irshad A, Salehi B, Reiner Z, Sharifi-Rad J. Resveratrol, curcumin, paclitaxel and miRNAs mediated regulation of PI3K/Akt/mTOR pathway: go four better to treat bladder cancer. *Cancer Cell Int* 2020;20(1):560.
- Klionsky DJ *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 2016;12(1):1-222.
- Li YJ, Lei YH, Yao N, Wang CR, Hu N, Ye WC, Zhang DM, Chen ZS. Autophagy and multidrug resistance in cancer. *Chin J Cancer* 2017;36(1):52-62.
- Lin SR, Chang CH, Hsu CF, Tsai MJ, Cheng H, Leong MK, Sung PY, Chen JC, Weng CF. Natural compounds as potential adjuvants to cancer therapy: preclinical evidence. *Br J Pharmacol* 2020;177:1409-23.
- Liu K, Lee J, Kim JY, Wang L, Tian Y, Chan ST, Cho C, Machida K, Chen D, Ou JJ. Mitophagy controls the activities of tumor suppressor p53 to regulate hepatic cancer stem cells. *Mol Cell* 2017;68(2):281-92.
- Meschini S, Calcabrini A, Monti E, Del Bufalo D, Stringaro A, Dolfini E, Arancia G. Intracellular P-glycoprotein expression is associated with the intrinsic multidrug resistance phenotype in human colon adenocarcinoma cells. *Int J Cancer* 2000;5:615-28.
- Meschini S, Condello M, Calcabrini A, Marra M, Formisano G, Lista P, De Milito A, Federici E, Arancia G. The plant alkaloid voacamine induces apoptosis-independent autophagic cell death on both sensitive and multidrug resistant human osteosarcoma cells. *Autophagy* 2008;4:1020-33.
- Meschini S, Marra M, Calcabrini A, Federici E, Galeffi C, Arancia G. Voacamine, a bisindolic alkaloid from *Peschiera fuchsiaeifolia*, enhances the cytotoxic effect of doxorubicin on multidrug-resistant tumor cells. *Int J Oncol* 2003;23:1505-13.
- Meschini S, Marra M, Condello M, Calcabrini A, Federici E, Dupuis ML, Cianfriglia M, Arancia G. Voacamine, an alkaloid extracted from *Peschiera fuchsiaeifolia*, inhibits P-glycoprotein action in multidrug-resistant tumor cells. *Int J Onc* 2005;27:1597-603.
- Nazio F, Bordi M, Cianfanelli V, Locatelli F, Cecconi, F. Autophagy and cancer stem cells: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Death Differ* 2019;26(4):690-702.
- Pathania S, Bhatia R, Baldi A, Singh R, Rawala RK. Drug metabolizing enzymes and their inhibitors' role in cancer resistance. *Biomed Pharmacother* 2018;105:53-65.

- Pendleton EG, Jamasbi RJ, Geusz ME. Tetrahydrocurcumin, Curcumin, and 5-Fluorouracil effects on human esophageal carcinoma cells. *Anticancer Agents Med Chem* 2019;19(8):1012-20.
- Ramsay EE, Dilda, PJ. Glutathione S-conjugates as prodrugs to target drug-resistant tumors. *Front Pharmacol* 2014;5:53-65.
- Shen G, Kong AN. Nrf2 plays an important role in coordinated regulation of phase II drug metabolism enzymes and phase III drug transporters. *Biopharm Drug Dispos* 2009;30(7):345-55.
- Smith AG, Macleod KF. Autophagy, cancer stem cells and drug resistance. *J Pathol* 2019;247(5):708-18.
- Wang X, Zhang H, Chen X. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resist* 2019;2:141-60.
- Wei Y, Liu M, Li X, Liu J, Li H. Origin of the autophagosome membrane in mammals. *Biomed Res Int*;2018:1012789.
- Wengong S, Shen J, Zheng H, Fan W. The role and mechanisms of action of microRNAs in cancer drug resistance. *Clin Epigenet* 2019;11(1):25.
- Wilson TR, Johnston PG, Longley DB. Anti-apoptotic mechanisms of drug resistance in cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2009;9:307-19.
- Yang, H, Villani, RM, Wang, H, Simpson, MJ, Roberts, MS, Tang, M, Liang, X. The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. *J Exp Clin Cancer Res* 2018;37:1-10.
- Zhitomirsky B, Assaraf YG. Lysosomal accumulation of anticancer drugs triggers lysosomal exocytosis. *Oncotarget* 2017;8:45117-32.

CONTRIBUTO ALLE CONOSCENZE ETNOBOTANICHE IN ITALIA

Paolo Maria Guarrera

già Istituto Centrale per la Demoetnoantropologia e Museo delle Civiltà, Ministero per i beni e le attività culturali e per il turismo, Roma

Introduzione

Negli ultimi 60 anni, a opera di ricercatori della Società Botanica Italiana (SBI), sono stati realizzati oltre 300 lavori di ricerca sulle tradizioni etnobotaniche di aree più o meno ampie, erose dalla civiltà tecnologica, per il recupero dell'identità culturale e la conservazione della etno-biodiversità. Le prime interviste sul campo realizzate nelle Marche dallo scrivente risalgono agli anni '70 del secolo scorso, proseguite in Abruzzo e soprattutto nel Lazio (1), nell'ambito di ricerche coordinate dalla cattedra di Botanica Farmaceutica de "La Sapienza" (2-4), poi continuate in collaborazione con l'Università Roma Tre e altre istituzioni, in Basilicata (5), Calabria (6), Molise (7, 8), Campania (9) e ancora nel Lazio (10, 11).

Dopo aver raccolto per anni la bibliografia scientifica sull'argomento, l'autore è pervenuto a un'opera di sintesi sulle piante della tradizione italiana, in cui gli usi regionali sono fra loro comparati (12). Essa riporta 1167 taxa di piante adoperate in medicina umana – 1119 descritti da Gastaldo (13) – 465 in veterinaria e zootecnia, 161 a scopo antiparassitario, 580 a uso alimentare e aromatizzante; questi numeri sono poi cresciuti negli anni seguenti. Un'altra opera di riferimento, a intento scientifico-didattico, realizzata pochi anni dopo e destinata ai futuri corsi di etnobotanica, nasce nel quadro di una collaborazione con l'Università di Roma Tre e l'Università di Scienze Gastronomiche di Pollenzo, oltre che con altre Università ed Enti di ricerca (14). I due volumi sono stati presentati nell'ambito del Gruppo Botaniche Applicate della SBI e il 19 maggio 2011, presso l'Istituto Superiore di Sanità (ISS), in occasione dei seminari organizzati dal Gruppo di Studio Terapie Integrate e Sostanze Naturali (TISNa) del medesimo Istituto, è stato delineato un quadro dello stato delle indagini etnobotaniche in Italia.

Dopo la pubblicazione (2004-2009) su una rivista erboristica (15), da parte dell'autore, di articoli sulle tipicità di ognuna delle Regioni, negli Atti di un Convegno al Museo delle Civiltà (16) è fornito dallo scrivente un aggiornamento della letteratura etnobotanica. Negli Atti e nel catalogo della mostra abbinata al Convegno (17) sono approfonditi argomenti di medicina, etnobotanica ed erboristeria. Di seguito un cenno su alcune ricerche svoltesi in Italia.

Medicina popolare italiana

La medicina popolare italiana è un insieme di saperi derivanti da antiche conoscenze (greche e romane) stratificatesi nei secoli insieme a resti di successivi sistemi filosofici e medici (es. medioevali, di medicina monastica ed empirica). L'interesse degli studi risiede nel fatto che è possibile individuare le specie botaniche poco studiate o trovare utilizzi nuovi per specie già note in fitomedicina. Dalla ricerca etnobotanica potrebbero derivare nuovi farmaci e integratori, coadiuvanti in varie patologie, ma la prudenza sarà sempre d'obbligo nel valutare usi, efficacia ed eventuali reazioni avverse. La raccomandazione di predisporre inventari delle piante

medicinali adoperate nelle singole medicine tradizionali nazionali era stata evidenziata dalla World Health Organization (WHO) già nel 1978. Tali esperienze e conoscenze andrebbero verificate e validate attraverso le metodiche della scienza moderna (18).

Vengono citate solo a titolo di esempio alcune indagini classiche (19-22) con approccio etnografico e altre più moderne, con approccio quantitativo, cioè con la annotazione del numero di informatori per uso (9, 23) o mirate allo studio di singole affezioni (24).

I rimedi tradizionali sono generalmente semplici e di facile utilizzo. I tipi di preparazione più diffusi sono infusi, decotti, macerati e suffumigi. Per uso esterno nella terapia popolare è frequente l'applicazione locale di parti vegetali, soprattutto foglie fresche, anche pestate o cotte in acqua. Un po' più complessi sono le pomate e gli unguenti. In genere le piante usate sono quelle più comuni e localmente a portata di mano o coltivate negli orti. Il più delle volte tali piante non presentano pericolosità non contenendo, tra i loro principi attivi, sostanze ad azione farmacologica altamente specifica. Quando invece sono adoperate specie i cui principi attivi richiedono un dosaggio rigoroso, l'uso è soprattutto esterno, il che ne diminuisce i rischi. Molte piante fra le più comuni hanno azioni terapeutiche note per alcune affezioni ma nuove per altre o modalità d'uso aggiuntive a quelle descritte nei testi (es. malva, olivo, sambuco, aglio, cipolla, rosmarino, parietaria, cavolo); altre piante sono limitate solo a particolari settori ambientali o addirittura endemiche (es. di isole), e anche queste possono fornire spunti interessanti alla ricerca, in specie le ultime (25).

Di seguito vengono presentati alcuni esempi e casi di studio da ricerche dell'autore (4) come il *Cirsium arvense* (L.) Scop., il cui succo di foglie e fusti si applicava sulle ferite prodottesi durante i lavori campestri (Abruzzo, Marche). L'uso non è indicato nei principali testi farmacobotanici. La pianta, per cui è stata descritta attività antibiotica, contiene apigenina e derivati, kaempferolo, astragalina, linarina, taraxasterolo e derivati, quercetina. Il *Cirsium arvense*, chiamato anche stoppione, fa parte del vasto campionario di specie adoperate in passato per la cura di ferite (dalla scorza di larice al Nord, a quella di olmo al Centro, al *Leontodon hispidus* L., “erba pi’li tagli” al Sud) (25).

Molte sono anche le piante descritte per cure a uso esterno quali scottature, geloni, infiammazioni cutanee (12). *Phlomis fruticosa* L. era usata in Puglia contro la tosse; di essa i principi attivi e l'azione antitussiva non sono stati reperiti in letteratura. *Marrubium vulgare* L. è considerata al Sud una “panacea” a uso in caso di reumatismi, emorroidi, ferite, malaria ecc., contiene marrubina, olio essenziale, saponine, sostanze amare. Per la quantità di usi attribuiti alla pianta nelle tradizioni, il suo studio richiede ulteriori approfondimenti. La *Centaurium erythraea* Rafn contiene eritrocentaurina, genziopirina, fitosterina ed è considerata digestiva e febbrifuga.

L'uso ipotensivo riscontrato nelle Marche e nel Reatino è insolito; non figura pure nei testi, per curare scottature, l'uso di una pomata di “seconda scorza” o midollo di *Sambucus nigra* L., olio d'oliva e cera vergine (Centro Italia). Ampie considerazioni sulle specie adoperate a uso interno, nella medicina popolare, per curare i principali apparati (respiratorio, digestivo, urinario ecc.) e tipiche delle varie regioni, sono riportate in alcune opere (12, 14, 25).

Sono poi descritti casi di studio da altri ricercatori. In Val Tramontina (Friuli) i falegnami praticavano una cura delle ferite da taglio dimostratasi assai razionale: per prevenire infezioni applicavano sulla cute lesionata scaglie di bulbi d'aglio e conidi di penicilli cresciuti su polenta ammuffita (da cui proviene la “penicillina”!) (19). Tra gli usi trans-nazionali: il decotto di *Asplenium ceterach* L. (mucillagini, tannini, acido gallico, sali) curerebbe i calcoli renali oltre che in Basilicata, Puglia, Sicilia, anche in Turchia (14). Di *Sedum telephium* L., adoperato per ferite, è stata dimostrata una azione batteriostatica, promuovente la proliferazione di fibroblasti e la produzione di collagene (26). Tra le piante sarde con potenziali proprietà immunomodulanti vi è il carciofo selvatico, *Cynara cardunculus* L. (27); in Calabria risultano ad azione antinfiammatoria, antiobesità e antiossidante, *Daucus carota* L. e *Sambucus nigra* (28).

Veterinaria e zootecnia tradizionali

Indicazioni riguardanti l'utilizzo di piante in ambito veterinario e zootecnico sono presenti in una fondamentale *review* di Viegli *et al.* (29), a cui hanno fatto seguito pochi lavori (30, 31). Tra gli utilizzi emersi di recente: in Sicilia, quello di *Sideritis italica* (Mill.) Greuter & Burdet come cicatrizzante e di *Helleborus bocconei* Ten. per la diagnosi e il trattamento di polmoniti in cavalli e bovini (32). In un recente articolo è affrontata una problematica attuale, col relativo quesito se dalla medicina popolare svizzera potranno venire indicazioni per ridurre l'uso di antibiotici per la cura degli animali da reddito con lo scopo finale di ottenere mangimi vegetali più sani e naturali (33).

Tra i più promettenti mangimi vegetali della tradizione vi sono quelli a base di ortica (*Urtica dioica* L.), di notevole importanza dietetica (4, 12, 14, 29) che incrementerebbe anche la produzione delle uova di gallina grazie alla presenza di aminoacidi, proteine, sali minerali, vitamine, tannini, acido formico e salicilico (34). Da ricordare anche *Stellaria media* (L.) Vill., detta "occhio del pulcino" nel Lazio, Marche e Toscana: aumenterebbe anch'essa la deposizione di uova (4, 10, 12, 29). I suoi principali componenti sono sali alcalini, tannini, gomme, saponina glicosidica, acidi grassi, flavonoidi, antiossidanti, carotenoidi.

Alimentazione tradizionale

Le erbe spontanee della tradizione, utilizzate già dall'antichità (es. la Columella), sono state studiate sia nelle loro ricette regionali (35, 36) che per più ampie aree (37-39) e per le loro proprietà utili (40). In Umbria sono state indagate per esempio le proprietà antiossidanti di *Bunias erucago* L., *Lactuca perennis* L., *Papaver rhoeas* L. (41) e quelle nutritive di *Tordylium apulum* L. e *Urospermum dalechampii* (L.) Scop. ex F. W. Schmidt (42); mostrano buone capacità antiossidanti *Reichardia picroides* (L.) Roth ed *Helminthotheca echioides* (L.) Holub (43), consumate nel Centro Italia. Molte erbe dell'alimentazione popolare contengono lattoni sesquiterpenici, flavonoidi e carotenoidi e possono avere anche azioni farmacologiche: ad esempio *Sonchus oleraceus* L. è un colagogo e lassativo, *Cichorium intybus* è aperitivo e antiinfiammatorio, *Urtica dioica*, *Brassica rapa* L. e *Campanula rapunculus* L. hanno azione ipoglicemizzante, perché contengono l'inulina che ha un basso indice glicemico. Spesso si usano i giovani germogli, ricchi di fattori di crescita (auxine, citochinine, proteine, vitamine, flavoni), sostanze antiinfiammatorie e stimolanti il sistema reticolo-endoteliale (44, 45). La nutraceutica studia gli effetti farmacologici dei cibi vegetali (12, 14).

Chi effettua la raccolta delle piante spontanee deve essere sicuro della loro identificazione! Negli anni 1995-2007 sono stati riportati 50 casi di intossicazione per ingestione di *Mandragora autumnalis* Bertol. al Sud e in Sicilia, e 6 casi per ingestione di *Digitalis purpurea* L. al Nord (46). A Ivrea la Campanulacea *Phyteuma spicatum* L., consumata per tradizione, è stata confusa con una velenosa Solanacea (47). Da evitare inoltre piante potenzialmente tossiche: in *Borago officinalis* L., di uso comune, sono state riscontrate piccole quantità di alcaloidi epatocarcinogenici.

Sembra che sia possibile prevenire diversi tumori con la dieta e lo stile di vita. La famosa "Dieta Mediterranea" è stata studiata, tra l'altro, nel Cilento dal fisiologo Angel Keys che la utilizzò a lungo con sicuro beneficio. Egli infatti morì all'età di oltre 100 anni (16, 17). Inserita nella lista dei Beni Immateriali dell'Unesco (2010) la dieta mediterranea prevede il consumo di molta verdura, se possibile cruda, frutta di stagione, cereali integrali e legumi, pesce e carne in quantità inferiori a quelle dei cereali, latticini locali, olio d'oliva extra-vergine (ad azione

colagoga e lassativa, che contiene vitamina E, polifenoli e squalene, un antinfiammatorio ad azione antivirale). È una dieta semplice, variata, con pochi cibi in ogni pasto, come il tradizionale monopiatto pugliese “pasta e broccoletti”. Fornisce una maggior quantità di fibre, che legano le sostanze tossiche introdotte impedendone l’assorbimento, prevenendo stipsi, neoplasie intestinali, calcoli biliari, arteriosclerosi, obesità, varici, diabete e aumentano il senso di sazietà.

Frutta e verdura contengono vitamine fondamentali (A, C, E) e sostanze limitanti il livello di colesterolo nocivo (melanzane). Presentano una potenziale attività immunomodulante: aglio, cipolla, scalogno, legumi, carota, pomodoro, oltre alle Brassicaceae come cavoli, broccoli, broccoletti, rucola (glucosinolati), gli ultimi sconsigliati solo agli ipotiroidei (48). Di recente è stato evidenziato che la melagrana e il suo succo contengono antiossidanti atti a prevenire un tipo di tumore polmonare (49). Il consumo di cedro (*Citrus medica* L.) è associato a ridotta incidenza di tumori; l’attività antimicrobica ne conferma l’uso popolare come cibo preservante da proliferazioni batteriche (50, 51).

Conclusioni

Rilevata negli ultimi anni la sempre crescente diffusione di malattie iatrogene, cioè derivate da abuso di farmaci, si è volto nuovamente lo sguardo, da parte di alcuni ricercatori, ai medicinali fitoterapici e ad alcuni sani orientamenti dietetici della tradizione, basati su secoli di sperimentazione diretta da parte dell’uomo. Oltre alle classiche e nuove indagini fitochimiche e alle sperimentazioni farmacologiche, indizi dell’efficacia di una pianta potranno essere innanzitutto la composizione chimica della stessa e, a volte, la diffusione di una certa pratica o la constatazione di un beneficio riferito da chi ha sperimentato l’uso. In Italia sono molte le occasioni congressuali dove è stato confermato l’interesse del mondo scientifico verso le tematiche in oggetto. Alla luce dei dati presentati, si attendono ancora, dalla verifica scientifica dei saperi tradizionali attinti dal mondo vegetale, ulteriori indicazioni per la cura e la prevenzione di malattie, solo se sapremo conservare e valorizzare per le generazioni future questo prezioso patrimonio (52-54).

Bibliografia

1. Guarrera PM. *Il Patrimonio Etnobotanico del Lazio*. Assessorato alla Cultura Regione Lazio e Dipartimento Biologia Vegetale, Università La Sapienza. Roma: Tipar; 1994.
2. Guarrera PM. Traditional antihelmintic, antiparasitic and repellent uses of plants in Central Italy. *J Ethnopharmacol* 1999;68:183-92.
3. Guarrera PM. Traditional phytotherapy in Central Italy (Marche, Abruzzo, and Latium). *Fitoterapia* 2005;76(1):1-25.
4. Guarrera PM, Leporatti ML. Ethnobotanical remarks on Central and Southern Italy. *J Ethnobiol Ethnomedicine* 2007;3:23.
5. Guarrera PM, Salerno G, Caneva G. Folk phytotherapeutical plants from Maratea area (Basilicata, Italy). *J Ethnopharmacol* 2005;99:367-378.
6. Passalacqua NG, Guarrera PM, De Fine G. Contribution to the knowledge of the folk plant medicine in Calabria region (Southern Italy). *Fitoterapia* 2007;78:52-68.
7. Guarrera PM, Lucchese F, Medori S. Ethnophytotherapeutical research in the high Molise region (central-southern Italy). *J Ethnobiol Ethnomedicine* 2008;4:7.

8. Fortini P, Di Marzio P, Guarrera PM, Iorizzi M. Ethnobotanical study on the medicinal plants in the Mainarde Mountains (central-southern Apennine, Italy). *J Ethnopharmacol* 2016;184:208-18.
9. Savo V, Caneva G, Guarrera PM, Reedy D. Folk phytotherapy of the Amalfi Coast (Campania, Southern Italy). *J Ethnopharmacol* 2011;135:376-92.
10. Guarrera PM, Forti G, Marignoli S. Ethnobotanical and ethnomedicinal uses of plants in the district of Acquapendente (Latium, Central Italy). *J Ethnopharmacol* 2005;96:429-44.
11. Guarrera PM, Savo V, Caneva G. Traditional Uses of Plants in the Tolfa-Cerite-Manziate Area (Central Italy). *Ethnobiol Lett* 2015;6(1):119-61.
12. Guarrera PM. *Usi e tradizioni della Flora Italiana. Medicina Popolare ed Etnobotanica*, Roma: Aracne; 2006.
13. Gastaldo P. *Flora Officinale Italiana*. Padova: Piccin; 1987.
14. Caneva G, Pieroni A, Guarrera PM (Ed.). *Etnobotanica. Conservazione di un patrimonio culturale come risorsa per uno sviluppo sostenibile*. Centro Universitario Europeo per i Beni Culturali di Ravello, CROMAUniversità Roma Tre, Roma. Bari: Edipuglia; 2013.
15. Guarrera PM. Le piante nelle tradizioni popolari della Sardegna. *Erboristeria Domani* 2009;340:50-9.
16. Guarrera PM (Ed.). *Convegno scientifico Le piante e l'uomo, medicina integrata ed etnobotanica*. Atti; 7 marzo 2019; Roma. Roma: Museo delle Civiltà; 2020. Disponibile all'indirizzo: https://museociviltà.beniculturali.it/wp-content/uploads/catalogo_piante_e_uomo.pdf; ultima consultazione 18/02/2021.
17. Guarrera PM. *Le piante e l'uomo: scienza, riti, arte e tradizioni - per uno sviluppo sostenibile*. Catalogo della Mostra. Museo delle Civiltà-Museo Arti e Tradizioni Popolari, ICDe. Arcidosso: Effigi; 2018.
18. Geraci A. Complessità in natura e salute umana. In: Geraci A, Mondello F, Stringaro A (Ed.). *Atti Primo Convegno Nazionale Sostanze naturali*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2011. Rapporti ISTISAN 11/19. p. 151-4.
19. Cappelletti EM. *Ricerche etnofarmacobotaniche in alcune zone dell'Italia nord-orientale: specie vulnerarie*. Roma: Accademia Naz. Lincei, Rendiconti Classe Sci. fis., mat. e nat., 1979; (serie VIII; vol. LXVI). p. 6.577-86.
20. Coassini Lokar L, Poldini L. Herbal remedies in the traditional medicine of the Venezia Giulia region (North East Italy), *J Ethnopharmacol* 1988;22:231-78.
21. Atzei AD. *Le piante nella tradizione popolare della Sardegna*. Sassari: Delfino; 2003.
22. Uncini Manganelli RE, Tomei PE, Camangi F. et al. *L'uso delle erbe nella tradizione rurale della Toscana*. Vol. I-III. Firenze: Arsia-Regione Toscana, LCD; 2007.
23. Bruni A, Ballero M, Poli F. Quantitative ethnopharmacological study of the Campidano Valley and Urzulei district, Sardinia, Italy. *J Ethnopharmacol* 1997;57:97-124.
24. Tagarelli G, Tagarelli A, Piro A. Folk medicine used to heal malaria in Calabria (southern Italy). *J Ethnobiol Ethnomedicine* 2010;6:27.
25. Guarrera PM. Le terapie erboristiche. In: Seppilli T (Ed.), *Le tradizioni popolari in Italia. Medicine e magie*. Bergamo: Electa, 1989. p. 71-6.
26. Biagi M, Miraldi E, Giachetti D, Tsioutsiou EE, Governa P, Giordani P, Cornara L. *Sedum telephium* L.: from traditional use to pharmacological research. In: *Atti 111° Congresso SBI*. Roma, 21-23/9/2016. p. 99.
27. Lianza M, Mandrone M, Poli F, Sanna C, Farruggia G, Malucelli E, Iotti S, Cappadone C. Antitumor potential of plants from Sardinia (Italy), a hotspot for biodiversity in the Mediterranean basin. In: *Atti 113° Congresso SBI*. Fisciano (SA): Università di Salerno 12-15/9/2018. Poster 23.

28. Conforti F, Marrelli M, Statti G, Chiocchio I, Poli F. *Alimurgic Plants from Calabria (Italy): bioactive components and therapeutic potential in the treatment of inflammatory disorders and obesity*. Atti 113° Congresso SBI. Fisciano (SA): Università di Salerno 12-15/9/2018. Poster 43.
29. Viegi L, Pieroni A, Guarrera PM, Vangelisti R. A review of plants used in folk veterinary medicine in Italy as basis for a databank. *J Ethnopharmacol* 2003;8 (2-3):221-44.
30. Passalacqua NG, De Fine G, Guarrera PM. Contribution to the knowledge of the veterinary science and of the ethnobotany in Calabria region (Southern Italy). *J Ethnobiol Ethnomedicine* 2006;2:52.
31. Pieroni A, Giusti ME, de Pasquale C, Lenzarini C, Censorii E, Gonzáles-Tejero MR, Sánchez-Rojas CP, Ramiro-Gutiérrez JM, Skoula M, Johnson C, Sarpaki A, Della A, Paraskeva-Hadjichambi D, Hadjichambis A, Hmamouchi M, El-Jorhi S, El-Demerdash M, El-Zayat M, Al-Shahaby O, Houmani Z, Scherazed M. Circum-Mediterranean cultural heritage and medicinal plant uses in traditional animal healthcare: a field survey in eight selected areas within the RUBIA project. *J Ethnobiol Ethnomedicine* 2006;2:16.
32. Geraci A, Amato F, Bazan G, Schicchi R. Contribution to the knowledge of the traditional uses of native plants in Sicily. Atti 111° Congresso SBI. Roma, 21-23/9/2016. p. 102.
33. Mertenat D, Dal Cero M, Vogl CR, Ivemeyer S, Meier B, Maeschli A, Hamburger M, Walkenhorst M. Ethnoveterinary knowledge of farmers in bilingual regions of Switzerland, is there potential to extend veterinary options to reduce antimicrobial use? *J Ethnopharmacol* 2020;246:112184.
34. Nardelli GM. *Cultura e tradizione. Demomedicina nell'alta Umbria*. Provincia di Perugia; 1987.
35. Guarrera PM, Savo V. Wild food plants used in traditional vegetable mixtures in Italy. Review. *J Ethnopharmacol* 2016;185:202-34.
36. Picchi G, Pieroni A. *Atlante dei prodotti tipici*. Le Erbe. Roma: Insor, Agra ed. Rai Eri; 2005.
37. Guarrera PM, Food medicine and minor nourishment in the folk traditions of Central Italy (Marche, Abruzzo and Latium). *Fitoterapia* 2003;74:515-44.
38. Lentini F, Venza F. Wild food plants of popular use in Sicily. *J Ethnobiol Ethnomedicine* 2007;3:15.
39. Guarrera PM, Salerno G, Caneva G. Food, flavouring and feed plant traditions in the Tyrrhenian sector of Basilicata, Italy. *J Ethnobiol Ethnomedicine* 2006;2:37
40. Guarrera PM, Manzi A. Wild plants of organoleptic or nutritional interest and food traditions in central Italy: some interesting cases. *Plant Genet Resour* 2005;3(3): 22-5.
41. Maurizi A, De Michele A, Ranfa A, Ricci A, Roscini V, Coli R, Bodesmo M, Burini G. Bioactive compounds and antioxidant characterization of three edible wild plants traditionally consumed in the Umbria Region (Central Italy): *Bunias erucago* L. (corn rocket), *Lactuca perennis* L. (mountain lettuce) and *Papaver rhoeas* L. (poppy). *J Appl Bot Food Qual* 2015 88:109-14.
42. Ranfa A, Orlandi F, Maurizi A, Bodesmo M. Ethnobotanical knowledge and nutritional properties of two edible wild plants from Central Italy: *Tordylium apulum* L. and *Urospermum dalechampii* (L.) F.W. Schmid. *J Appl Bot Food Qual* 2015;88:249-254.
43. Savo V, Salomone F, Mattoni E, Tofani D, Caneva G. Traditional salads and soups with wild plants as a source of antioxidants: a comparative chemical analysis of five species growing in Central Italy. *Evid.-Based Complementary Altern. Med* 2019. (article ID 6782472).
44. Brigo B. *Fitoterapia e Gemmoterapia nella pratica clinica*. Boiron: Pioltello (MI); 1987.
45. Piterà Di Clima F, Nicoletti M. *Gemmoterapia. Fondamenti scientifici della moderna Meristemoterapia*. II ed. Palermo: Nuova Ipsa; 2018.
46. Cornara L, Smeriglio A, Frigerio J, Labra M, Di Gristina E, Denaro M, Mora E, Trombetta D. The problem of misidentification between edible and poisonous wild plants: Reports from the Mediterranean area. *Food Chem Toxicol* 2018;119:112-21.

47. Marengo A, Cagliero C, Acquadro S, Sgorbini B, Colombo ML, Rubiolo P. *Misidentification of wild plants cooked in soup and sold as a traditional gastronomy*. In: Atti 113° Congresso SBI. Fisciano (SA): Università di Salerno 12-15/9/2018. poster 25.
48. Donaldson MS. Nutrition and cancer: A review of the evidence for an anti-cancer diet. *Nutr J* 2004;3(1):19.
49. Grossmann ME, Mizuno NK, Schuster T, Cleary MP. Punicic acid is an-5 fatty acid capable of inhibiting breast cancer proliferation. *Int J Oncol* 2010;36:421- 6.
50. Li WQ, Kuriyama S, Li Q, Nagai M, Hozawa A, Nishino Y, Tsuji I. *J Cancer* 2010;127:1913-22.
51. De Martino L, Aliberti L, Caputo L, De Feo V, Nazzaro F, Souza LF. 2019. Chemical composition and biological activities of the essential oils of two different cultivars of *Citrus medica* L. In: *Atti 114° Congresso SBI*. Padova, 4-7/9/2019, p. 24.
52. Mariotti MG, Serafini M, Barberis GBI. Sezione Ligure Gruppo di Lavoro per le Piante Officinali. DIPTERIS, Università di Genova. Botanica Farmaceutica ed Etnobotanica: passato e futuro a confronto. Dedicato a Paolo Gastaldo. Atti. Genova, 9 -11/4/1999. *Inform Bot Ital* 1999;31(1-3),89-197.
53. Società Botanica Italiana. *Etnobotanica tra passato e futuro, quale risorsa per uno sviluppo sostenibile*. Giornata di studio. Milano: Società Botanica Italiana, 28 maggio 2014. Disponibile all'indirizzo: www.societabotanicaitaliana.it/contenuti/etnobotanica-tra-passato-e-futuro; ultima consultazione il 31/1/2021.
54. Accogli R, Turco A, Medagli P, Albano A, Santamaria P, De Bellis L. Valorization of horticultural crops in Salento (Apulia-Italy): the biodivero project. In: *Atti 111° Congr. SBI*. Roma, 21-23/9/2016. p.132.

ATTIVITÀ BIOLOGICHE DEL MIELE E PECULIARITÀ DEL MIELE DI CASTAGNO ETNEO

Edmondo Lissandrello (a, b), Virginia Fuochi (a)

(a) Sezione di Microbiologia del Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologiche dell'Università degli Studi di Catania

(b) Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, Sapienza Università di Roma

Introduzione

La definizione di miele, secondo la Direttiva Europea del 20 dicembre 2001, è la seguente: “Il miele è la sostanza dolce naturale che le api (*Apis mellifera*) producono dal nettare di piante o dalle secrezioni provenienti da parti vive di piante o dalle sostanze secrete da insetti succhiatori che si trovano su parti vive di piante che esse bottinano, trasformano combinandole con sostanze specifiche proprie, depositano, disidratano, immagazzinano e lasciano maturare nei favi dell'alveare” (1).

In base alle caratteristiche e alla composizione chimica del miele, è opportuno considerare questa sostanza alla stregua di un fitocomplesso di origine vegetale. In questo caso siamo in presenza di un insieme di componenti dotati di attività terapeutica evidente e conosciuta (principi attivi) e altri che integrano l'attività dei principi attivi (metaboliti secondari) attraverso una modulazione farmacologica. Vi è quindi un'azione di “collaborazione” sinergica tra i diversi componenti che costituiscono il fitocomplesso. Tra i requisiti biologici e organolettici del miele ricordiamo la presenza di *marker* quali-quantitativi, come idrossimetilfurfurale (HMF), che indica lo stato di denaturazione/conservazione del miele, l'acido chinurenico (*marker* biologico), la crisina (5,7-diidrossiflavone) e l'apigenina (5,7,4-triidrossiflavone) che è il riferimento alla origine botanica del polline veicolato dalle api.

Dalla tradizione agli studi moderni

Gli antichi egizi, assiri, cinesi, greci e romani usavano il miele, in combinazione con numerose erbe, per curare ferite cutanee e numerose malattie. Aristotele (350 a.C.) ne parla come di un balsamo per la cura di ferite e malattie degli occhi. Dioscoride (50 d.C.) discute in merito ai trattamenti con il miele per le scottature, le macchie sul viso, le ulcere “marce e vuote”, oltre che per l'infiammazione della gola e delle tonsille. In India, il miele di loto è considerato un ottimo rimedio per alcune patologie oculari. Nella medicina popolare del Ghana era già utilizzato per le ulcere agli arti inferiori, mentre in Nigeria per il mal d'orecchio e in Mali per il trattamento topico del morbillo e dell'ulcera gastrica. Ad oggi, esistono numerosi studi *in vitro* e *in vivo* e i campi di applicazione del miele sono molteplici: per il trattamento di ferite, gangrena di Fournier (o fascite necrotizzante), ferite da intervento chirurgico, ulcere e ustioni, rigenerazione dei tessuti, in caso di infiammazione con edema e essudazione (2).

Secondo alcuni ricercatori il miele può essere utilizzato efficacemente in ambito oftalmologico, infatti alcuni studi dimostrano remissione di blefariti e di congiuntiviti catarrali. Per di più, il suo uso si estende come alternativa al trattamento con unguento a base di vaselina e

sulfidina per il trattamento delle cheratiti post erpetiche e ancora per ustioni chimiche e termiche all'occhio e infezioni della cornea (3).

Composizione e attività biologiche di alcuni tipi di miele

In uno studio riguardante il miele di castagno presente nella zona etnea di Catania sono state riportate le composizioni medie di alcuni tipi di miele con la focalizzazione sulla frazione organica/minerale, così rappresentata da: 38% fruttosio, 31% glucosio, 2% altri zuccheri, 8% disaccaridi, 17% acqua, 4% sostanze diverse. Tale impostazione viene effettuata al fine di valutare possibili attività biologiche di un fitocomplesso ed eventualmente compararne gli effetti con altri già noti (4).

La composizione organica/minerale media del miele è solitamente costituita da una frazione in acidi organici, costituita da un contenuto polifenolico, titolabile in mg di catechina o acido gallico equivalente (GAE)/ 100 g di miele e acidi o esteri di acidi organici come il CAPE (estere fenil-etilico dell'acido caffeico) (Figura 1). La frazione proteica, prevede solitamente la presenza di difensina-1 ed enzimi (glucosio ossidasi/catalasi, catalasi, invertasi, diastasi). La frazione minerale comprende invece ioni di potassio, calcio, ferro, rame, zinco e manganese.

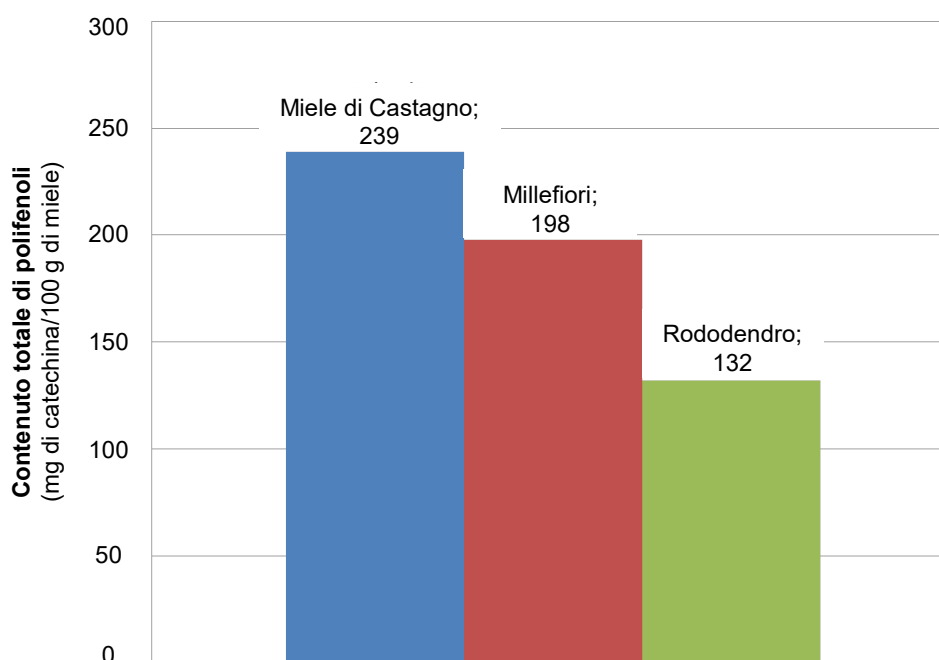


Figura 1. Contenuto di polifenoli su campioni di miele espresso in mg di catechina/100 g di miele

Nella composizione in acidi organici, si ritrova un equilibrio con lattoni ed esteri e ioni inorganici, quali fosfato e cloruro. Gli acidi totali sono rappresentati da un insieme di acido caffeico, citrico, gluconico, piruvico, malico, folico, lattico, succinico, butirrico, acetico, formico. In particolare, i componenti responsabili principalmente dell'acidità sono: acido gluconico, malico, piruvico, citrico.

L'estere fenil-etilico dell'acido caffeico (CAPE), possiede delle attività già note per cui è definito, tra l'altro, immuno-modulante, anti-infiammatorio, anti-ossidante, antibatterico, chemio-protettivo e cardio-protettivo. L'effetto anti-infiammatorio del CAPE, somministrato nelle dosi fino a 20 mg per kg per via orale per 14 giorni determina la modulazione del processo infiammatorio attraverso l'inibizione delle ciclo-ossigenasi (COX1 e COX2) da parte soprattutto della crisina che blocca COX-2 e la NO-sintetasi inducibile (5).

Questa azione anti-infiammatoria del CAPE porta a inibizione delle prostaglandine e delle citochine. Il CAPE inibisce la 5 α -lipo-ossigenasi, determinando un calo netto della produzione di prostaglandine e leucotrieni da parte dei macrofagi. Il CAPE inibisce abbastanza bene la via della lipo-ossigenasi nel metabolismo dell'acido arachidonico, durante l'infiammazione in vivo. In merito all'effetto immunomodulante, il CAPE porta ad aumento della risposta dei linfociti T in presenza di stimolo antigenico, per soppressione in modo dose-dipendente della sintesi di *DeoxyriboNucleic Acid* (DNA) indotta dalla fito-emagglutinazione dei polimorfonucleati periferici e dei linfociti T.

È stata messa in evidenza anche la soppressione delle citochine prodotte dai monociti/macrofagi, l'interleuchina-1 beta e interleuchina-12, dai linfociti Th1 (interleuchina-2) e dai Th2 (interleuchina-4) (9). Un altro meccanismo prevede l'inibizione del fattore di trascrizione nucleare (*nuclear factor* KB o fattore di trascrizione di numerosi geni pro-infiammatori NF-KB) e dell'espressione di monossido di azoto (NO): il CAPE è un potente e specifico inibitore dell'attivazione dell'NF-KB indotta dal fattore di necrosi tumorale alfa (*Tumor Necrosis Factor*, TNF-alfa). In particolare, inibisce la traslocazione della sub-unità p65 dell'NF-KB nel nucleo, per cui risultano numerose le attività anti-infiammatorie e immuno-modulanti. In merito invece all'effetto anti-ossidante e all'effetto *scavenging* dei radicali liberi, si nota una azione dose-dipendente, per inibizione significativa della attività della xantina-ossidasi e di quella anti-perossidasi. Le proteine presenti nel miele hanno un contenuto pari allo 0,5% del totale, ovvero 160-50 mg/100 g di prodotto. Nota di merito vale per la difensina-1 (peptide cationico) che permeabilizza selettivamente le membrane batteriche (6).

Attività antimicrobica del miele

L'attività antibatterica del miele è attribuibile ai seguenti fattori: acidità, osmolarità, perossido di idrogeno e molecole bioattive. Il pH del miele è sufficientemente basso per rallentare o prevenire la crescita di molte specie di batteri, ma questa acidità può essere neutralizzata se il miele viene diluito con le soluzioni tampone quali fluidi corporei. Circa l'osmolarità, l'alto contenuto di zuccheri nel miele, rende l'acqua disponibile per i microorganismi; più diluito è il miele, più specie sono in grado di crescere. Riguardo al perossido di idrogeno, si è visto che l'enzima glucosio-ossidasi, attivata dalla presenza di acqua nel miele, genera una quantità di perossido di idrogeno che risulta il principale fattore antibatterico del miele.

Alcuni tipi di miele contengono altri tipi di componenti con attività antibatterica, presumibilmente prodotti nelle infiorescenze dalle quali le api prelevano il nettare. Il miele di manuka (*Leptospermum scoparium*, arbusto che cresce in Nuova Zelanda e nell'Australia orientale), ad esempio, viene considerato come "archetipo" fra i mieli uniflorali ottenuti da melata, possedendo una composizione arricchita in minerali, proteine e acidi organici. Il miele di manuka è uno dei mieli curativi più utilizzati al mondo, perché la sua efficacia è documentata nel trattamento di infezioni causate anche da patogeni antibiotico-resistenti (7). Oltre al miele di manuka, il miele di castagno per la sua particolare composizione segue quello di manuka in termini di pregio biologico, come evidenziato da alcuni studi (4).

Valutazione dell'attività antimicrobica *in vitro*

Due campioni di miele di castagno etneo sono stati testati su 38 ceppi (8) per verificarne l'eventuale attività antimicrobica, in accordo con la letteratura riferita all'attività di altri mieli noti italiani e seguendo le linee guida internazionali del *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) (9, 10). L'attività antimicrobica dei campioni è stata valutata partendo da una soluzione madre, la *stock-solution* pari all'80% (v/v) in acqua.

Tabella 3. Attività antimicrobica valutata in Minima Concentrazione Inibente (MIC), del miele di castagno siciliano su isolati clinici o standard di riferimento (ATCC)

Microrganismo	Campione testato	MIC (% v/v)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Isolato clinico	5,0
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29211	10,0
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	10,0
<i>Escherichia coli</i>	Isolato clinico	20,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	10,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Isolato clinico	20,0
<i>Proteus mirabilis</i>	Isolato clinico	2,50
Staphylococcus spp.		
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 14990	2,50
<i>S. capitis</i>	Isolato clinico	5,0
<i>S. chromogenes</i>	Isolato clinico	2,50
<i>S. cohnii</i>	Isolato clinico	10,0
<i>S. haemolyticus 1</i>	Isolato clinico	2,50
<i>S. haemolyticus 2</i>	Isolato clinico	2,50
<i>S. haemolyticus 3</i>	Isolato clinico	2,50
<i>S. haemolyticus 4</i>	Isolato clinico	0,75
<i>S. haemolyticus 5</i>	Isolato clinico	1,25
<i>S. haemolyticus 6</i>	Isolato clinico	1,25
<i>S. haemolyticus 7</i>	Isolato clinico	2,50
<i>S. hominis 1</i>	Isolato clinico	2,50
<i>S. hominis 2</i>	Isolato clinico	2,50
<i>S. hominis 3</i>	Isolato clinico	2,50
<i>S. saprophyticus</i>	Isolato clinico	10,0
<i>S. xylosus</i>	Isolato clinico	5,0
Streptococcus spp.		
<i>S. agalactiae</i>	ATCC 13813	10,0
<i>S. pyogenes</i>	ATCC 19615	1,25
<i>S. parasanguinis</i>	ATCC 15912	10,0
<i>S. gordonii</i>	ATCC 10558	10,0
<i>S. mutans</i>	ATCC 25175	20,0
<i>S. sanguinis</i>	ATCC 10556	20,0
<i>S. anginosus</i>	ATCC 12395	20,0
<i>S. mitis</i>	ATCC 49456	20,0
<i>S. salivarius</i>	ATCC 7073	20,0
<i>S. oralis</i>	ATCC 35037	20,0
Candida spp.		
<i>C. albicans</i>	ATCC 10231	5,0
<i>C. albicans</i>	Isolato clinico	10,0
<i>C. albicans</i>	Isolato clinico	5,0
<i>C. albicans</i>	Isolato clinico	20,0
<i>C. albicans</i>	Isolato clinico	20,0

L'attività antimicrobica e le proprietà conservanti del miele sono da tempo conosciute, in particolare, quelle del miele di acacia, di manuka, di millefiori, mentre poco o nulla si conosce sul miele di castagno, e in particolare di quello etneo. Poiché la composizione del miele è fortemente influenzata dall'ambiente in cui esso viene prodotto si è voluta studiare l'attività antimicrobica di questa particolare produzione siciliana. A tal fine è stato utilizzato miele prodotto da due diverse aziende di Zafferana Etnea (CT). L'attività antimicrobica è stata studiata nei confronti di 5 ceppi fungini (*Candida albicans*), e 33 ceppi batterici: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, due stafilococchi coagulasi positivi (*Staphylococcus aureus*), 16 stafilococchi coagulasi negativi (*S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. xylosus*, *S. cohnii*), 10 streptococchi (*Streptococcus agalactiae*, *S. pyogenes*, *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. anginosus*, *S. mitis*, *S. gordonii*, *S. salivarius*, *S. parasanguinis*, *S. oralis*) (Tabella 3).

Per ciò che concerne l'attività antimicotica, le MIC sui ceppi di *Candida albicans* hanno mostrato valori maggiori o uguali al 5,0% (v/v).

Conclusioni

Per le già citate caratteristiche e come confermato da ricerche autorevoli, per le proprietà antibatteriche, nutraceutiche, anti-tussive e protettive dell'apparato gastroenterico, alcuni tipi di miele si prestano a far parte di alcune formulazioni già presenti in commercio quali cerotti, pomate, sciroppi, lassativi e nutraceutici, genericamente indicati come *med-honey*.

Per le prospettive future, sarebbe opportuno concentrarsi sulle proprietà curative nelle ferite e nelle ulcere cutanee. Si è visto infatti che nella guarigione delle ferite si ha un contributo nella riduzione delle interleuchine IL-1, IL-2, IL-12 e del TNF-alfa, un'azione che porta alla riduzione dell'edema, all'aumento della formazione di collagene, a una riduzione delle cicatrici cheloidee, a una positiva influenza nella dermatite allergica e nell'anafilassi (11). Le proprietà cicatrizzanti del miele sono ben consolidate ed è stato suggerito che, tra i suoi costituenti farmaco-attivi, l'acido chinurenico (KA) eserciti un'azione antinocicettiva sui tessuti danneggiati antagonizzando il recettore dell'N-metil-D-aspartato (o recettore NMDA) livello dei recettori dell'Acido γ -amminobutirrico (GABA) periferici (12, 13). Il miele quindi potrebbe essere considerato come componente di rimedi topici nell'ambito delle ferite chirurgiche (11). Una attività tipica del miele di castagno pare sia rappresentata dall'inibizione delle N-Acetil-omoserine-lattoni in alcuni ceppi batterici, attraverso la modulazione del cosiddetto *quorum sensing* (QS) implicato nella formazione di biofilm batterico (14). Il miele avrebbe anche delle ottime potenzialità nell'integrazione con le terapie chemioterapiche perché eserciterebbe una inibizione della carcinogenesi e della crescita tumorale in modelli animali (13). Esistono quindi delle prove sufficienti che raccomandano l'uso del miele nella gestione di condizioni patologiche, ma sono necessari ovviamente ulteriori studi per valutare e confermare i vari aspetti terapeutici del miele, probabilmente dovuti alle sue proprietà antimicrobiche, antinfiammatorie, apoptotiche e antiossidanti (2).

Bibliografia

1. Comunità Europea. Direttiva 2001/110/CE del Consiglio dell'Unione Europea del 20 dicembre 2001 concernente il miele. *Gazzetta Ufficiale Unione Europea L 10 del 12/1/2002*. pag. 47. Disponibile all'indirizzo: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:02001L0110-20140623&from=EN>; ultima consultazione 01/07/2021.

2. Samarghandian S, Farkhondeh T, Samini F. Honey and Health: A review of recent clinical research. *Pharmacognosy Res.* 2017;9(2):121-7.
3. Mozherenkov VP. Honey treatment of postherpetic opacities of the cornea. *Oftalmol Zh* 1984(3):188.
4. Kolaylı S, Aliyazıcıoğlu R, Ulusoy E, Karaoğlu S. Antioxidant and antimicrobial activities of selected turkish honeys. *Hacettepe J Biol & Chem* 2008;36(2):163-72.
5. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Alvarez JA Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J Food Sci* 2008;73(9):R117-24.
6. Gao B, Zhu S. An insect defensin-derived beta-hairpin peptide with enhanced antibacterial activity. *ACS Chem Biol* 2014;9(2):405-13.
7. Fidaleo M, Zuurro A, Lavecchia R. Antimicrobial activity of some italian honeys against pathogenic bacteria. *Chem Eng Transs* 2011;24:1015-20.
8. Lissandrello E. Attività antibatterica e antimicotica del miele di castagno etneo. In: *41° Congresso Società Italiana di Microbiologia*; Riccione, 2013. Disponibile all'indirizzo: https://www.researchgate.net/publication/284550408_Activita_antibatterica_e_antimicotica_del_miele_di_castagno_etneo; ultima consultazione 01/07/2021.
9. CLSI M100 S29 *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2019.
10. CLSI M60 *Performance standards for antifungal susceptibility testing of yeasts*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
11. Krajewski A, Garg M, Chandawarkar RY. Topical herbal remedies: research opportunities for plastic surgeons. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2010;63(6):896-905.
12. Beretta G, Artali R, Caneva E, Orlandini S, Centini M, Facino RM. Quinoline alkaloids in honey: further analytical (HPLC-DAD-ESI-MS, multidimensional diffusion-ordered NMR spectroscopy), theoretical and chemometric studies. *J Pharm Biomed Anal* 2009;50(3):432-9.
13. Uthurry CA, Hevia D, Gomez-Cordoves C. Role of honey polyphenols in health. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science* 2011;3(4):141-59.
14. Truchado P, Gil-Izquierdo A, Tomas-Barberan F, Allende A. Inhibition by chestnut honey of N-Acyl-L-homoserine lactones and biofilm formation in *Erwinia carotovora*, *Yersinia enterocolitica*, and *Aeromonas hydrophila*. *J Agric Food Chem* 2009;57(23):11186-93.

FUNZIONE NATURALE, MODIFICAZIONI STRUTTURALI E PROPRIETÀ FARMACOLOGICHE DEL CLIMACOSTOLO

Federico Buonanno, Claudio Ortenzi

Dipartimento di Scienze della Formazione, dei Beni Culturali e del Turismo,
Università degli Studi di Macerata, Macerata

Introduzione

Gli organismi acquatici vivono in ambienti eccezionalmente ricchi di specie in reciproca competizione e per questo motivo per sopravvivere e riprodursi hanno sviluppato un gran numero di strategie adattative che nei microbi unicellulari eucariotici (protisti) appaiono particolarmente ben rappresentati.

Ad esempio, i metaboliti secondari prodotti dai ciliati includono sostanze tossiche immagazzinate nel citoplasma cellulare o all'interno di organelli eiettabili (noti come estrusomi) che sono ancorati al *cortex* cellulare prima di essere eventualmente utilizzati nelle interazioni predatore-preda (1). Questi metaboliti secondari sono sintetizzati attraverso diverse vie biogenetiche e sono stati, spesso definiti sulla base dei nomi tassonomici dei loro organismi di origine (1).

Il climacostolo (5 - [(2Z) -non-2-en-1-yl] benzene-1,3-diolo) (Figura 1) è un metabolita secondario tossico fisiologicamente prodotto dal *Climacostomum virens*, protista ciliato di acqua dolce e utilizzato per la difesa chimica contro predatori unicellulari e multicellulari (2).

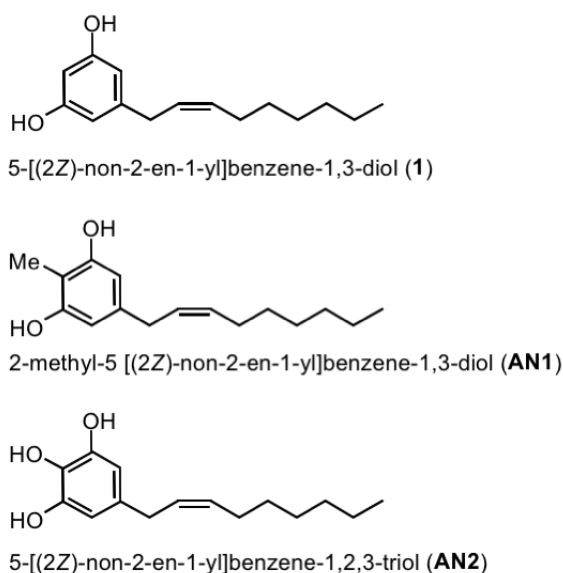


Figura 1. Formule di struttura del climacostolo (1) e dei due analoghi (AN1 e AN2)

Questa molecola è formata da uno scheletro fenolico e da una lunga catena idrocarburica alifatica insatura legata alla struttura ad anello, e appartiene alla classe dei lipidi resorcinolici (o alchenilresorcinoli), un gruppo di composti anfifilici naturali rilevati sia nei procarioti che negli eucarioti. I 5-alchenilresorcinoli hanno solitamente un doppio legame isolato nella porzione della catena della molecola, mentre gli esempi con un doppio legame coniugato con anello aromatico sono rari (3). Il climacostolo è stato anche sintetizzato chimicamente nella configurazione *Z* naturale e più bioattiva per mezzo di una sintesi semplice ed efficiente che ha permesso ai ricercatori di studiarne meglio gli effetti su diversi sistemi biologici (4).

Climacostolo come antimicrobico

Dopo aver studiato la citotossicità del climacostolo e alcuni suoi derivativi (ottenuti sostituendo il doppio legame con uno singolo o triplo in posizione C8) su altri protisti ciliati (5), le molecole sono state testate anche su alcuni batteri patogeni Gram-positivi e Gram-negativi e sul fungo *Candida albicans* (6). I risultati hanno mostrato la presenza di un'attività antimicrobica apprezzabile e comparabile dei tre composti, che erano efficaci contro batteri Gram-positivi e *C. albicans* con concentrazioni inibitorie minime (*Minimal Inhibitory Concentration*, MIC) e concentrazioni battericide minime (*Minimum Bactericidal Concentration*, MBC) comprese tra 8 e 32 mg L⁻¹. Al contrario, non è stata osservata alcuna tossicità significativa contro le specie Gram-negative (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) (6). Gli Autori hanno ipotizzato che questo effetto limitato osservato sulle specie Gram-negative possa essere spiegato dalla particolare struttura della parete cellulare batterica. La membrana esterna di questi batteri è infatti una barriera selettiva alla penetrazione di diversi composti, a causa della natura idrofila della superficie esposta all'ambiente e alla selettività delle proteine della membrana esterna. I risultati ottenuti suggeriscono che il tasso di saturazione della catena laterale del climacostolo non influisce sulla sua attività antimicrobica, pertanto è probabile che la struttura generale delle due frazioni di climacostolo, cioè il gruppo di-idrossifenile e le catene alcheniliche, contribuisca all'azione antibiotica nel suo complesso.

Climacostolo come antitumorale

Il climacostolo riduce la progressione del tumore tramite apoptosi dipendente da p53. Sulla base dell'attività antitumorale mostrata da un certo numero di altri lipidi resorcinolici, gli effetti del climacostolo sono stati studiati *in vitro* su alcune linee cellulari tumorali umane e di ratto (7).

In particolare, esperimenti condotti su cellule tumorali di carcinoma squamoso umano A431 e cellule leucemiche promielocitiche umane HL60 hanno dimostrato che il climacostolo esercita la sua azione inibendo la crescita cellulare e innescando un programma apoptotico dipendente dai mitocondri. Successivi *screening in vitro* e *in vivo* hanno confermato le precedenti osservazioni (3).

Per quanto riguarda il meccanismo d'azione del climacostolo, è stato dimostrato che esso può innescare l'apoptosi legandosi al *DeoxyriboNucleic Acid* (DNA) nucleare e mitocondriale e promuovendone la scissione successivamente alla generazione di specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) in presenza di Cu (II) (8). D'altro canto è noto che l'induzione di un danno a livello del DNA nucleare potrebbe essere efficace nel trattamento del cancro, e molti farmaci antitumorali attualmente impiegati, ad esempio alcuni composti del platino, funzionano per mezzo di questo meccanismo (9).

In effetti, recenti indagini sul meccanismo d'azione del climacostolo hanno permesso di osservare che la molecola riduce la vitalità/proliferazione delle cellule di melanoma, provocando un rapido danno al DNA, inducendo anche la via intrinseca apoptotica caratterizzata dalla dissipazione del potenziale della membrana mitocondriale, la traslocazione di Bax ai mitocondri, il rilascio del citocromo C dai mitocondri e l'attivazione della scissione della caspasi 3 dipendente dalla caspasi 9 (9, 10).

In ulteriori studi è stata ottenuta una persistente inibizione della crescita di allotrapianti di melanoma, nonché una riduzione del numero di cellule tumorali vitali e proliferanti, per mezzo di iniezioni intratumorali della tossina (10). È stata anche suggerita l'idea che il climacostolo possa indurre una diminuzione della microvascolarizzazione che contribuisce all'inibizione della crescita del melanoma (10).

È stato anche osservato un significativo miglioramento della sopravvivenza dei topi trapiantati, insieme a una diminuzione della massa tumorale e una riduzione del numero di cellule vitali all'interno del tumore (10). Apparentemente, la cascata di eventi innescati dal climacostolo che porta all'innescamento della morte cellulare programmata dipende dall'attivazione della proteina antitumorale 53 (p53) e dei suoi target pro-apoptotici Noxa e Puma.

Climacostolo come induttore dell'autofagia disfunzionale nelle cellule tumorali

In tutte le cellule eucariotiche, un ruolo fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi è svolto dall'autofagia, il processo altamente conservato che opera attraverso la degradazione di organelli citoplasmatici, proteine e macromolecole e il riciclaggio dei prodotti di degradazione. Poiché l'autofagia supporta la sopravvivenza cellulare o attiva le vie della morte programmata, può rappresentare un potenziale bersaglio per la libreria disponibile di sostanze antitumorali e per lo sviluppo di nuove molecole. Alcuni di noi hanno recentemente riferito di come il climacostolo interferisca con l'autofagia per mezzo dell'attivazione di meccanismi dipendenti dalla p53 (11).

In sostanza, i nostri dati hanno indicato che la tossina protozoaria altera in modo potente e selettivo l'autofagia, determinando un accumulo marcato e prolungato di autofagosomi nelle cellule tumorali che sono destinate a morire per apoptosi.

Degne di nota sono le indicazioni che suggeriscono che gli effetti del climacostolo sull'autofagia e l'apoptosi sono in realtà due eventi separati che possono agire indipendentemente sulle decisioni di sopravvivenza o morte della cellula.

Climacostolo come antivirale

Il nuovo scenario epidemiologico si è finora concentrato sulla circolazione nell'ambiente dei patogeni virali umani. A causa degli effetti collaterali dei disinfettanti chimici, c'è un bisogno crescente di conoscenze sull'uso dei composti virucidi, con particolare riguardo a quelli di origine naturale.

In aggiunta all'attività antibatterica del climacostolo è stata esplorata di recente anche la possibile attività antivirale. Per valutare questa attività, è stato scelto l'adenovirus umano (HAdV), conducendo esperimenti con il sierotipo 5 HAdV, il cui titolo è stato determinato infettando colture cellulari HeLa (12). I risultati ottenuti hanno confermato che HAdV5 è effettivamente sensibile al climacostolo a una concentrazione di 0,0002 mg/mL, con una

riduzione di circa 3 Log₁₀ quando il titolo iniziale di HAdV5 era approssimativamente del valore di 10⁴ e 10³ come *Median Tissue Culture Infectious Dose*, TCID₅₀/mL (12).

Questi risultati preliminari potrebbero essere un importante punto di partenza per ulteriori ricerche volte a migliorare la caratterizzazione dell'attività del climacostolo in differenti condizioni sperimentali e contro vari virus, compresi quelli con involucro (coronavirus). La produzione di climacostolo da parte di un protista che vive in acqua dolce potrebbe inoltre suggerire un possibile utilizzo del protozoo nei fanghi attivi degli impianti di depurazione.

Analoghi sintetici del climacostolo

I risultati degli studi effettuati sull'attività biologica del climacostolo, uniti alla conoscenza delle proprietà strutturali di altri lipidi resorcinolici, ci hanno consentito di progettare e sintetizzare nuovi analoghi della tossina protozoaria per far luce sulle basi chimiche del suo meccanismo di azione. I due analoghi sintetizzati, metil-5 [(2Z)-non-2-en-1-il] benzene-1,3-diolo (AN1) e 5-[(2Z)-non-2-en-1-il] benzene-1,2,3-triolo (AN2), che si differenziano rispettivamente dal climacostolo per un gruppo metile aggiuntivo e per un ulteriore gruppo idrossile nell'anello aromatico, sono stati analizzati per la loro attività biologica (13).

La scelta di introdurre i nuovi gruppi chimici nell'anello aromatico del climacostolo è stata suggerita dall'osservazione che modifiche simili eseguite su alcuni polifenoli e lipidi fenolici ha determinato un significativo miglioramento della loro attività citotossica e antimicrobica. Gli effetti di AN1 e AN2 sono stati studiati su cellule di mammifero, microbi patogeni e protisti ciliati a vita libera, con lo scopo principale di identificare i tratti strutturali del climacostolo principalmente coinvolti nella sua attività citotossica.

Attività antitumorale

Le caratteristiche proapoptotiche di AN1 e AN2 su linee cellulari immortalizzate di origine tumorale (B16-F10, GL261, SK-N-BE e CT26) e non tumorale (C2C12) è stata analizzata e confrontata con quella del climacostolo. I risultati hanno indicato che la sopravvivenza cellulare è stata influenzata negativamente dai due analoghi con una efficacia comparabile a quella del climacostolo (13). Inoltre, come nel caso di varie cellule tumorali esposte al climacostolo (3, 9, 10), le tecniche di immunocolorazione hanno rivelato che le cellule di melanoma B16-F10 esprimevano alti livelli di caspasi 3 attiva dopo il trattamento con AN1 e AN2, dimostrando così l'attivazione di una via apoptotica indotta da entrambi gli analoghi (13).

Attività antimicrobica

AN1 e AN2 sono stati studiati anche con esperimenti dose-risposta eseguiti per confrontare il loro potenziale citotossico contro un pannello di microrganismi comprendente patogeni batterici e fungini e protozoi ciliati d'acqua dolce. I dati raccolti hanno confermato che sia AN1 che AN2 mostrano un'apprezzabile citotossicità su tutti i microrganismi esposti a diverse concentrazioni dei due analoghi, a eccezione di *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* che si sono dimostrati immuni alle tossine (13). AN1 è risultato il composto più tossico contro agenti patogeni e protozoi ciliati, mentre gli effetti di AN2 sono risultati paragonabili o peggiori di quelli ottenuti col climacostolo. In particolare, AN1 ha mostrato valori MIC e MBC di 8 g/mL contro *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, e un valore di 4 g/mL contro *Candida albicans* (13). Per quanto riguarda il meccanismo d'azione delle tossine sintetiche, la loro citotossicità su

alcune specie di ciliati è apparsa mediata da un processo necrotico, lo stesso descritto per il climacostolo sui protozoi a vita libera (2, 3, 5). Un'eccezione è stata rappresentata dall'analogo AN2 che si è dimostrato capace di attivare morte cellulare programmata nel ciliato *Euplotes aediculatus*. Infatti, il test di fluorescenza TUNEL (*Nick-End Labelling*) effettuato su campioni di *Euplotes* esposti ad AN2 ha rivelato la sequenza tipica di eventi associati all'apoptosi canonica (13).

Per riassumere, mentre effetti simili sono stati sostanzialmente osservati per il climacostolo e suoi analoghi su cellule di mammifero, il gruppo metilico di AN1 si è rivelato fondamentale per potenziarne l'attività contro patogeni batterici, fungini e contro i protisti. Nel caso di AN2, il gruppo idrossile aggiunto al climacostolo sembra essere il tratto strutturale fondamentale che ha trasformato la tossina protozoaria in un composto capace di indurre l'apoptosi negli eucarioti unicellulari. I risultati complessivi ottenuti con AN1 e AN2 supportano così ulteriori futuri tentativi di progettare e sintetizzare nuovi analoghi del climacostolo che possano aumentarne o ottimizzarne le proprietà farmacologiche.

Conclusioni

Le sostanze naturali possiedono un'enorme diversità strutturale e funzionale che non ha rivali in eventuali librerie sintetiche. In particolare, le piccole molecole organiche naturali hanno mostrato un grande potenziale di attività (1, 3) poiché gli organismi viventi hanno una spiccata capacità di sintetizzare una ricca varietà di strutture molecolari complesse con proprietà biologiche definite.

Il climacostolo è un tipico esempio di queste piccole molecole, tuttavia, la possibilità di purificare questo composto naturale direttamente da colture cellulari è in realtà limitata a quantità molto piccole. Per risolvere questo problema, molti sforzi sono stati diretti verso la preparazione del climacostolo sintetico e di alcuni suoi analoghi, attraverso strategie in grado di realizzare quantità apprezzabili dei composti di interesse in modo economico e rapido.

In conclusione, sembra che gli analoghi sintetici di piccole molecole organiche di origine naturale che presentino potenza e selettività ottimali possano effettivamente giocare un ruolo fondamentale nella comprensione del meccanismo biochimico alla base del loro effetto a livello cellulare e nella valutazione di eventuali effetti terapeutici.

In questo panorama, il climacostolo sembra essere un promettente composto di partenza per l'ulteriore sviluppo di approcci chimici sintetici e indagini biotecnologiche, che possa in definitiva meritare anche attenzione da parte dei farmacologi.

Bibliografia

1. Buonanno F, Ortenzi C. Predator-prey interactions in ciliated protists. In: *Extremophilic Microbes and Metabolites diversity, bioprospecting and biotechnological applications*. 1st ed. London: InTechOpen; 2018.
2. Miyake A, Buonanno F, Saltalamacchia P, Masaki ME, Iio H. Chemical defence by means of extrusive cortical granules in the heterotrich ciliate *Climacostomum virens*. *Eur J Protistol* 2003;39:25-36.
3. Buonanno F, Catalani E, Cervia D, Cimarelli C, Marcantoni E, Ortenzi C. Natural function and structural modification of climacostol, a ciliate secondary metabolite. *Microorganisms* 2020;8(6):809.
4. Fiorini D, Giuli S, Marcantoni E, Quassinti L, Bramucci M, Amantini C, Santoni G, Buonanno F, Ortenzi C. A Straightforward diastereoselective synthesis and evaluation of climacostol, a natural product with anticancer activities. *Synthesis* 2010;9:1550-6.

5. Buonanno F, Ortenzi C. The protozoan toxin climacostol and its derivatives: Cytotoxicity studies on 10 species of free-living ciliates. *Biologia* 2010;65:675-80.
6. Petrelli D, Buonanno F, Vitali LA, Ortenzi C. Antimicrobial activity of the protozoan toxin climacostol and its derivatives. *Biologia* 2012;67:525-9.
7. Buonanno F, Quassinti L, Bramucci M, Amantini C, Lucciarini R, Santoni G, Iio H, Ortenzi C. The protozoan toxin climacostol inhibits growth and induces apoptosis of human tumor cell lines. *Chem Biol Interact* 2008;176:151-64.
8. Quassinti L, Ortenzi F, Marcantoni E, Ricciutelli M, Lupidi G, Ortenzi C, Buonanno F, Bramucci M. DNA binding and oxidative DNA damage induced by climacostol-copper(II) complexes: Implications for anticancer properties. *Chem Biol Interact* 2013;206:109-16.
9. Catalani E, Proietti Serafini F, Zecchini S, Picchiatti S, Fausto AM, Marcantoni E, Buonanno F, Ortenzi C, Perrotta C, Cervia D. Natural products from aquatic eukaryotic microorganisms for cancer therapy: Perspectives on anti-tumour properties of ciliate bioactive molecules. *Pharmacol Res* 2016;113:409-20.
10. Perrotta C, Buonanno F, Zecchini S, Giavazzi A, Proietti Serafini F, Catalani E, Guerra L, Belardinelli MC, Picchiatti S, Fausto AM, Giorgi S, Marcantoni E, Clementi E, Ortenzi C, Cervia D. Climacostol reduces tumour progression in a mouse model of melanoma via the p53-dependent intrinsic apoptotic programme. *Sci Rep* 2016;6:27281.
11. Zecchini S, Proietti Serafini F, Catalani E, Giovarelli M, Cozzoli M, Di Renzo I., De Palma C, Perrotta C, Clementi E, Buonanno F, Ortenzi C, Marcantoni E, Taddei AR, Picchiatti S, Fausto AM, Cervia D. Dysfunctional autophagy induced by the pro-apoptotic natural compound climacostol in tumour cells. *Cell Death Dis* 2019;10:10.
12. Verani M, Di Giuseppe G, Federigi I, Buonanno F, Ortenzi C, Carducci A. Preliminary data related to the effect of climacostol produced by the freshwater ciliate *Climacostomum virens* on human adenovirus. *Viruses* 2020;12:658.
13. Buonanno F, Catalani E, Cervia D, Proietti Serafini F, Picchiatti S, Fausto AM, Giorgi S, Lupidi G, Rossi FV, Marcantoni E, Petrelli D, Ortenzi C. Bioactivity and structural properties of novel synthetic analogues of the protozoan toxin climacostol. *Toxins* 2019;11:42.

MEDICAMENTO AVANZATO A BASE DI NEEM E IPERICO: DALL'IDEA AL MERCATO, DAGLI EFFETTI AI MECCANISMI D'AZIONE

Fiorella Carnevali, Stephen Andrew van der Esch

Dipartimento Sostenibilità dei Sistemi Produttivi e Territoriali, Centro Ricerche Casaccia ENEA, Roma

Introduzione

L'uso medicinale di prodotti naturali – composti derivati da fonti naturali come piante, animali o microrganismi – precede la storia umana conosciuta probabilmente di migliaia di anni.

Durante la nostra evoluzione, l'importanza dei prodotti naturali per la medicina e la salute è stata enorme. Da quando i nostri primi antenati masticavano certe erbe per alleviare il dolore o avvolgevano le foglie attorno alle ferite per migliorarne la guarigione, i prodotti naturali sono stati spesso l'unico mezzo curativo a disposizione per malattie e lesioni. È solo dall'inizio del secolo scorso, ricordiamo l'acido acetilsalicilico (1899) e, più in particolare negli ultimi decenni (dagli anni '80 in poi del secolo scorso), che i prodotti naturali hanno assunto un ruolo secondario nella scoperta e nello sviluppo di farmaci, dopo che l'avvento della biologia molecolare e della chimica combinatoria ha reso possibile la progettazione razionale di composti chimici per mirare a molecole specifiche. Gli ultimi anni, tuttavia, hanno visto un rinnovato interesse per l'uso di composti naturali e, cosa più importante, il loro ruolo come base per lo sviluppo di farmaci. I moderni strumenti della chimica e della biologia, in particolare le varie tecnologie “-omiche”, ora consentono agli scienziati di dettagliare l'esatta natura degli effetti biologici dei composti naturali sul corpo umano, nonché di scoprire possibili sinergie.

Comunque, dagli anni Ottanta fino al 2019 ancora il 4,6% dei medicinali di nuova registrazione sono d'origine naturale (di cui 0,8% di origine botanica) e il 18,9% sono derivati da un prodotto naturale essendo di solito una modifica semisintetica (1). Newman e Cragg, infatti, nel 2013, affermavano che, nell'area del trattamento del cancro, è stato dimostrato che circa il 75% delle medicine disponibili è derivato o ispirato da piante (2). Un'altra categoria importante (18,9%) di nuovi medicinali registrati sono i “biologici” (*biological*) di solito costituiti da un grande (> 50 residui) peptide o proteina isolata da un organismo/linea cellulare o prodotto con mezzi biotecnologici in un ospite surrogato, ad esempio gli anticorpi monoclonali.

Qui presentiamo l'esperienza più che decennale dello sviluppo di un dispositivo medico di Classe IIb interamente costituito da una miscela di sostanze naturali ottenuti da due piante: il Neem e l'Iperico.

Breve storia del brevetto ENEA

Agli inizi degli anni 2000 all'ENEA (Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo economico sostenibile) è stato sviluppato un “dispositivo medico” a base di estratti vegetali di Neem, *Azadirachta indica* (A. Juss.) e Iperico, *Hypericum perforatum* (L.) efficace per la terapia delle lesioni esterne, di qualunque estensione e natura, acute e croniche, utilizzabile in medicina umana e veterinaria. L'utilizzo dell'invenzione ha mostrato un evidente vantaggio

terapeutico, in confronto alle terapie convenzionali, che si associa a un abbattimento dei tempi di risoluzione del danno e delle sue eventuali recidive, a una sensibile e auspicata riduzione dell'uso di antibiotici sistemici e locali e a una rapida e persistente scomparsa del dolore spontaneo dalla lesione o indotto dalla sua medicazione.

Il 27 novembre 2007 il brevetto "Composizione fitoterapica con proprietà cicatrizzanti, repellenti e biocida per la risoluzione delle lesioni esterne", ha ottenuto la concessione europea e il 26 marzo 2008 con il n. 48211 BE 2008 ha concluso la fase nazionale.

Sostanze presenti nel medicamento preparato di Neem e Iperico

Le due piante scelte, Neem (3, 4) e Iperico (5, 6), sono entrambe già molto conosciute nella medicina tradizionale delle due aree geografiche in cui hanno origine, cioè India e Birmania per il Neem e l'Europa per l'Iperico. Entrambi sono stati oggetto di studi approfonditi negli ultimi 50 anni dello scorso secolo. È da notare che le proprietà cicatrizzanti di entrambe le piante non vengono quasi mai menzionate nella letteratura scientifica del secolo scorso. Solo dopo la prima decade di questo secolo comincia ad apparire qualche sparuta referenza verso questa funzionalità, mentre il brevetto ENEA, che è antecedente, ne ha dimostrata per primo la validità nel 2004.

La miscela di olio di Neem e oleolito di Iperico (chiamata MIX557 prima della commercializzazione) contiene moltissime sostanze naturali derivanti da entrambi le piante.

Olio di Neem

La composizione chimica dell'olio di Neem è molto complessa e ricca di terpenoidi, limonoidi e composti solforati volatili (7). Finora sono stati isolati più di 300 composti da varie parti di *Azadirachta indica* (8). Tuttavia, è stato determinato che nell'olio di Neem da solo, più di 100 composti biologicamente attivi sono presenti (9 e referenze contenute, 10). I costituenti chimici più importanti per le loro attività biologiche sono:

- a) acidi grassi composti principalmente da acido oleico (50-60%), acido palmitico (13-15%), acido stearico (14-19%), acido linoleico (8-16%) e acido arachico (1-3%). L'acido oleico, l'acido linoleico e l'acido α -linoleico sono i principali acidi grassi ω -9, ω -6 e ω -3 presenti in olio di neem;
- b) limonoidi: azadiractina (azadiractina A), salannina, salannol, nimbina, nimbinina, nimbidina, nimbiolo, nimolicinolo, gedunina, 3-tigloilazadirachtol (azadiractina B), epossiazadiradione, 17 β -idrossiazadiradione, 1-tigloil-3-acetil-11-idrossimeliacarpina (azadiractina D), 1 α , 2 α -epossi-17 β -idrossiazadiradione, 1 α , 2 α -epossinimolicinolo e 7-deacetilnimolicinolo;
- c) polifenoli più abbondanti sono l'acido benzoico e l'acido t-cinnamico, un altro fenolo rilevato è 3-OH-4-MeO-benzaldeide. È interessante notare che è stato anche trovato una quantità discreta di naringenina (11).

Tutti questi metaboliti vegetali sono ben noti per le loro efficaci proprietà biologiche contro insetti e parassiti; tra questi, le azadiractine (0,3-0,6%) sono i componenti più attivi dell'olio di Neem. Oltre alle attività anti-insetticida l'olio di Neem e i suoi componenti attivi hanno mostrato diverse attività farmacologiche, comprese attività antinfiammatorie, antiartriche, antipiretiche, ipoglicemiche, diuretiche, spermicide, antimicotiche, antibatteriche, antigastriche, antivirali e antipsoriasi (12).

I maggiori studi effettuati sulle sostanze presenti nel Neem per uso medico hanno riguardato soprattutto le neoplasie e gli effetti immunostimolanti (13).

Oleolito di Iperico

È noto che l'oleolito d'Iperico tradizionale non contiene ipericina, ma il caratteristico colore rosso e la fluorescenza possono essere attribuiti a costituenti lipofili derivati dalla degradazione dell'ipericina dovuta a esposizione alla luce solare (14).

La caratteristica presenza dei derivati acilfloroglucinosi policiclici poliprenilati, ovvero iperforina (HPF) e gli analoghi (adiperforina) (15, 16) sono invece legati all'azione terapeutica dell'olio, mentre altri due floriglucinosi, vale a dire furoiperforina e ossiperforina, sono considerati metaboliti inattivi dell'iperforina. Anche I3, II8-bBiapigenina [flavonoidi (polifenoli)] è presente nell'oleolito di Iperico.

Possibili meccanismi d'azione

Il razionale clinico per il trattamento delle ferite con prodotti topici derivati dall'Iperico risulta dalle sue attività antimicrobiche e antinfiammatorie e da stimolazione della motilità dei fibroblasti, produzione di collagene e differenziazione dei cheratinociti. Oli e altre formulazioni contenenti iperforina e ipericina o loro derivati sono appropriati per applicazione su graffi, abrasioni, ustioni e ulcere (17).

Nell'articolo di Novelli *et al.* (18) un *excursus* ampio viene fatto sia a livello *in vitro* che *in vivo* sugli effetti delle diverse sostanze presenti in Iperico. Uno dei principali meccanismi dell'azione antinfiammatoria dell'iperforina si basa sul potente e simultaneo blocco delle vie di segnalazione intracellulari provocate dal legame di varie citochine ai loro recettori con un conseguente inibizione sull'attività trascrizionale del *signal transducer and activator of transcription* (STAT) e il *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF-κB) sui geni bersaglio.

Anche per l'olio di Neem esistono prove sempre più numerose degli effetti antitumorali dei limonoidi che sono mediati attraverso l'inibizione delle distintive capacità del cancro come la (i) proliferazione cellulare, (ii) l'evasione dell'apoptosi, (iii) l'infiammazione, (iv) l'invasione e (v) l'angiogenesi. È stato dimostrato che i limonoidi del Neem colpiscono le chinasi di segnalazione oncogeniche e i fattori di trascrizione principalmente, NF-κB, Wnt/β-catenina, PI3K/Akt, MAPK e JAK/STAT (13). È da ricordare che spesso i tumori vengono descritti come "ferite che non guariscono" (*wounds that don't heal*) (19).

Esperienze cliniche

Utilizzo del medicamento in medicina veterinaria

Il dispositivo medico sviluppato dai ricercatori ENEA (MIX557) per favorire la cicatrizzazione fu inizialmente utilizzato in campo veterinario su ferite acute che potevano solo guarire per "seconda intenzione" e che, nel periodo estivo, erano anche infestate da larve di ditteri.

Negli anni iniziali dell'esperienza clinica veterinaria la diversità di animali trattati (cani, gatti, pecore, capre, asini, cavalli, alpaca, mucche, maiali) è stata variegata ed estesa. Anche la natura delle ferite era molto varia (traumatiche, da morso, abrasioni, cheloidi, piodermiti ecc.) sia nelle

dimensioni che nel livello di complicazioni (infette, ascessi, flemmoni, infestate da miasi, lacere e/o da morso, necrotiche, ecc.).

Diverse pubblicazioni/tesi di laurea sono state prodotte grazie all'esperienza clinica accumulata negli anni iniziali e che, successivamente, hanno poi giustificato il repentino utilizzo dello stesso medicamento in medicina umana. Le pubblicazioni che trattano i diversi aspetti clinici in veterinaria sono elencate nella Tabella 1.

Tabella 1. Riferimenti bibliografici riguardanti l'esperienza di MIX557 in medicina veterinaria (periodo 2013-2018)

Riferimento bibliografico	Animali	Tipologia di ferite	Tipo di pubblicazione
20	Pecore; mucche; capre	Miasi	Articolo
21	Cavalli	Cheloidi	Articolo
22	Gatti	Ferite	Atti di Congresso
23	Tartarughe	Ferite di testa	Articolo
24	Pecore	Modello sperimentale di ferite acute	Libro
24	Cane	Piodermiti	Libro
24	Cane	Ferite Traumatiche	Libro

L'esperienza in veterinaria in regime di compassione, su ferite accidentali, e le pubblicazioni fatti dagli autori e da altri (Tabella 1) hanno dimostrato, dal punto di vista clinico, che si era veramente in presenza di un cicatrizzante che favoriva il decorso della guarigione delle ferite in tutte le sue fasi canoniche: (i) infiammatoria, (ii) proliferativa e (iii) di epitelizzazione e maturazione, potenziato inoltre da proprietà antimicrobiche/antibatteriche e biocida/repellenti verso ditteri miasigeni.

Effetto cicatrizzante

Il medicamento agisce su tutte le fasi del processo di guarigione delle ferite. Uno studio su modello animale (ovino), che ha messo a confronto le capacità cicatrizzanti del MIX557 (50-50% Olio di Neem/Oleolito di Iperico) rispetto alle componenti separate (100%) e rispetto al controllo (NaOCl 0,05%, Amuchina), ha dimostrato di essere in grado di regolare finemente, dall'inizio alla fine, tutti i processi fisiologici della riparazione tissutale. La regolazione non è altrettanto fine e ben regolata quando si utilizzano le componenti del brevetto separatamente (risultato già noto nelle diverse medicine tradizionali occidentale e orientale) o nel gruppo di controllo trattato con antimicrobico. Il medicamento ha dimostrato nella maggior parte dei parametri indagati (sia cellulari che fattori di crescita) una sinergia tra le componenti con effetti sempre migliori delle componenti separate e nettamente migliori del controllo (24).

Effetto antibatterico

Il medicamento ha dimostrato, prima in campo veterinario, ma poi di seguito anche in campo umano, che nel trattamento di qualunque lesione esterna, gli antibiotici non sono necessari specie se si inizia la terapia subito dopo il trauma. Se si interviene su ferite già infette, la risoluzione dell'infezione è immediata e solo nei casi più gravi si rende necessario somministrare antibiotici per la prima settimana di trattamento.

Il potente effetto antimicrobico osservato nel trattamento delle ferite, si è replicato nel trattamento delle piodermiti del cane. Le piodermiti sono la prima causa di malattia in questa specie e seconda solo alle allergie da pulci nei Paesi a clima temperato. E sono anche la patologia

a più alta insorgenza di resistenza batterica essendo il protocollo terapeutico convenzionalmente utilizzato, rappresentato da somministrazioni sistemiche e locali di trattamenti antibiotici prolungati per settimane, anche più di sei, oltre la scomparsa dei sintomi locali (che in genere superano i 60 giorni). Il trattamento con il medicamento ha dimostrato invece di poter risolvere questa patologia in tempi molto più contenuti (entro i 40 giorni nei casi molto avanzati e solo un paio di settimane in quelli iniziali mai trattati con antibiotici) senza necessità di utilizzare gli antibiotici, consentendo una reale ed efficace riduzione dell'antimicrobico-resistenza e l'applicazione del principio di uso prudente degli antibiotici raccomandato dalle linee guida comunitarie e ministeriali (20, 24).

Effetto biocida/repellente

Il medicamento presenta al contempo, proprietà repellenti che impediscono ai ditteri miasigeni di depositare le larve carnivore sulle ferite, della durata di 24 ore (20) e di impedire la crescita di quelle residenti, consentendo una gestione delle lesioni nei periodi estivi senza uso di prodotti chimici tossici, tradizionalmente ed erroneamente utilizzati, come la creolina o i *chemicals* non consentiti nell'allevamento biologico come l'ivermectina, risolvendo, senza effetti collaterali, una problematica molto diffusa (le miasi delle lesioni nei periodi estivi delle specie domestiche)

Effetto particolare sui cheloidi

Il medicamento ha dimostrato di avere proprietà specificamente terapeutiche nei confronti della reazione cheloidea nel cavallo, patologia di iperproliferazione della fase di granulazione che comporta grave ritardo, fino all'arresto del processo cicatriziale, con esito finale caratterizzato da cicatrici deturpanti e invalidanti. Una ferita nelle parti distali dei cavalli può comportare l'esclusione dell'animale dalle normali attività per le gravi complicazioni che il cheloide generalmente comporta. Il medicamento si è dimostrato capace di controllare e risolvere tale patologia senza uso di immunosoppressori (cortisonici), causticanti (acido salicilico) comunemente utilizzati, ma che sono sempre accompagnati da gravi e noti effetti collaterali, e senza ricorrere alla resezione chirurgica (protocollo consigliato) che, però, per l'enorme emorragia che comporta, è di difficile applicazione in campo anche da parte di veterinari esperti. Il meccanismo di azione di regressione del cheloide del medicamento è legato alla fine capacità immunomodulatoria della combinazione di Neem e Iperico che consente l'induzione di apoptosi a livello dei fibroblasti del tessuto di granulazione che, nel cavallo, non rispondono al segnale di arresto della proliferazione. Attualmente, è l'unico rimedio esistente sul mercato capace di controllare il cheloide equino senza nessun effetto collaterale, se non la necessità di medicare le ferite quotidianamente, avendo cura di tenerle sotto bendaggio protettivo (21).

Il medicamento si è rivelato, infine, assolutamente innocuo anche nella specie felina (gatti) sulla quale esistevano dubbi di applicabilità a seguito della presenza di derivati del neem che sembrava fossero tossici in questa specie. Il nostro lavoro ha inequivocabilmente dimostrato che il medicamento pur essendo composto dal 50% di olio di neem, non comporta nessuna delle reazioni avverse che erano state segnalate nella utilizzazione del neem come antiparassitario nel gatto (crisi convulsive, tremori e anche morte) (22). Inoltre, anche sulle tartarughe (*Caretta caretta*) si ottengono ottimi risultati senza la necessità di dover utilizzare antibiotici (23).

È stato dunque dimostrato con l'esperienza clinica qui sopra descritta che il MIX557 utilizzato quotidianamente sulle ferite di qualunque estensione e natura ha proprietà cicatrizzanti che permettono di gestire le lesioni esterne senza complicazioni batteriche, in qualunque stadio del processo s'interviene rendendo quasi inutile l'uso di terapie antibiotiche sistemiche e/o locali. Questa peculiarità è d'importanza strategica data l'enorme crescita della resistenza batterica agli antibiotici (sia in umano che in animale) il cui uso errato e abuso in situazioni in cui non sono

necessari, sono le cause principali. Anche l'effetto repellente verso i ditteri miasigeni non è un effetto trascurabile quando si lavora in campo veterinario.

Utilizzo del medicamento in medicina umana

Il lavoro iniziale dei ricercatori ENEA in campo veterinario, insieme a diversi gruppi Universitari, ha indotto le compagnie che stavano sviluppando i prodotti da commercializzare a ricercare collaborazioni con medici per testare l'utilizzo del MIX557 in umano. Questi studi sono stati pubblicati (Tabella 2) e riguardano sia ferite acute che croniche.

Tabella 2. Riferimenti bibliografici riguardanti l'esperienza di MIX557 in medicina umana (periodo 2013-2018)

Riferimento bibliografico	Ferita	Tipologia di ferite	Tipo di pubblicazione
24	Acuta/Cronica	Decubito ecc.	Libro
25	Acuta/Cronica	Decubito ecc.	Articolo
26	Acuta/Cronica	Ferite di testa/Decubito	Articolo
27, 28	Acuta	Post-chirurgico	Articolo
29	Acuta	Ustione	Articolo
30, 31	Acuta	Piede diabetico	Articolo
32, 33	Acuta	Radio-dermite	Articolo
34	Acuta	<i>Sinus</i> pilonidale	Articolo
35	Acuta/Cronica	Condilomi anali	Articolo
36	Acuta/Cronica	Dermatite granulomatosa periorale	Articolo
37	Cronica	Ulcere cutanee correlazione alla calcinosi nella clerosi sistemica	Articolo

Tutti i dati di questo studio osservazionale (tra il 2013 e il 2018) inerenti agli effetti *in vivo* e *in vitro* e su modelli animali, oltre a tutta l'esperienza clinica svolta in collaborazione con un Centro Traumatologico Ortopedico (CTO) sono riportati nel libro "Approccio al Wound Care" (24). Questi studi clinici, rappresentano una casistica omogenea di centinaia di casi problematici, che hanno spaziato dalle lesioni acute traumatiche/chirurgiche/deiscenze alle lesioni croniche vascolari/piede diabetico, tutte, sempre a esito positivo. L'utilizzo del medicamento ha confermato un indiscutibile vantaggio terapeutico rispetto alle terapie convenzionali, anche le più avanzate, insieme con una rapida e persistente scomparsa del dolore di fondo e di quello legato alla medicazione, a un abbattimento dei tempi di risoluzione (vi sono casi di ulcere persistenti da oltre 21-40 mesi guarite in tre mesi circa) e delle recidive (nessuna recidiva al follow-up al terzo mese dalla guarigione), con una notevole riduzione dell'utilizzazione degli antibiotici e quindi altrettanta riduzione dell'antimicrobico resistenza, analogamente a quanto già verificato in veterinaria. Il medicamento agisce su meccanismi di controllo biologici fondamentali, molto conservati nella scala evolutiva. Esattamente a quanto già dimostrato in veterinaria, anche in medicina umana si è visto che, se si applica il medicamento senza l'uso di altri ausili terapeutici o disinfettanti immediatamente dopo l'infortunio, si osserva che il processo di guarigione inizia senza complicanze batteriche e la fase infiammatoria dura i fisiologici 3 giorni, dopo i quali il tessuto di granulazione diventa evidente su tutto il letto della ferita; quando il trattamento si applica su ferite che presentano già infezione microbica, si osserva regolarmente la sterilizzazione di queste già entro 3-5 giorni, con conseguente trasformazione della fase infiammatoria nella fase di granulazione (effetti antibatterico, antinfiammatorio del medicamento) (24).

Altri medici che hanno utilizzato il prodotto in oggetto per varie “case study series” con diversi tipi di ferite acute e croniche suggeriscono che può essere utilizzato come un’efficace medicazione primaria per ferite che promuove la guarigione e protegge la cute perilesionale. Il prodotto promuove un’impressionante induzione del tessuto di granulazione, anche in ferite molto profonde. Si è rivelato semplice da usare e aumenta notevolmente la *compliance* del paziente (25-28).

Anche le ferite da ustione di secondo e terzo grado si prestano a una buona risoluzione se sono trattati unicamente con il *mix* di Neem e Iperico. In effetti, i risultati di un’analisi retrospettiva non controllata suggeriscono che lo spray per ferite di origine vegetale di Neem e Iperico è clinicamente efficace nel trattamento dei tessuti molli ustionati (29).

Anche il piede diabetico è stato ameno a essere trattato con MIX557. Due “case reports” riportano guarigioni complete di piedi diabetici molto problematici, uno con osso esposto (30) e uno con infezione severa in corso (31) con il solo utilizzo del medicamento.

Un altro tipo di ferita trattabile con il medicamento è la radiodermite. L’oleolito d’Iperico e l’olio di Neem si sono dimostrati un’opzione sicura ed efficace nella gestione della tossicità cutanea acuta nei pazienti con cancro della testa e del collo sottoposti settimanalmente a chemio-radioterapia con cisplatino (32, 33).

Altre svariate tipologie di ferite/lesioni sono state trattate con successo con l’applicazione topica del MIX 557 come nel caso di sinus pinoidale (34), condilomi anali (35) granulomatosi peristomale (36) e ulcere cutanee correlate alla calcinosi nella sclerosi sistemica (37).

Considerazioni finali

La ricerca svolta presso l’ENEA (e in seguito da molteplici gruppi Universitari e Ospedalieri) sul trattamento delle lesioni esterne di qualunque estensione e natura in medicina veterinaria e umana ha ribaltato la questione della gestione di queste rispondendo positivamente alla domanda: Esiste una medicazione “All-In-One” che può essere applicata dall’inizio del trauma fino alla completa epitelizzazione delle lesioni sia acute sia croniche nelle varie specie animali, compreso l’Uomo?

Il medicamento messo a punto MIX557 (brevetto dell’ENEA) rappresenta, appunto, una innovazione per la risoluzione delle lesioni esterne di qualunque estensione e natura proprio per le caratteristiche di “All In One” nel senso che contiene tutto quello che serve per poter ottenere una cicatrizzazione fisiologica che non vada incontro a complicazioni batteriche (infezioni) o parassitarie (miasi), che non presenti cicatrici finali fibrotiche o deturpanti e che, specificamente per l’uso in medicina umana, sia in grado di “svegliare” dallo stato di stallo o cronicità le lesioni croniche come le ulcere vascolari o diabetiche.

Il processo cicatriziale consiste di una pletera di interazioni fra varie cellule mediate attraverso un gran numero di citochine (comunicazioni inter-e intra-cellulari) che forma una rete complessa con tanti nodi diversi interdipendenti. Noi ipotizziamo che il gran numero di metaboliti secondari, biologicamente attivi, presenti nel medicamento (MIX557) interagiscono contemporaneamente con un numero consistenti di questi diversi nodi della rete complessa in tal modo da creare numerosi livelli di sinergismo. L’esito finale è di favorire un processo di cicatrizzazione ottimale.

In effetti, dall’inizio di questo secolo si sta facendo strada una nuova paradigma per il “drug discovery” per affrontare malattie multifattoriali (tipo cancro o altre malattie degenerativi) che si chiama “Network pharmacology” (38) dove si sta ragionando come superare la filosofia di “one gene, one drug, one disease” (39).

Forse abbiamo già nel 2004, inconsapevolmente, intrapreso i primi passi lungo questo cammino molto complicato del nuovo paradigma, in cui certamente le sostanze naturali (e le loro miscele/estratti complessi) avranno sicuramente un ruolo molto importante.

Bibliografia

1. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod* 2020;83:770-803.
2. Cragg GM, Newman DJ. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830(6):3670-95.
3. European Medicines Agency (EMA). *European Union herbal monograph on Hypericum perforatum L., herba (traditional use)*. EMA: London; 2018. Disponibile all'indirizzo: https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-monograph/draft-european-union-herbal-monograph-hypericum-perforatum-l-herba-traditional-use-revision-1_en.pdf; ultima consultazione 08/11/2021.
4. Quave CL. Wound healing with botanicals: a review and future perspectives. *Curr Derm Rep* 2018;7:287-95.
5. Rahmani AH, Almatroudi A, Alrumaihi F, Khan AA. Pharmacological and therapeutic potential of neem (*Azadirachta indica*). *Pharmacogn Rev* 2018;12: 250-5.
6. Saleem S, Muhammad G, Hussain MA, Bukhari SNA. A comprehensive review of phytochemical profile, bioactives for pharmaceuticals, and pharmacological attributes of *Azadirachta indica*. *Phytother Res* 2018;32(7):1241-72.
7. Ricci F, Berardi V, Risuleo, G. Differential cytotoxicity of MEX: A component of neem oil whose action is exerted at the cell membrane level. *Molecules* 2009;14(1):122-32.
8. Gossé B, Amissa AA, Adjé, FA Niamké FB, Ollivier D, Ito Y. Analysis of components of neem (*Azadirachta indica*) oil by diverse chromatographic techniques. *J Liq Chromatogr Relat Technolog* 2005;28(14):2225-33.
9. Khanam Z, Al-Yousef HM, Singh O, Bhat IUH. - Neem oil. In: Hamir Singh Rathore, Leo M.L Nollet (Ed.) *Green Pesticides Handbook: Essential Oils for Pest Control*. Boca Raton: CRC Press; 2017 (Chapter 20).
10. Benelli G, Bedini S, Cosci F, Toniolo C, Conti B, Nicoletti M. Larvicidal and ovideterrent properties of neem oil and fractions against the filariasis vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): a bioactivity survey across production sites. *Parasitol Res* 2015;114(1):227-36.
11. Cesa, F. Sisto, G. Zengin, Scaccabarozzi D, Kokolakis AK, Scaltrito MM, Grande R, Locatelli M, Cacciagrano F, Angiolella L, Campestre C, Granese A, Chimenti P, Basilico N. Phytochemical analyses and pharmacological screening of Neem oil, *S Afric J Bot*; 2018. Disponibile all'indirizzo: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629918311724#!>; ultima consultazione 08/11/2021.
12. Brahmachari G. Neem-An omnipotent plant: A retrospection. *Chem Bio Chem* 2004;5:408-21.
13. Nagini S. Neem limonoids as anticancer agents: modulation of cancer hallmarks and oncogenic signaling. Chapter 7. In: S. Zahra Bathaie and Fuyuhiko Tamanoi (Ed.) *The Enzymes (Volume Thirty six), Natural Products and Cancer Signaling: Isoprenoids, Polyphenols and Flavonoids*. Cambridge, MA: Elsevier Academic Press; 2014. p. 132-47.
14. Maisenbacher P, Kovar KA. Analysis and stability of *Hyperici Oleum*. *Planta Med* 1992;58(4):351-4.
15. Bilia AR, Bergonzi MC, Morgenni F, Mazzi G, Vincieri FF. Evaluation of chemical stability of St. John's wort commercial extract and some preparations. *Int J Pharm* 2001;213(1-2):199-208.

16. Isacchi B, Bergonzi MC, Carnevali F, van der Esch SA, Vincieri FF, Bilia AR. Analysis and stability of the constituents of St. John's wort oils prepared with different methods. *J Pharm Biomed Anal* 2007;45(5):756-61.
17. Wölfl U, Seelinger G, Schempp CM. Topical application of St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *Planta Med* 2014;80(2-3):109-20.
18. Novelli M, Masiello P, Befly P, Menegazzi M. Protective role of St. John's Wort and its components hyperforin and hypericin against diabetes through inhibition of inflammatory signaling: evidence from *in vitro* and *in vivo* studies. *Int. J Mol Sci* 2020;21:8108.
19. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal-a historical perspective with a focus on the fundamental roles of increased vascular permeability and clotting. *Semin Thromb Hemost* 2019;45(06):576-92.
20. Carnevali F, Franchini D, Otranto D, Giangaspero A, Di Bello A, Ciccarelli S, Szpila K, Valastro C, van der Esch AS. A formulation of neem and hypericum oily extract for the treatment of the wound myiasis by *Wohlfahrtia magnifica* in domestic animals. *Parasitol Res* 2019;118(8):2361-7.
21. Carnevali F, Argentieri M, Ippedico G, Minniti C, Amodio L, Mellano L, van der Esch SA. Managing horse wounds either presenting or not with exuberant granulation tissue using an innovative wound dressing: a retrospective non-controlled study. *J Animal Vet Sci* 2014;1(2):6-16.
22. Carnevali F, van der Esch SA. No apparent adverse reactions in cat using a neem oil based wound healing remedy (1PWD®). *Atti Congresso VWHA /EWMA*. Frederiksberg: VWHA /EWMA; 2018.
23. Franchini D, Cavaliere L, Valastro C, Carnevali F, van der Esch SA, Lai O, Di Bello A. Management of severe head injury with brain exposure in three loggerhead sea turtles *Caretta caretta*. *Dis Aquatic Org* 2016;119:145-52.
24. Carnevali F. Importanza della ricerca nel Wound Care: dalla Medicina Veterinaria una medicazione derivata dalle piante "All-in-One". Dal Wound Bed Preparation alla rigenerazione tissutale. Esperienza clinica di 5 anni in un centro ospedaliero. In: Palombi M (Ed). *Approccio al Wound Care*. Roma: CIC Edizioni Internazionali; 2019. p. 483-552.
25. Hunziker T, Hafner M, Streit S, Läubli S. Pflanzlicher Wundspray fuer akute und chronische Hautwunden. *Wund Management* 2012;06:270-4;
26. Läubli S. 1 Primary Wound Dressing®: clinical experience. *HHE* 2012;1-3. Disponibile alla pagina: <https://www.endospitalia.it/wp-content/uploads/2021/07/La%CC%88uchli-2012-105-cases.pdf>; ultima consultazione 08/11/2021.
27. Läubli S, Hafner J, Wehrman C, French LE, Hunziker T. Post-surgical scalp wounds with exposed bone treated with a plant derived wound therapeutic. *J Wound Care* 2012;21:228-33.
28. Läubli S, Vannotti S, Hafuer J, Hunziker T., French L. A plant derived wound therapeutic for cost effective treatment of post-surgical scalp wounds with exposed bone. *Forsch Komplementmed* 2014;21(2):88-93.
29. Mainetti S, Carnevali F. An experience with paediatric burn wounds treated with a plant derived wound therapeutic. *J Wound Care* 2013;22(12):681-9.
30. Iabichella ML. The use of an extract of *Hypericum perforatum* and *Azadirachta indica* in advanced diabetic foot: An unexpected outcome. *BMJ Case Rep*. 2013;bcr2012007299.
31. Iabichella ML, Caruso C, Lugli M. The use of an extract of *Hypericum perforatum* and *Azadirachta indica* in a neuropathic patient with advanced diabetic foot. *BMJ Case Rep*. 2014.
32. Franco P, Potenza I, Moretto F, Segantin M, Grosso M, Lombardo A, Taricco D, Vallario P, Filippi AR, Rampino M, Ricardi U. *Hypericum perforatum* and neem oil for the management of acute skin toxicity in head and neck cancer patients undergoing radiation or chemo-radiation: A single-arm prospective observational study. *Radiat Oncol* 2014;9:297.
33. Franco P, Rampino M, Ostellino O, Schena M, Pecorari G, Garzino Demo P, Fasolis M, Arcadipane F, Martini S, Cavallin C, Airolidi M, Ricardi U. Management of acute skin toxicity with *Hypericum*

- perforatum* and neem oil during platinum-based concurrent chemo-radiation in head and neck cancer patients. *Med Oncol* 2017;34:30.
34. Lenz A, Herrmann B, Illien U, Diener U, Herzig W. Pilonidal sinus wounds: secondary intention Healing with a plant-based wound therapeutic. *Wund Management* 2015;9(2):48-53.
 35. Menconi M, Del Bono L, Sturiale A, Fabiani B, Raad D, Morganti R, Naldini G. Size reduction and improvement of ano-genital warts plate through the application of MIX557-Oleum Hyperici and Neem oil before surgical removal. Preliminary results. *Senses Sci* 2019;6(1):693-700.
 36. Del Missier A, La Torre F, Toma E. Treatment of peristomal granulomatosis with a neem and red hypericum oil application: Case studies. *Clin Ter* 2019;170(2):e86-e92.
 37. Giuggioli D, Lumetti F, Spinella A, Cocchiara E, Sighinolfi G, Citriniti G, Colaci M, Salvarani C, Ferri C. Use of Neem oil and Hypericum perforatum for treatment of calcinosis-related skin ulcers in systemic sclerosis. *J Int Med Res* 2020;48(4).
 38. Hopkins AL. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. *Nat Chem Biol* 2008;4(11):682-90.
 39. Gomez-Cadena A, Barreto A, Fioretino S, Jandus C. Immune system activation by natural products and complex fractions: a network pharmacology approach in cancer treatment. *Cell Stress* 2020 18;4(7):154-66.

PROPRIETÀ E LIMITI DEGLI OLI ESSENZIALI

Letizia Angiolella

Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, Sapienza Università di Roma, Roma

Introduzione

L'utilizzo da millenni delle piante medicinali descrive una lunga storia dell'interazione umana con l'ambiente. Le piante usate per la medicina tradizionale contengono una grande varietà di sostanze che possono essere usate per trattare differenti malattie infettive. In questi ultimi anni lo studio di molecole di origine naturale ha acquisito un forte interesse a causa dello sviluppo sempre più diffuso di microrganismi, come funghi e batteri, resistenti ai farmaci utilizzati nelle terapie antinfettive. Gli Oli Essenziali (OE) e i loro componenti ottenuti dalla distillazione di alcune parti vegetali hanno dimostrato di possedere diverse attività come quella antimicrobica e antiossidante, antitumorale. È necessario però, fare attenzione perché molto spesso le concentrazioni degli OE utilizzate ai fini delle attività biologiche sono piuttosto elevate rispetto a quelle utilizzate con farmaci di sintesi. Concentrazioni elevate possono provocare tossicità cellulare.

Oli essenziali

Le piante medicinali e le erbe rappresentano fonti di molecole attive che potrebbero diventare composti fondamentali per lo sviluppo di nuovi prodotti farmaceutici. Infatti, producono una grande varietà di sostanze volatili alifatiche e cicliche che formano complesse misture chiamate oli essenziali (OE) (1, 2). Queste miscele sono una fonte di composti biologicamente attivi e con dimostrata attività antimicrobica, antifungina, antivirale, e antiossidante (3). Inoltre, alcuni OE sono stati anche usati nel trattamento del cancro (4), nella conservazione degli alimenti, nell'aromaterapia e infine nell'industria cosmetica. Gli OE disponibili in commercio derivati da piante aromatiche come *Melaleuca alternifolia* (albero del tè), *Thymus vulgaris* (timo), *Mentha piperita* (menta), *Rosmarinus officinalis* (rosmarino), *Citrus aurantium* (olio di arancio amaro) e *Cymbopogon martinii* (olio di palmarosa) sono stati ampiamente utilizzati per il trattamento delle infezioni topiche, sia batteriche che fungine (3). Inoltre, il *Coriandrum sativum* è raccomandato per disturbi dispeptici, perdita di appetito, convulsioni, insonnia e ansia oltre che per la sua attività antimicrobica (5, 6). Ancora, gli OE di *Aluminum cyminum* (cumino), *Ocimum basilicum* (basilico), *Myrtus communis* (mirto), *Origanum vulgare* (origano), *Mentha suaveolens*, *Coridothymus capitatum* sono noti per le proprietà antimicrobiche e antiossidanti (7-11).

Proprietà antimicrobiche

I batteri, i funghi e i virus sono responsabili di numerose infezioni umane. Nel corso degli anni sono stati sviluppati farmaci antimicrobici efficaci; tuttavia, è stato osservato un drammatico aumento della farmaco-resistenza. Sebbene gli antibiotici siano stati efficaci per lungo tempo nella lotta contro le malattie infettive, la resistenza a questi farmaci ha portato anche al riemergere di vecchie malattie infettive. Per questo motivo, è necessario trovare nuovi composti

antimicrobici. Tra i nuovi composti di origine naturale, alcuni OE hanno mostrato attività antibatterica contro batteri sia Gram-positivi che Gram-negativi. In particolare, gli OE di *Melaleuca alternifolia*, *Coriandrum sativum* e *Myrtus communis* presentano un forte attività antimicrobica per esempio nei confronti di batteri Gram-positivi come *Staphylococcus epidermidis*, un microrganismo presente sulla cute, in grado di aderire alle superfici e formare biofilm, oppure come *Staphylococcus aureus*, in grado di causare diverse patologie tra cui malattie di origine alimentare e infezioni che possono essere cutanee, o localizzate ai tessuti profondi, potenzialmente letali. Questi stessi OE hanno mostrato un'elevata attività antimicrobica anche nei confronti di batteri Gram-negativi multiresistenti, come *Escherichia coli*, presente nella microflora intestinale della maggior parte degli animali e degli esseri umani e, comunemente associato a infezioni del tratto urinario. Inoltre, gli OE di *Melaleuca alternifolia* e *Coriandrum sativum* in particolare risultano attivi nei confronti di *Klebsiella pneumoniae* e/o di *Acinetobacter baumannii*, agenti coinvolti nelle infezioni multiresistenti nosocomiali, o opportunistiche (12).

Tra i diversi microrganismi, i funghi occupano un ruolo importante in quanto sono causa molto spesso di infezioni sia nell'uomo che negli animali. Le infezioni micotiche si differenziano in base al coinvolgimento del distretto anatomico. L'attività antimicotica di molti OE è stata studiata essenzialmente su *Candida* spp., su *Criptococcus* spp., su dermatofiti e anche su *Malassezia furfur*.

Candida albicans è il fungo dimorfo opportunistica più frequentemente isolato nell'uomo. È noto per causare un ampio spettro di micosi, che vanno dalle infezioni dei tessuti profondi alle infezioni superficiali della pelle e delle mucose (13). Sebbene *C. albicans* rappresenti la specie più isolata, c'è un significativo aumento della frequenza delle infezioni di specie *Candida* non *albicans*, come *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Diversi studi hanno messo in evidenza l'attività antimicotica degli OE di *Mentha suaveolens*, di *Coridothymus capitatus*, di *Origanum hirtum* e di *Rosmarinum officinalis* sia nei confronti di *C. albicans* che di altre specie di *Candida* risultando particolarmente attivi (11, 14). Inoltre l'OE di *Mentha suaveolens* è risultato attivo nei confronti di *Cryptococcus neoformans*, un lievito capsulato, uno dei principali agenti patogeni nell'uomo, che causa la maggior parte delle infezioni nei pazienti immunocompromessi, compresi quelli infetti da HIV. Lo stesso OE è risultato attivo anche nei confronti di alcuni funghi filamentosi quali *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporum canis* in grado di infettare i tessuti cheratinizzati di esseri umani e animali provocando infezioni cutanee (15).

E infine gli OE sono stati saggiati anche nei confronti dei lieviti appartenenti al genere *Malassezia* che comprende un gruppo di lieviti lipofili e per lo più dipendenti dai lipidi riconosciuti come membri del normale microbioma cutaneo presente sia nell'uomo che negli animali (16). *Malassezia* è un lievito opportunistica e in determinate condizioni, può causare pitiriasi versicolor e follicolite, può essere associata a dermatite seborroica o esacerbare diverse malattie della cute come la dermatite atopica (17, 18). Gli OE di *Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris* sono stati testati su 27 isolati di *Malassezia furfur* risultando più attivi specialmente nei confronti di isolati clinici resistenti al fluconazolo (10).

Sinergismo

Una strategia impiegata per superare i meccanismi di resistenza è stata l'uso di combinazioni di farmaci, come i beta-lattamici insieme a inibitori o combinazioni di beta-lattamasi di diverse classi di farmaci (19). Infatti, diversi estratti vegetali hanno mostrato un'attività sinergica "in vitro" quando utilizzati in combinazione con diversi farmaci contro differenti microrganismi e potrebbero rappresentare un nuovo approccio alternativo al trattamento delle malattie infettive. In una combinazione, l'interazione tra antimicrobici può portare a tre diversi risultati, ovvero

sinergico, additivo o antagonista. La sinergia si ottiene combinando due composti antimicrobici che producono un'attività antibatterica maggiore della somma dell'attività antibatterica dei singoli componenti. Un effetto additivo viene prodotto combinando antimicrobici che producono un effetto antimicrobico uguale alla somma dei singoli composti. Un effetto antagonista si traduce in una diminuzione dell'attività antimicrobica di due composti in combinazione rispetto alla loro attività antimicrobica individuale (20). Gli effetti sinergici possono essere prodotti se i componenti di un olio essenziale influenzano diversi target o interagiscono tra loro per migliorare la solubilità e quindi aumentare la biodisponibilità di una o più sostanze di un OE. Inoltre, quando gli antibiotici sono combinati con un agente che antagonizza i meccanismi di resistenza batterica può portare a sinergie (21). Sono stati studiati diversi OE, ma in particolare è stato dimostrato con diverse specie patogene che la combinazione dell'OE di *Mentha suaveolens* in combinazione con differenti farmaci antimicrobici è in grado di avere un effetto sinergico. Ad esempio è stato dimostrato che l'OE suddetto in associazione con il fluconazolo in isolati clinici di *Candida albicans* resistenti ai farmaci antimicotici ha un effetto sinergico; lo stesso effetto si ha in combinazione con la gentamicina in *Klebsiella pneumoniae*, opportunistica nosocomiale delle vie respiratorie. Possibili attività sinergiche di questo olio essenziale si possono ottenere anche con patogeni intracellulari obbligati come il virus *Herpes simplex* di tipo 1. L'OE di *Mentha suaveolens* in combinazione con acyclovir è in grado di inibire la replicazione virale. Lo stesso OE in associazione con eritromicina inibisce la replicazione di *Chlamydia trachomatis* (13, 22-24). Come riportato in precedenza, generalmente il sinergismo è studiato tra gli OE e i farmaci di sintesi, ma alcuni studi sono stati eseguiti valutando il potenziale sinergismo di differenti OE combinati insieme, rappresentando quindi una strategia alternativa quando non è possibile utilizzare farmaci di sintesi. È stato dimostrato che tre diversi OE sono in grado di inibire l'attività *in vitro* di *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, un fitopatogeno coinvolto nella batteriosi del kiwi abbassando la carica infettante di circa 2 logaritmi in 30 min (25). Mentre la combinazione tra gli OE di *Pelargonium capitatum* e *Cymbopogon martinii* alle concentrazioni di sub-MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*, Concentrazione Minima Inibente) sono in grado di uccidere *C. albicans* dopo solo 2 ore di contatto (26).

Citotossicità

Lo studio dell'attività antimicrobica *in vitro* degli OE può presentare delle criticità:

- Le concentrazioni degli OE utilizzate per avere attività biologica molto spesso sono molto elevate rispetto a quelle utilizzate con i farmaci di sintesi, e possono raggiungere l'ordine di milligrammi/mL;
- La composizione chimica degli OE è molto variabile. La grande variabilità dipende da molteplici fattori quali ad esempio: il periodo della raccolta, il terreno di crescita, i tempi di estrazione, che possono modificare profondamente le caratteristiche organolettiche di un OE per cui è assolutamente necessario standardizzare la loro preparazione (27);
- Essendo fitocomplessi estremamente volatili, è assolutamente necessario valutare il loro grado di citotossicità eseguendo dei test *in vitro*.

A tale riguardo l'attività citotossica è stata valutata per gli OE di *Coridothymus capitatum*, *Mentha suaveolens*, *Rosmarinum officinalis* e *Origanum hirtum* nei confronti di diverse linee cellulari come quelle di cheratinociti umani (HaCaT) e di cellule tumorali di polmone umano (A549). In entrambi i casi si è ottenuta una inibizione della crescita cellulare dipendente dalla concentrazione degli OE ($\mu\text{g/mL}$) e dalla durata del tempo dei diversi trattamenti.

In generale, le cellule HaCaT non tumorali, presentano una maggiore sensibilità ai trattamenti rispetto alla linea cellulare tumorale A549. I valori di IC₅₀ (concentrazione inibente di un inibitore enzimatico necessaria per inibire il 50% del bersaglio) rientrano nei criteri del National Cancer Institute statunitense che sostengono che l'attività citotossica di un fitocomplesso è considerata significativa quando l'IC₅₀ è <30 µg/mL (28). Alcuni OE, ad esempio quelli di *Coridothymus capitatum* e *Origanum hirtum*, potrebbero essere dannosi perché presentano valori di IC₅₀ compresi tra 100 e 1000 µg/mL (11). Quindi il loro utilizzo deve avvenire a concentrazioni basse.

Conclusioni

Le sostanze di origine naturale, in particolare gli OE possono rappresentare un supporto ai farmaci convenzionali in quanto possiedono molteplici attività biologiche, in particolare sono in grado di presentare una significativa attività antimicrobica, specialmente nei confronti di microrganismi farmaco resistenti. Inoltre, in associazione con i farmaci in alcuni casi sono in grado di produrre un effetto sinergico. Uno dei limiti di queste sostanze è rappresentato dalla loro elevata variabilità per cui è fondamentale la loro standardizzazione durante la preparazione, perché rappresenta una delle fasi più importanti per non avere OE con attività completamente diverse. Infine è di fondamentale importanza verificare sempre l'attività citotossica sia *in vitro* che *in vivo* perché l'utilizzo a concentrazioni elevate potrebbe provocare danni cellulari.

Bibliografia

1. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol* 1999;86(6):985-90.
2. Rios JL, Recio MC. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol* 2005;100(1-2):80-4.
3. Solorzano-Santos F, Miranda-Navales MG. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol* 2012;23(2):136-41.
4. Gautam N, Mantha AK, Mittal S. Essential oils and their constituents as anticancer agents: a mechanistic view. *Biomed Res Int* 2014;154106.
5. Emamghoreishi M, Khasaki M, Aazam MF. *Coriandrum sativum*: evaluation of its anxiolytic effect in the elevated plus-maze. *J Ethnopharmacol* 2005;96(3):365-70.
6. Silva F, Ferreira S, Queiroz JA, Domingues FC. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. *J Med Microbiol* 2011; 60(10):1479-86.
7. Iacobellis NS, Lo Cantore P, Capasso P, Senatore F. Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. *J Agric Food Chem* 2005;53(1):57-61.
8. Hussain AI, Anwar F, Hussain Sherazi ST, Przybylski R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chem* 2008;108(3):986-95.
9. Ragno R, Sivric S, Sartorelli G, Serilli A, Vavala E, Angiolella L. *In vitro* activity of essential oil of *Myrtus communis* L. against *Candida albicans*. *International Journal of Essential Oil Therapeutics* 2008;2:156-57.
10. Vinciguerra V, Rojas F, Tedesco V, Giusiano G, Angiolella L. Chemical characterization and antifungal activity of *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* essential oils and carvacrol against *Malassezia furfur*. *Nat Prod Res* 2019;33(22):3273-77.

11. Spagnoletti A, Guerrini A, Tacchini M, Vinciguerra V, Leone C, Maresca I, Simonetti G, Sacchetti G, Angiolella L. Chemical Composition and Bio-efficacy of Essential Oils from Italian Aromatic Plants: *M. suaveolens*, *C. capitatus*, *O. hirtum* and *R. officinalis*. *Nat Prod Commun* 2016;11(10):1517-20.
12. Scazzocchio F, Garzoli S, Conti C, Leone C, Renaioli C, Pepi F, Angiolella L. Properties and limits of some essential oils: chemical characterization, antimicrobial activity, interaction with antibiotics and cytotoxicity. *Nat Prod Res* 2016;30(17):1909-18.
13. Calderone R (Ed). *Candida and Candidiasis*. Washington DC: ASM Press; 2002.
14. Pietrella D, Angiolella L, Vavala E, Rachini A, Mondello F, Ragno R, Bistoni F, Vecchiarelli A. Beneficial effect of *Mentha suaveolens* essential oil in the treatment of vaginal candidiasis assessed by realtime monitoring of infection. *BMC Complement Altern Med* 2011;28;11-8.
15. Angiolella L, Vavala E, Sivric S, D'Auria FD, Ragno R. *In vitro* activity of *Mentha suaveolens* essential oil against *Cryptococcus neoformans* and dermatophytes. *International Journal of Essential Oil Therapeutics* 2010;4:35-6.
16. Cabanes FJ. Malassezia yeasts: how many species infect humans and animals? *PLOS Pathog* 2014;10(2):e1003892.
17. Saunders CW, Scheynius A, Heitman J. *Malassezia* fungi are specialized to live on skin and associated with dandruff, eczema, and other skin diseases. *PLoS Pathog* 2012;8(6):e1002701.
18. Angiolella L, Leone C, Rojas F, Mussin J, de los Angeles Sosa M, Giusiano G. Biofilm, adherence and hydrophobicity as virulence factors in *Malassezia furfur*. *Med Mycol* 2018;56(1):110-6.
19. Rey-Jurado E, Tudó G, de la Bellacasa JP, Espasa M, González-Martín J. *In vitro* effect of three-drug combinations of antituberculous agents against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Int J Antimicrob Agents* 2013;41(3):278-80.
20. Kalan L and Wright GD. Antibiotic adjuvants: multicomponent anti-infective strategies. *Expert Rev Mol Med* 2011;13;e5.
21. AL-Ani I, Zimmermann Z, Reichling J, Wink M. Pharmacological synergism of bee venom and melittin with antibiotics and plant secondary metabolites against multi-drug resistant microbial pathogens. *Phytomed* 2015;22(2):245-55.
22. Stringaro A, Vavala E, Colone M, Pepi F, Mignogna G, Garzoli S, Cecchetti S, Ragno R, Angiolella L. Effects of *Mentha suaveolens* essential oil alone or in combination with other drugs in *Candida albicans*. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014;125904.
23. Civitelli L, Panella S, Marcocci ME, De Petris A, Garzoli S, Pepi F, Vavala E, Ragno R, Nencioni L, Palamara AT, Angiolella L. *In vitro* inhibition of herpes simplex virus type 1 replication by *Mentha suaveolens* essential oil and its main component piperitenone oxide. *Phytomed* 2014;21(6):857-65.
24. Sessa R, Pietro M, De Santis F, Filardo S, Ragno R, Angiolella L. Effects of *Mentha suaveolens* Essential Oil on *Chlamydia trachomatis*. *Biomed Res Int* 2015;2015:508071.
25. Vavala E, Passariello C, Ragno R, Pepi F, Garzoli S, Colone M, Stringaro A, Angiolella L. Antimicrobial activity of essential oils against *Pseudomonas syringae* pathovar actinidiae (PSA). *Nat Prod Res* 2016;30(4):412-8.
26. Angiolella L. Synergistic activity of Pelargonium capitatum and Cymbopogon martini essential oils against *C. albicans*. *Nat Prod Res* 2020;25;1-5.
27. Garzoli S, Pirolli A, Vavala E, Di Sotto A, Sartorelli G, Bozovic M, Angiolella L, Mazzanti G, Pepi F, Ragno R. Multidisciplinary approach to determine the optimal time and period to extract the essential oil from *Mentha suaveolens* Ehrh. *Molecules* 2015;20(6):9640-96.
28. Talib WH, Mahasneh AM. Antiproliferative activity of plant extracts used against cancer in traditional medicine. *Sci Pharm* 2010;78(1):33-45.

OLI ESSENZIALI FRA AUTENTICITÀ E SICUREZZA

Stefania Benvenuti, Eleonora Truzzi, Lucia Marchetti, Davide Bertelli
Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Modena

Introduzione

L'Olio Essenziale (OE) è una miscela ottenuta da droghe vegetali, costituita da numerose componenti di origine per lo più terpenica, risultato di un metabolismo complesso e specie-specifico.

Biosintesi ed estrazione dell'OE consistono in un percorso articolato, costituito da numerosi stadi in cui risultano coinvolti svariati fattori che possono influire sulla resa e sulla composizione chimica.

Oltre le ben note differenze di genere e specie botanica, è comune trovare chemiotipi differenti, correlati a diverse *cultivar*, indice di patrimoni genetici che inducono la produzione di un corredo enzimatico e vie metaboliche diversamente espresse nella pianta aromatica. In questo contesto, considerato che i metaboliti secondari che compongono l'OE sono molecole prodotte in risposta a stimoli ambientali, anche l'adattamento evolutivo, seppur molto lento, può incidere sulla variabilità.

Fattori pedoclimatici, agronomici nonché la copresenza di altre specie vegetali e lo stesso microbioma del suolo influiscono inoltre sulla composizione chimica degli OE, modulando le sequenze metaboliche sia in maniera proattiva che depressiva.

È inoltre da considerare che l'OE, ottenuto mediante tecniche di distillazione e estrazione, è comunque un artefatto, sicuramente differente dall'insieme dei costituenti presenti nei tessuti di secrezione e produzione della pianta.

La definizione fornita dalla Farmacopea di prodotto ottenuto per distillazione o per estrazione meccanica (1), limita le modalità, ma non le differenze introdotte dall'applicazione della tecnica estrattiva sulla composizione dell'essenza prodotta dalla pianta; nell'ambito poi della medesima metodica, la variazione di parametri, quali la pressione e il tempo di distillazione, nonché le caratteristiche della droga sottoposta al processo, induce cambiamenti fra le componenti estratte e i loro rapporti quantitativi.

Per garantire migliori caratteristiche organolettiche e conservabilità, sono inoltre ammessi trattamenti di post-distillazione che concorrono a modificare il prodotto vegetale.

Il risultato finale è quindi un prodotto ad alto valore, non solo per gli sforzi tesi ad aumentarne la resa, ma per quelli sperimentati e messi in atto al fine di ottenere un prodotto idoneo agli impieghi fitoterapici, cosmetici e alimentari, ossia con un profilo quali- e quantitativo specifico.

Qualità degli oli essenziali

Gli OE sono miscele di sostanze chimiche pure, delle quali alcune sono funzionali alla solubilizzazione di altre, e quindi vanno trattati come tutti i *chemicals*, ossia sottoposti al Regolamento (CE) 1907/2006 (*Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals*, REACH), che stabilisce le procedure per l'acquisizione e la valutazione dei dati sulle proprietà e sui pericoli delle sostanze) e il Regolamento (CE) 1272/2008 sulla classificazione,

l'etichettatura e l'imballaggio (*Classification, Labelling and Packaging, CLP*) come materie prime; il loro utilizzo nella cosmetica o in fitoterapia va poi adeguatamente descritto, vista la presenza di sostanze anche tossiche e allergizzanti; è quindi richiesto per questi estratti un'adeguata etichettatura, che indichi il corretto uso, smaltimento e rischio.

Tecniche analitiche per il controllo degli oli essenziali

La descrizione di un OE, spesso introdotta da un'analisi organolettica, passa quindi attraverso la determinazione di parametri chimico-fisici ben precisi, misurati con metodi standardizzati: indice di rifrazione, densità, rotazione ottica, punto di congelamento o di ebollizione, ecc.

I testi ufficiali quali la Farmacopea Europea o certificazioni International Organization for Standardization (ISO) riportano per le singole monografie questi valori, che devono essere rispettati affinché l'OE possa dirsi conforme a questi requisiti di qualità.

I risultati di tali misure sono specifici per i differenti OE e i valori ottenuti sono la sommatoria degli effetti dei singoli costituenti presenti.

Per valutare però la qualità intrinseca dell'OE come il risultato della somma vettoriale dei singoli componenti, è indispensabile valutare il profilo metabolomico sia a livello qualitativo che quantitativo, mediante tecniche analitiche separative per verificare quali sono i componenti terpenoidici presenti nell'OE e i loro rapporti; dagli stessi enti certificatori, nelle specifiche monografie, ma anche da ogni responsabile fornitore, nelle relative schede tecniche, vengono riportati i risultati ottenuti dall'applicazione delle metodiche analitiche più idonee a questi scopi; sicuramente la cromatografia su strato sottile (*Thin Layer Chromatography, TLC*), rappresenta un sistema di analisi semplice, rapido e *user-friendly*, e che può fornire utili informazioni sulla composizione qualitativa dell'OE. Per questo non mancano fonti bibliografiche, di facile interpretazione e applicazione (2).

A livello quantitativo, la Gascromatografia (GC), accoppiata a un semplice rivelatore a ionizzazione di fiamma (*Flame Ionization Detector, FID*) rappresenta la tecnica di elezione, prevista anche dagli enti certificatori, vista la volatilità dei componenti dell'OE e quindi la loro facile separazione su colonne capillari; in questo caso è necessario però una strumentazione adatta e personale adeguatamente formato a svolgere le analisi e soprattutto a elaborare i risultati, compito di non facile esecuzione vista la complessità chimica di questa matrice e la competenza richiesta in campo fitochimico.

Questa stessa tecnica può avvalersi anche di un rivelatore di spettrometria di massa o gascromatografia-spettrometria di massa (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS*) che permette il riconoscimento della struttura chimica, attraverso la valutazione del peso molecolare della molecola separata e dei frammenti ottenuti dalla ionizzazione della stessa. Grazie a tecniche analitiche consolidate, è quindi possibile controllare la qualità di un OE e di conseguenza stabilire i relativi settori di applicazione nell'ambito dei prodotti per la salute.

Attualmente gli OE, grazie alle loro innumerevoli attività biologiche, sono utilizzati come eccipienti e come ingredienti attivi in diverse formulazioni; la copresenza di sostanze intensamente bioattive con altre componenti modulanti, riduce la tossicità ed esalta l'azione terapeutica.

Come in una orchestra, è necessario che tutti i principi siano presenti in rapporti bilanciati; per questo è fondamentale che tutto il processo di produzione degli OE segua protocolli standardizzati, al fine di ottenere un derivato di qualità: dalla coltivazione della pianta aromatica, alla sua distillazione, fino al confezionamento e conservazione.

Problematica delle adulterazioni: nuove tecniche di indagine

La grande richiesta da parte del mercato e l'alto costo di produzione hanno fatto emergere la pratica illegale di adulterazione degli OE.

Diversi tipi di manipolazioni fraudolente sono state riscontrate in prodotti presenti sul mercato, come ad esempio l'aggiunta di composti specifici, sintetici e/o naturali, per avere un prodotto finale a composizione standardizzata, magari partendo da OE di bassa qualità.

Inoltre, ben nota è l'aggiunta di altri OE, per migliorare la qualità olfattiva, o le proprietà biologiche, fino alla formulazione completa dell'intera miscela a partire da composti sintetici.

Sicuramente l'adulterazione più diffusa è la diluizione con oli fissi, vegetali o minerali, e solventi, attuata per lo più per motivi economici.

Al fine di riconoscere queste pratiche si possono applicare tecniche analitiche in grado di riconoscere tutte le componenti caratteristiche dell'OE e i loro rapporti, o individuare uno o più *marker* specifici, come ad esempio un isomero ottico prodotto selettivamente dal metabolismo vegetale.

La diluizione non è identificabile mediante GC poiché essa analizza solo la porzione volatile dell'OE e non la componente fissa.

Solo recentemente è stato sviluppato un metodo innovativo che prevede l'analisi degli OE mediante tecnica infrarossa, ovvero la *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FT-IR) (Figura 1), la successiva applicazione di metodi chemiometrici come la *Principal Component Analysis* (PCA) (Figura 2) e la *Partial Least Squares regression* (PLS) (Figura 3) in grado di elaborare gli spettri e risalire al contenuto di olio vegetale adulterante (3).

Con questa tecnica in pochi minuti è stato possibile quantificare oli vegetali fissi di diversa natura addizionati come diluenti a OE. Per identificare gli adulteranti è stata successivamente applicata per la prima volta nel controllo di qualità degli OE, la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR).

Il metodo prevede le seguenti fasi: identificazione della presenza dell'adulterazione e riconoscimento dell'olio vegetale adulterante (4).

Il metodo è stato sviluppato e validato su miscele binarie composte da diversi OE nel range di adulterazione tra 0,8 e 50,0% p/p. Il riconoscimento dell'adulterazione tramite tecnica ¹H-NMR è avvenuta grazie all'individuazione dei segnali del glicerolo tipici dei trigliceridi presenti in tutti gli oli vegetali. L'identificazione dell'olio vegetale mediante ¹³C-NMR è invece basata sul "fingerprint" chimico.

Questo principio si basa sulla creazione di matrici ottenute dai rapporti delle aree dei segnali tipici degli acidi grassi negli oli vegetali puri più comuni (palmitico, oleico e linoleico).

Tali matrici possono essere utilizzate come impronte digitali e quindi essere confrontate con quelle ottenute da miscele binarie di prova appositamente allestite con OE e oli vegetali (Figura 4).

Il confronto delle matrici degli oli vegetali puri usati come standard con le matrici delle miscele "incognite" è avvenuto tramite *software* codificato su MATLAB, piattaforma di programmazione e calcolo numerico utilizzata da milioni di ingegneri e scienziati per l'analisi di dati e lo sviluppo di algoritmi. I risultati hanno dimostrato che il metodo è idoneo per tutte le miscele testate: la presenza di oli fissi è individuabile già a partire dallo 0,8%, mentre il riconoscimento dell'olio vegetale è possibile dal 3%, su tutte le tipologie di OE testate.

Il metodo applicato su 20 campioni di OE commerciali ha permesso di individuare un'adulterazione con olio di soia su *Mentha arvensis*, di olio di mais su *Cymbopogon martinii*, di olio di girasole in *Thymbra capitata* e di olio di mais su *Origanum vulgare*.

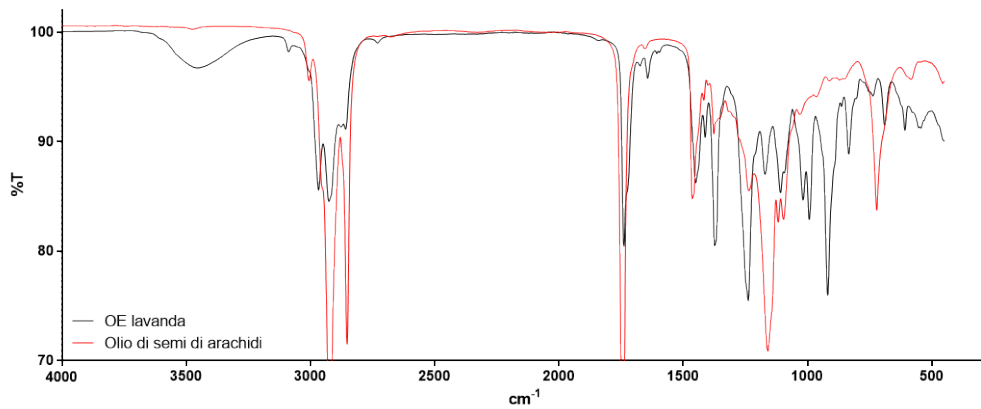


Figura 1. Spettri infrarosso (IR) di OE di *Lavandula angustifolia* e olio di semi di arachide

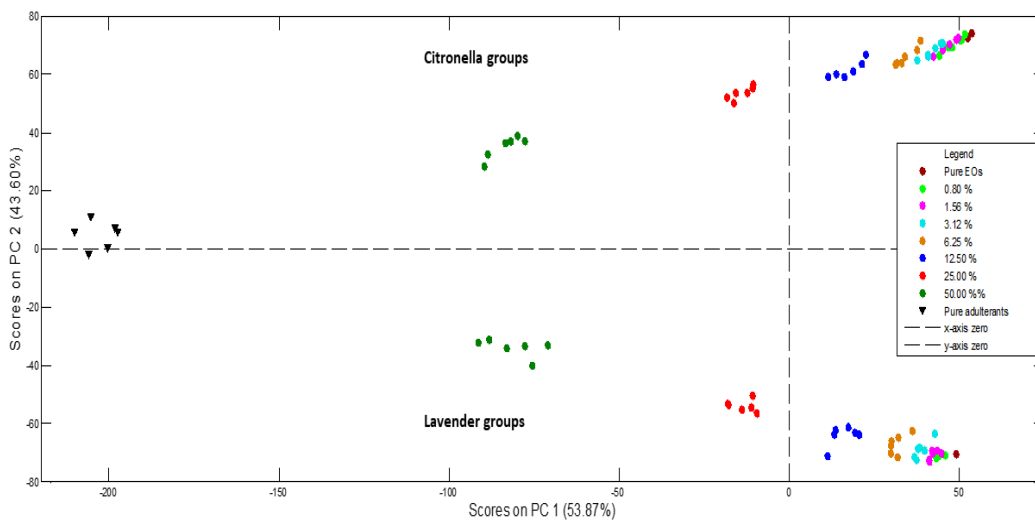


Figura 2. Analisi delle componenti principali (PCA) di citronella e lavanda

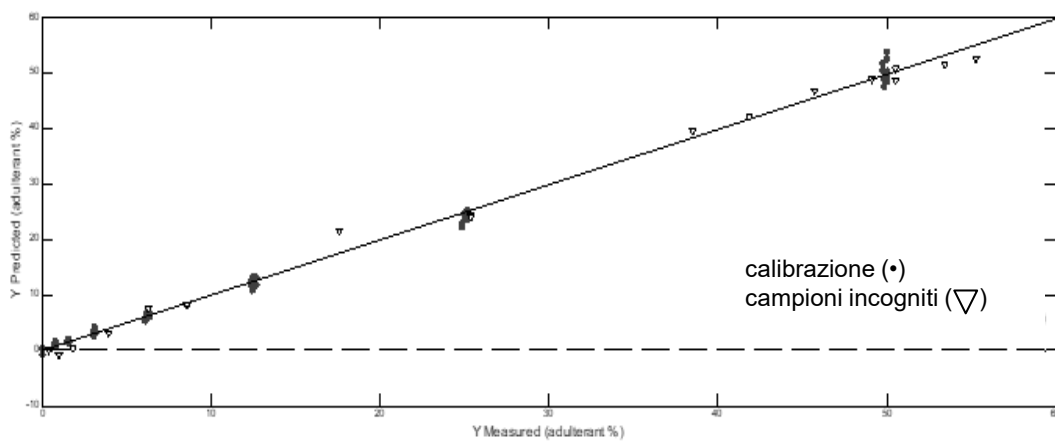


Figura 3. Modello di regressione *Partial Least Squares regression* (PLS)

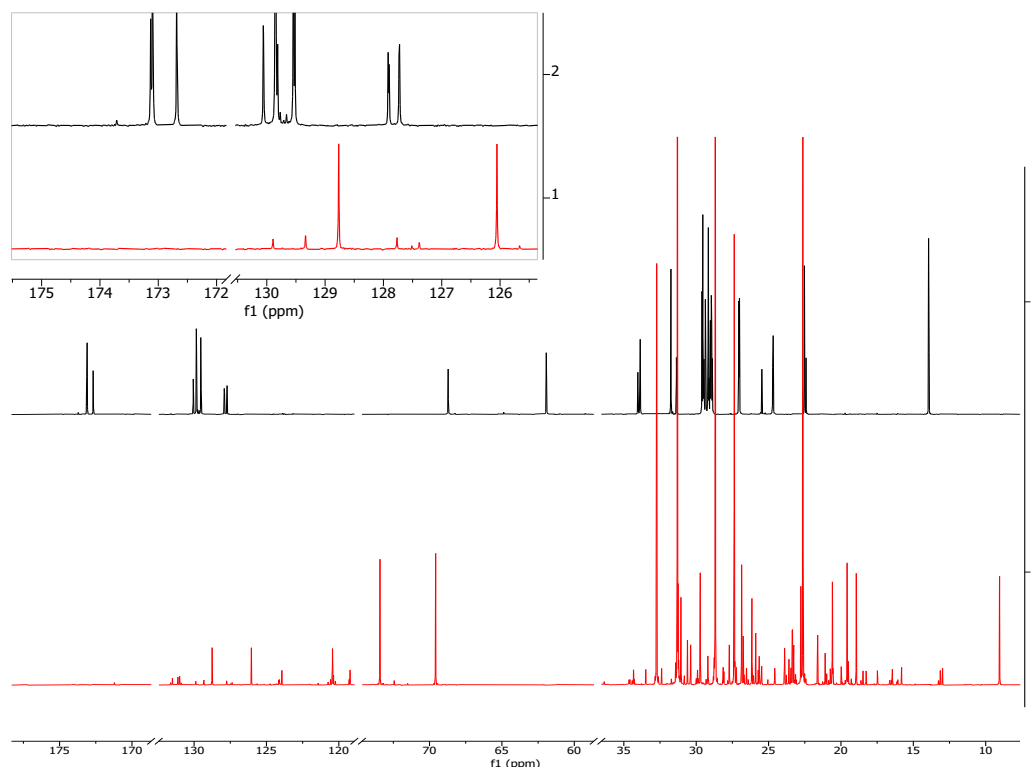


Figura 4. Spettro ^{13}C -NMR di OE di *Salvia rosmarinus* (rosso) e olio di soia (nero)

Conclusioni

La complessa natura degli OE rende l'analisi di queste miscele molto difficoltosa, inoltre la biosintesi dei metaboliti secondari è soggetta a importanti variazioni indotte dall'ambiente e dagli stress, anche all'interno dello stesso genere, specie e chemiotipo vegetale.

Questa estrema variabilità pone il problema di avere, per gli usi farmaceutici, OE a composizione standardizzata. Gli elevati costi di produzione, insieme a basse rese, inducono non di rado alla formulazione di OE non genuini, magari per arricchimento con componenti di origine sintetica e/o con addizione di altri oli.

Le moderne tecniche chimico-analitiche, associate a metodiche statistiche di elaborazione dei dati, consentono di individuare tali adulterazioni, al fine di garantire i requisiti di qualità di fitoderivati (quali gli OE) per la tutela della salute e del benessere dell'uomo e degli animali.

Bibliografia

1. The European Pharmacopoeia Commission. *The European Pharmacopoeia* 10th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2021. P. 864.
2. Wagner H, Baldt S, Zgainski EM. *Plant drug analysis*, New York: Springer; 1996.

3. Truzzi E, Marchetti L, Bertelli D, Benvenuti S. Attenuated total reflectance–Fourier transform infrared (ATR–FTIR) spectroscopy coupled with chemometric analysis for detection and quantification of adulteration in lavender and citronella essential oils. *Phytochem Anal* 2021;32(6):907-920.
4. Truzzi E, Marchetti L, Benvenuti S, Ferroni A, Rossi MC, Bertelli D, Novel strategy for the recognition of adulterant vegetable oils in essential oils commonly used in food industries by applying ¹³C-NMR spectroscopy. *J Agric Food Chem* 2021;28;69(29):8276-286.

OLI ESSENZIALI: POTENZIALI CANDIDATI PER IL TRATTAMENTO ANTIFUNGINO?

Francesca Mondello (a, b*), Maura Di Vito (c)

(a) Società Italiana per la Ricerca sugli Oli Essenziali, Roma

(b) Dipartimento Malattie Infettive, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(c) Dipartimento di Scienze Biotecnologiche di Base, Cliniche Intensivologiche e Perioperatorie, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

Introduzione

Le infezioni fungine rappresentano un problema crescente in tutto il mondo in quanto contribuiscono sostanzialmente alla morbilità e alla mortalità umana (CDC, 2019).

Purtroppo l'impatto di queste malattie sulla salute umana è ancora un argomento trascurato, nonostante la richiesta di attenzione da parte dei ricercatori e delle autorità del campo della salute pubblica.

I dati riguardanti la prevalenza e l'incidenza delle infezioni fungine sistemiche e mucosali sono difficili da reperire per scarsa "performance" dei test diagnostici e per carenza di regolari sistemi di sorveglianza nazionale, in quanto non sono malattie notificabili. Si hanno solo delle indagini pubblicate su riviste internazionali dalle quali si può evincere che le infezioni sistemiche fungine, soprattutto quelle causate da *Candida* e da *Aspergillus* spp., in minore entità da *Cryptococcus* spp. e pochi altri funghi filamentosi costituiscono gravi infezioni nei soggetti normali e soprattutto in quelli immunocompromessi.

Quindi, attualmente, la ricerca sulla fisiopatologia delle infezioni fungine umane è molto in ritardo rispetto a quella delle infezioni causate da altri agenti patogeni, nonostante ci sia urgente necessità di test diagnostici efficienti, di nuovi farmaci e di vaccini sicuri ed efficaci (Brown, 2012).

Ci sono milioni di specie fungine in natura, ma solo poche centinaia di esse risultano patogene per l'uomo (Horn, 2012; CDC, 2019).

In generale le infezioni fungine gravi si verificano come conseguenza di altri problemi di salute tra cui asma, AIDS, cancro, trapianto di organi, terapie con corticosteroidi e attualmente anche con la malattia da coronavirus SARS-CoV-2 (COVID-19) (CDC, 2021a; Lahmer, 2021).

Le infezioni fungine umane possono essere classificate in base al livello di penetrazione e diffusione dell'agente infettante nei tessuti e alle caratteristiche specifiche del microrganismo in: micosi superficiali, micosi cutanee, micosi sub-cutanee, micosi opportunistiche, micosi sistemiche e/o profonde (Mondello, 2008).

Cenni di epidemiologia

Le infezioni fungine colpiscono oltre un miliardo di persone, con tassi di mortalità stimati in 1-2 milioni di persone all'anno (Brown, 2012). In particolare, in un articolo di Bongomin del 2017, si stima che quasi un miliardo di persone abbiano infezioni fungine della pelle, delle unghie

* in quiescenza dal 1° luglio 2020

e dei capelli, molte decine di milioni presentino candidosi mucosali e più di 150 milioni di persone abbiano gravi malattie fungine con un impatto importante sulla loro vita o fatali. La gravità varia da infezioni muco-cutanee e asintomatiche lievi a infezioni sistemiche potenzialmente letali. Inoltre, la mortalità associata a malattie fungine risulta maggiore di 1,6 milioni di persone per anno, paragonabile a quella della tubercolosi e 3 volte maggiore rispetto a quella della malaria. Le caratteristiche socio-economiche, geo-ecologiche e il numero crescente di popolazioni a rischio sono i principali determinanti delle variazioni sull'incidenza e sulla prevalenza delle malattie fungine nel mondo (Bongomin, 2017).

Sebbene l'epidemiologia delle malattie fungine sia notevolmente cambiata negli ultimi decenni, le specie di *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis jirovecii*, e i funghi dimorfici endemici come *Histoplasma capsulatum* e *Mucormycetes* (CDC, 2021b) rimangono i principali patogeni responsabili della maggior parte dei casi di malattie fungine gravi. *Candida albicans* è il principale agente responsabile delle infezioni mucosali, *Aspergillus fumigatus* per la maggior parte delle infezioni fungine allergiche e *Trichophyton* spp., in particolare *T. rubrum*, per le infezioni della pelle.

Tra le infezioni fungine invasive potenzialmente letali in tutto il mondo prevalgono (Brown, 2012):

- Criptococcosi (*Cryptococcus neoformans*) con più di un 1.000.000 di casi/anno e tasso di mortalità dal 20 al 70%;
- Candidosi (*Candida albicans*) con più di 400.000 casi/anno e tasso di mortalità dal 46 al 75%;
- Pneumocistosi (*Pneumocystis jirovecii*) con più di 400.000 casi/anno e tasso di mortalità dal 20 all'80%;
- Aspergillosi (*Aspergillus fumigatus*) con più di 200.000 casi/anno e tasso di mortalità dal 30 al 95%.

Oltre l'80% dei pazienti potrebbe essere salvato dalla morte se si avessero a disposizione diagnosi fungine efficaci e agenti antimicotici potenti non tossici.

Purtroppo l'accertamento diagnostico tempestivo e la gestione di infezioni fungine gravi è sempre una grossa sfida, soprattutto in contesti con risorse limitate, poiché molti test diagnostici convenzionali sono lenti e il trattamento antifungino è spesso costoso e /o tossico e non ugualmente disponibile in tutti i Paesi. Altri fattori che influiscono sull'esito della malattia includono la "compliance" del paziente al trattamento a lungo termine, le interazioni farmaco-farmaco, l'esperienza clinica limitata e la comorbilità che riducono il potenziale di sopravvivenza e cura (Bongomin, 2017).

Resistenza ai farmaci antifungini

Il successo clinico per le infezioni fungine invasive, associate ad alta mortalità, richiede quindi una diagnosi precoce e un'efficace terapia antifungina. Attualmente, le opzioni antifungine per il trattamento delle malattie fungine sono ancora limitate. Inoltre, sussiste il grave problema della tossicità del farmaco a causa della comune struttura eucariotica delle cellule fungine e animali. Nell'ultimo decennio, lo sviluppo di farmaci meno tossici ha portato a un maggiore uso di tali rimedi in termini di profilassi, terapia ripetuta o a lungo termine, ma ovviamente ha portato anche alla comparsa di resistenza alla terapia.

Allo stesso modo, l'esposizione a fungicidi in agricoltura con identici bersagli molecolari a quelli degli antifungini sistemici ha selezionato serbatoi ambientali di organismi resistenti nelle specie di *Aspergillus* e questi ceppi resistenti si stanno diffondendo a livello globale.

Il grosso problema attuale è quindi la crescente resistenza ai farmaci tra i funghi. Secondo quanto riportato nell'articolo di Karpinsky del 2020, tra le specie *Candida* e *Aspergillus* è stata

osservata resistenza agli azoli, per esempio fluconazolo, voriconazolo e posaconazolo. Alcune specie di *Candida*, in particolare *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, possono essere sia resistenti a echinocandine, sia multiresistenti. È stata segnalata resistenza acquisita alle echinocandine anche per i lieviti *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae* e *C. dubliniensis*. Più del 3% degli isolati di *Aspergillus fumigatus* sono resistenti a uno o più azoli. La resistenza ai polieni riguarda principalmente l'amfotericina B.

La resistenza a questo farmaco è stata osservata in *Fusarium* spp., *Trichosporon* spp., *Aspergillus* spp. e *Sporothrix schenckii*. È stata rilevata resistenza all'amfotericina B anche per *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*. È da segnalare come nuovo problema epidemiologico la multiresistenza di *C. auris*, un lievito descritto per la prima volta in Giappone nel 2009. Recentemente, la presenza di *C. auris* è stata segnalata da 36 Paesi di sei continenti. Circa il 30% degli isolati mostra una ridotta suscettibilità all'amfotericina B e il 5% può essere resistente alle echinocandine. La mortalità stimata per fungemia da *C. auris* varia dal 28% al 60% (CDC, 2021c; ECDC, 2018).

Per riassumere, per poter superare problematiche come: gli effetti tossici delle terapie convenzionali antifungine; la scarsità di farmaci efficaci; l'elevato costo dei farmaci e della assistenza sanitaria; il crescente fenomeno della resistenza agli antifungini, in particolare nei pazienti immunocompromessi c'è l'assoluta urgente necessità di introdurre nuove strategie terapeutiche integrative o di supporto alle terapie antifungine note, che impieghino molecole sicure, efficaci ed economiche.

Oli Essenziali (OE)

Un notevole interesse si è riscontrato nell'ultimo ventennio per l'uso terapeutico di sostanze naturali, soprattutto di origine vegetale, in diverse patologie infettive, incluse quelle fungine, come potenziali candidati per la prevenzione e il trattamento di infezioni microbiche (Salam, 2018; Mondello, 2015).

Tra le varie sostanze naturali la letteratura scientifica ha da tempo evidenziato negli Oli Essenziali (OE) peculiari caratteristiche in termini di biodegradabilità, di esigua tossicità e di ampio spettro di attività biologiche, tra cui una potente attività antimicrobica. Gli OE sono complesse misture di sostanze vegetali volatili estratte da piante aromatiche e come tali sono parti integranti della fitoterapia, medicina complementare riconosciuta dalla World Health Organization (WHO) e in Italia, secondo accordo del 13 febbraio 2013 tra Stato e Regioni.

La Farmacopea Europea (*European Pharmacopoeia Commission*, 10° edizione, 2021) definisce gli OE come: "Prodotti odorosi, solitamente di composizione complessa, ottenuti da una materia prima vegetale botanicamente definita, attraverso distillazione in corrente di vapore, distillazione a secco o un appropriato processo meccanico senza riscaldamento".

Gli OE sono di solito separati dalla fase acquosa attraverso un processo fisico che non influenza significativamente la loro "composizione".

Ai fini della qualità degli OE sono assolutamente necessari i seguenti requisiti: identità, sicurezza, efficacia. L'identità di un OE richiede la conoscenza della specie botanica che è stata utilizzata per il suo ottenimento e la definizione dei composti che ne caratterizzano la composizione chimica (*marker*, chemotipo).

L'aspetto della sicurezza d'impiego dipende sempre dalla composizione chimica e dall'attenta individuazione della concentrazione dei vari componenti dell'OE tramite tecniche analitiche di tipo cromatografico e spettroscopico. La dimostrazione dell'efficacia dipenderà dai risultati di studi rigorosi che dovranno definire, se possibile, gli eventuali componenti biologicamente attivi (Bicchi, 2015).

La conoscenza approfondita delle caratteristiche chimiche degli OE è quindi necessaria per effettuare uno studio rigoroso scientifico, se si vuole ottenere da essi il massimo rendimento terapeutico ed evitare spiacevoli reazioni collaterali. La ditta produttrice deve sempre fornire le caratteristiche chimiche di un OE tramite: scheda tecnica e certificato di analisi (numero di lotto).

Tali riferimenti fondamentali permetteranno di rapportarsi alle caratteristiche previste dalla Farmacopea Europea, documento imprescindibile da un punto di vista legale, per consentire la prescrizione medica, l'utilizzo clinico degli OE e la formulazione di presidi terapeutici per scopi medici. Gli OE da usare a scopo terapeutico non potranno quindi che essere quelli contemplati nella Farmacopea Europea (Camporese, 2013).

Gli attuali studi scientifici sugli OE nell'ambito delle infezioni microbiche riguardano soprattutto l'attività antimicrobica *in vitro*, il meccanismo di azione, l'attività antimicrobica *in vivo* e in minor misura la sicurezza e la tossicologia (D'Agostino, 2019; Lang, 2012).

Attività antifungina degli OE *in vitro*

Un grande numero di OE e loro costituenti sono stati ben caratterizzati *in vitro* sia in forma liquida che gassosa, per la loro attività nei confronti di lieviti, dermatofiti e altri funghi filamentosi.

In generale l'attività antimicrobica *in vitro* varia da un microrganismo all'altro e da un OE all'altro, ma è sempre dose-dipendente e inoltre è strettamente connessa alla composizione chimica e alla concentrazione dei loro costituenti, che non dipendono solo dalla specie e dall'organo produttore della pianta, ma anche da vari altri fattori quali: tempo balsamico, impiego di fertilizzanti e/o erbicidi, tecnica estrattiva, eventuale rettificazione o deterpenazione, modalità di conservazione, ecc.

Sono presenti in letteratura anche numerosi studi sull'uso degli OE e dei loro componenti, in combinazione con farmaci convenzionali, che risultano promettenti per poter contrastare, con dosi meno tossiche, la farmacoresistenza microbica (Ayaz, 2019).

Vi sono però delle limitazioni nella valutazione in generale dell'attività antimicrobica *in vitro* in quanto la comparazione dei dati scientifici rimane spesso problematica a causa del vasto numero di metodologie usate e l'assenza di una loro standardizzazione insieme ai valori soglia (*breakpoint*) secondo le direttive internazionali – *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) e *The Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI). Spesso gli OE non rispondono ai requisiti di buona qualità, in quanto si tratta di miscele poco definite di vari composti.

Inoltre, gli OE presentano caratteristiche fisico-chimiche peculiari quali volatilità, bassa solubilità in acqua, e bassa stabilità chimica, ma tali problematiche sembra si possano superare con le nanotecnologie. Le nano-particelle funzionalizzate con OE hanno infatti un potenziale antimicrobico significativo *in vitro*, sia a causa di un aumento della stabilità chimica e della solubilità, ma anche a causa della diminuzione della rapida evaporazione e della degradazione dei componenti volatili attivi dell'OE. Il loro rilascio controllato e prolungato inoltre ne aumenterebbe la biodisponibilità e l'efficacia contro i microrganismi (Rai, 2017).

Molti autori (Lang, 2012; D'Agostino, 2019; Karpinsky, 2020) mettono in evidenza l'attività antifungina *in vitro* di molti OE. Nel 2019 D'Agostino, in un suo articolo, ha selezionato in letteratura alcuni OE e loro componenti per il loro comprovato effetto antifungino e per il loro uso frequente (Tabella 1), mettendo a paragone le loro Minime Concentrazioni Inibenti (MIC) con quelle di antimicotici convenzionali di riferimento, quando quest'ultime sono rilevate.

Inoltre, cosa degna di nota, lo stesso autore ha riportato i variegati valori di misura dell'attività antifungina degli OE riscontrati in letteratura a un'unica unità, consentendo quindi una maggiore e rapida confrontabilità dei dati ottenuti.

**Tabella 1. Esempi selezionati di oli essenziali ad attività antifungina
(rielaborata e modificata da D'Agostino et al. 2019)**

Olio essenziale (OE)	Famiglia botanica	Principali componenti	Parti della pianta da cui si trae OE	Alcune specie fungine patogene testate	MIC con valori convertiti a un'unica unità di misura	Rif.
Cannella <i>Cinnanomum verum</i>	Lauraceae	cinnamaldeide	foglie scorza semi	<i>Candida</i> spp.	250-1000 µg/mL	Essid et al. 2017
				<i>Fusarium</i> spp.	31,25-500 µg/mL	Homa et al. 2015
Chiodi di garofano <i>Syzygium aromaticum</i>	Myrtaceae	1,8- cineolo, eugenolo	boccioli dei fiori essiccati	<i>Candida</i> spp.	125-250 µg/mL	Essid et al. 2017
Cumino <i>Cuminum cyminum</i>	Apiaceae	cuminaldeide, cimene, gamma- terpinene, 1,8- cineolo	parte aerea	<i>C. albicans</i>	3,90-11,71 µg/mL	Minoeianh aghghi et al. 2017
Eucalipto <i>Eucaliptus camaldulensis</i>	Myrtaceae	p-cimene, 1,8- cineolo	foglie	<i>P. funiculosum</i> <i>A. niger</i> <i>A. flavus</i>	0,15 mg/mL 0,47 mg/mL 0,43 mg/mL	Elansary et al. 2017
Eucalipto <i>Eucaliptus citriodora</i>	Myrtaceae	citronello, citronellale	foglie	<i>C. albicans</i>	318 µg/mL	Dutta et al. 2007
Geranio <i>Pelargonium graveolens</i>	Geraniaceae	geraniolo, citronello	parte aerea	<i>Candida</i> spp.	250-1000 µg/mL	Essid et al. 2017
Lavanda <i>Lavandula angustifolia</i>	Lamiaceae	linalolo, linalil acetato	parte aerea	<i>C. albicans</i>	445 µg /mL	D'Auria et al. 2005
Menta <i>Mentha piperita</i>	Lamiaceae	linalolo, mentolo, piperitone	infiorescenze	<i>C. albicans</i> <i>A. niger</i>	800 µg/mL 222 µg/mL	Stringaro et al. 2018
Menta <i>Mentha pulegium</i>	Lamiaceae	pulegone, piperitone	infiorescenze	<i>C. albicans</i> <i>A. niger</i>	1 mg/mL 250 mg/mL	Mahboubi et al. 2008
Origano <i>Origanum vulgare</i>	Lamiaceae	timolo, carvacrolo, sabinene, linalolo	foglie	<i>C. albicans</i> <i>A. niger</i>	1,48-1,75 mg/mL 2,75-2,85 mg/mL	Santoyo et al. 2006
Rosmarino <i>Rosmarinus officinalis</i>	Lamiaceae	1,8 cineolo, canfora, alfa pinene	parte aerea foglie	<i>C. albicans</i>	24-31 mg/mL	Ksouri et al. 2017
					0,78 mg/mL	de Oliveira et al. 2017a
Tea Tree- <i>Melaleuca alternifolia</i>	Myrtaceae	terpinen-4-olo	foglie	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Candida</i> spp.	1,60-200 µg/mL 3-800 µg/mL	Carson et al. 2006
Timo <i>Thymus pulegioides</i>	Lamiaceae	timolo, carvacrolo	foglie, parte aerea	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Dermatofiti</i> <i>Candida</i> spp.	160-640 µg/mL	Pinto et al. 2006
Timo <i>Thymus vulgaris</i>	Lamiaceae	timolo, carvacrolo, p-cymene	foglie, parte aerea	<i>Candida albicans</i> <i>Candida tropicalis</i>	62 µg/mL	Ahmad et al. 2014

Nel 2020 Karpinsky ha riportato che più della metà degli OE delle piante (72) della famiglia delle Lamiaceae ha una buona attività antifungina (MIC <1000 µg/mL). La migliore attività (MIC <100 µg/mL) si ha in OE di alcune specie dei generi *Clinopodium*, *Lavandula*, *Mentha*, *Thymbra* e *Thymus*. In alcuni casi sono state osservate discrepanze significative tra diversi studi. I componenti chimici che si trovano più comunemente includono β-cariofillene (41 piante), linalolo (27), limonene (26), β-pinene (25), 1,8-cineolo (22), carvacolo (21), α-pinene (21), p-cimene (20), γ-terpinene (20) e timolo (20).

Molta letteratura mostra che una vasta gamma di lieviti, dermatofiti e altri funghi filamentosi sono sensibili soprattutto all'OE di *Melaleuca alternifolia* (*Tea Tree Oil*, TTO). In Tabella 2 vengono riportati intervalli dei valori dell'attività del TTO nei confronti delle varie specie fungine ottenuti tramite varie referenze reperibili nel lavoro di Carson CF *et al.* del 2006. Sebbene le metodologie differiscano, le MIC generalmente sono tra 0,03 e 0,5% v/v e le Minime Concentrazioni Fungicide (MFC) generalmente variano da 0,12 a 2% v/v. L'eccezione è costituita dalla muffa *Aspergillus niger* con MFC 8% v/v. Tuttavia, questi saggi sono stati effettuati con i conidi fungini di cui è nota la relativa impervietà agli agenti chimici; i conidi germinati risultano più sensibili al TTO (Carson, 2006).

Tabella 2. Attività *in vitro* dell'olio essenziale di *Melaleuca alternifolia* (TTO) nei confronti di varie specie fungine. Rielaborata da Carson CF *et al.*, 2006*

Specie fungina	Minima Concentrazione Inibente MIC% (v/v) **	Minima Concentrazione Fungicida MFC% (v/v) **
<i>Alternaria</i> spp.	0,016-0,12	0,06-2
<i>Aspergillus flavus</i>	0,31-0,7	2-4
<i>A. fumigatus</i>	0,06->2	1-2
<i>A. niger</i>	0,016-0,4	2-8
<i>Blastoschizomyces capitatus</i>	0,25	
<i>Candida albicans</i>	0,06-8	0,12-1
<i>C. glabrata</i>	0,03-8	0,12-0,5
<i>C. parapsilosis</i>	0,03-0,5	0,12-0,5
<i>C. tropicalis</i>	0,12-2	0,25-0,5
<i>Cladosporium</i> spp.	0,008-0,12	0,12-4
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,015-0,06	
<i>Epidermophyton floccosum</i>	0,008-0,7	0,12-0,25
<i>Fusarium</i> spp.	0,008-0,25	0,25-2
<i>Malassezia furfur</i>	0,03-0,12	0,5-1,0
<i>M. sympodialis</i>	0,016-0,12	0,06-0,12
<i>Microsporum canis</i>	0,03-0,5	0,25-0,5
<i>M. gypseum</i>	0,016-0,25	0,25-0,5
<i>Penicillium</i> spp.	0,03-0,06	0,5-2
<i>Rhodotorula rubra</i>	0,06	0,5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,25	0,5
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	0,11-0,44	0,25-0,5
<i>T. rubrum</i>	0,03-0,6	0,25-1
<i>T. tonsurans</i>	0,004-0,016	0,12-0,5
<i>Trichosporon</i> spp.	0,12-0,22	0,12

* Gli intervalli dei valori dell'attività antifungina *in vitro* sono tratti da varie referenze reperibili in Carson CF *et al.*, 2006

Meccanismo d'azione antifungina degli OE

Il preciso meccanismo d'azione degli OE non è stato ancora delucidato. In generale, sembrerebbe che gli OE agiscano a più livelli, a seconda della concentrazione dell'OE. Nella

letteratura viene riscontrato che sembrano essere particolarmente colpite la membrana plasmatica e la parete cellulare e infatti il primo effetto durante il contatto con un OE viene riscontrato sulla morfologia dei funghi (de Oliveira *et al.*, 2017b). Vari studi mostrano anche una perdita dell'integrità della membrana e una diminuzione della quantità di ergosterolo (componente principale della membrana fungina), nonché un'inibizione nella formazione della parete. Gli OE hanno anche un'azione inibente sulle ATPasi di membrana e sulle interazioni tra le varie citochine (Shreaz *et al.*, 2016a), i mitocondri e il reticolo endoplasmatico sembrano essere siti importanti nei loro meccanismi di azione (Figura 1). Infine, sembra essere influenzata l'espressione di un certo numero di geni, in particolare, i geni coinvolti nell'adesione, nella crescita, nel dimorfismo, nella sporulazione, ecc. Attualmente per spiegare i meccanismi d'azione si hanno solo dati preliminari.

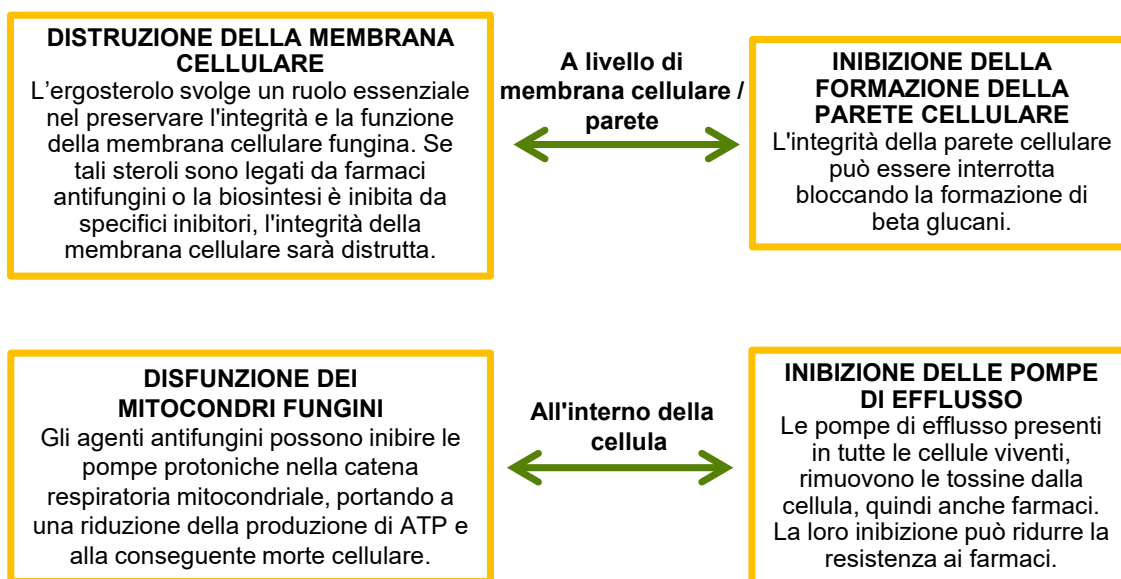


Figura 1. Meccanismo di azione antifungina degli oli essenziali (rielaborata e tradotta da Nazzaro *et al.*, 2017)

Effetti sinergici antifungini degli OE

La combinazione di molecole antifungine convenzionali con alcuni componenti dell'OE potrebbe essere utile per realizzare un sinergismo, cioè avere un effetto comune superiore a quello delle singole molecole. Inoltre, un effetto sinergico tra due composti potrebbe ridurre la dose da utilizzare e quindi ridurre la tossicità per l'uomo e i potenziali effetti collaterali di entrambi i composti, oltre a contrastare la farmaco-resistenza. I risultati variano in base al microrganismo, al farmaco convenzionale e all'OE. L'indice di concentrazione inibitoria frazionaria (FICI) stima l'interazione tra due o più composti al fine di determinare il risultato combinato di diverse molecole. Un valore inferiore a 0,5 denota sinergismo, un valore maggiore di 4 mostra antagonismo e tra questi due valori (0,5-4) la combinazione è considerata indifferente. Questo valore FICI è quindi variabile a seconda delle molecole testate, ma anche delle specie bersaglio. Diversi meccanismi sembrano essere coinvolti nell'effetto sinergico degli antimicotici, tra i quali l'inibizione simultanea di diversi bersagli cellulari (Johnson, 2004) e di diversi stadi nelle vie intracellulari fungine che sono essenziali per la sopravvivenza cellulare. Sebbene gli studi si concentrino spesso sui componenti principali degli OE, i componenti minoritari della miscelac

svolgono comunque vari ruoli, in particolare determinano la natura lipofila o idrofila, e quindi la capacità dell'OE di penetrazione cellulare o la sua distribuzione all'interno della cellula. Ciò implica che lo studio dell'intero OE sarebbe più informativo sull'effetto antimicrobico rispetto allo studio di un singolo componente (Bakkali, 2008). Diversi studi mostrano una maggiore efficacia antimicrobica dell'intero OE rispetto al singolo componente principale. La combinazione del composto principale e degli altri componenti rimanenti dell'OE potrebbe avere un effetto sinergico o un'influenza potenziante. D'altra parte, alcuni composti minoritari possono avere l'effetto di diminuire la capacità sinergica del composto principale, come fanno l'alfacimene e il delta-terpinene con il timolo (Khan, 2011).

Attività antifungina *in vivo* degli OE: studi preclinici e clinici

Gli studi preclinici, effettuati sugli animali, costituiscono un valido supporto sperimentale per studi di sicurezza d'uso e di efficacia degli OE nelle infezioni microbiche umane. La maggior parte di queste indagini sono focalizzate sull'efficacia dell'olio essenziale di *Melaleuca alternifolia* (TTO, *International Standard*) e pochi studi sono stati pubblicati per altri OE e componenti. Per quanto riguarda le micosi, vengono prese in considerazione soprattutto infezioni mucosali o sistemiche da *Candida* spp. (Manohar, 2001; Mondello, 2003; Mondello, 2006; Chami, 2004; Chami, 2005; Pietrella, 2011; Wang, 2020) infezioni cutanee da dermatofiti (Tiwari, 2003; Sokovic, 2008; Pisseri, 2009; Nardoni *et al.*, 2017) e da *Malassezia* spp. (Nardoni, 2014; Nardoni, 2017). Nella maggior parte degli studi, gli OE sono stati applicati localmente in soluzione o crema. Tuttavia, in uno studio (aspergillosi nel topo) viene usata come via di somministrazione dell'OE l'inalazione (Hood, 2010) e in un altro (*tinea pedis* nella cavia) il vapore (Inouye, 2001).

È da sottolineare che gli studi presi in considerazione dalla letteratura coprono una vasta gamma di infezioni fungine che si verificano in una varietà di animali domestici e di laboratorio e che, nonostante l'eterogeneità presente negli studi, la maggior parte ha mostrato un esito clinico positivo. Questo indica che gli OE potrebbero essere degli agenti terapeutici potenziali negli animali, con eventuale potenzialità di uso anche nell'uomo, ovviamente dopo conferme di ulteriori studi di efficacia e sicurezza di uso.

Gli studi clinici riguardanti infezioni fungine nell'uomo trattate con OE, riscontrati in letteratura, sono riportati nelle Tabelle 3, 4 e 5 con relativa bibliografia. La maggior parte degli studi clinici pregressi non sono stati condotti secondo gli standard oggi in uso (per progettazione e per metodologia), di conseguenza non sono confrontabili con gli studi clinici sui trattamenti convenzionali e non sono stati presi in considerazione.

Gli attuali studi clinici in ambito umano, con OE, sono promettenti, in quanto hanno mostrato che questi prodotti di origine vegetale presentano: un'efficacia uguale o di poco inferiore al trattamento convenzionale standard; una migliore efficacia rispetto al placebo e in generale un miglioramento dei sintomi clinici, comportando anche guarigione micologica.

Rispetto ai trattamenti convenzionali antifungini gli OE presenterebbero il vantaggio di essere meno costosi, in particolare se gli OE in formulazione vengono classificati come farmaci da banco, e di avere bassi livelli di reazioni avverse (principalmente irritazione della pelle o dolore lieve negli studi sull'uomo).

Inoltre, a causa della natura complessa e della composizione dei costituenti bioattivi presenti negli OE, le modalità di trattamento con OE possono poi comportare un rischio inferiore per lo sviluppo di resistenza ai funghi. Sono comunque senz'altro necessari ulteriori studi randomizzati e controllati ben progettati per determinare l'efficacia e la sicurezza dei trattamenti con OE, in particolare studi di conferma su una popolazione più ampia in cui si valuti: la concentrazione finale ottimale dell'OE, la formulazione del prodotto; la durata e la frequenza del trattamento; eventuali effetti avversi; il costo-efficacia del potenziale trattamento terapeutico con gli OE.

Tabella 3. Studi clinici con oli essenziali nei confronti di infezioni mucosali e cutanee da *Candida* spp.

Tipo di studio	Popolazione valutata / reclutata	Gruppi di trattamento (n. pz valutati)	Trattamento e durata	Risultati	Eventi avversi	Rif.
Studio clinico singolo cieco controllato randomizzato	18/25 pz anziani per valutare la riduzione dei livelli di accumulo di placca e di microbi patogeni (tra cui specie di <i>Candida</i>) a livello orale	Gruppo test collutorio commerciale senza alcol a base di componenti di OE* (n.9) Gruppo controllo acqua di rubinetto (n.9)	Sciacqui 2 v/die dopo i pasti con 15 mL per 30 s per 45 gg	Gruppo con collutorio non superiore al gruppo controllo nel prevenire l'accumulo di placca e diminuire i livelli di patogeni orali. Non significativo ($P > 0,05$)	no	Chalhoub <i>et al.</i> 2016
Studio pilota	9/13 pz con candidosi vaginale e positivi per la presenza di <i>Candida</i>	Gruppo trattamento 1 probiotici <i>per os</i> <i>L. acidophilus</i> e <i>S. boulardii</i> rispettivamente a $2,5^6$ e 4^6 CFU/cps (n.9) Gruppo trattamento 2 probiotici <i>per os</i> + supposte vaginali a base di TTO (n.4)	2 cps/die probiotici <i>per os</i> per 15 gg. Dopo 1° trattamento se pz positivi per <i>Candida</i> : 2 cps/die probiotici <i>per os</i> + supposte vaginali TTO 1 v/die prima di coricarsi per altri 15 gg per 3 mesi	Dopo 1° trattamento 55,5% pz (5/9) è negativo per coltura fungina. Dopo 2° trattamento aggiuntivo 50% pz (2/4) è negativo. % totale pz negativi 77,7% (7/9). Tutti i pz al termine dei trattamenti hanno riportato la scomparsa dei sintomi e un generale miglioramento	no	Di Vito <i>et al.</i> 2016
Studio pilota	18/40 pz con diagnosi clinica di onicomicosi dell'alluce (da dermatofiti, muffe e lieviti)	Pomata commerciale a base di timolo, mentolo, canfora e OE di eucalipto (n.18)	1 v/die per 48 sett. pz seguiti a intervalli di 4, 8, 12, 24, 36 e 48 sett.	Cura micologica e clinica parziale o completa a 48 sett. in 15/18 pz (83%). Solo il 27,8% è stato curato. Tutti i partecipanti erano "soddisfatti" (n.9) o "molto soddisfatti" (n.9).	no	Derby <i>et al.</i> 2011
Studio clinico doppio cieco controllato randomizzato	80 pz con diagnosi clinica di candidosi orale (stomatite da protesi) e positivi per la presenza di <i>C. albicans</i>	Gruppo trattamento con OE <i>Pelargonium graveolens</i> in gel (n.40) Gruppo controllo con placebo con solo gel (n.40)	2 v/die (mattina e sera) per 14 gg	Gruppo trattamento 34% miglior. totale, 56% miglior. parziale, 10% nessun miglior. Gruppo di controllo 5% miglior. totale, 25% miglior. parziale, 70% nessun miglior. Riduzione statisticamente significativa di n. CFU e segni e sintomi della candidosi orale in relazione al placebo ($P < 0,0001$)	no	Sabzghabae <i>et al.</i> 2011

Tipo di studio	Popolazione valutata / reclutata	Gruppi di trattamento (n. pz valutati)	Trattamento e durata	Risultati	Eventi avversi	Rif.
Studio clinico controllato randomizzato	27/118 pz con diagnosi clinica di candidosi orale (stomatite da protesi) e positivi per la presenza di <i>C. albicans</i>	Gruppo 1 TTO ≤ 20% + CT (n.9) Gruppo 2 Nistatina + CT (n.9) Gruppo Placebo CT puro (n.9)	Per 12 gg i pz dormono con la protesi condizionata e sciacquano la protesi solo con acqua fredda per pulirla.	Sia TTO che nistatina miscelati con CT sono stati efficaci nel produrre una remissione clinica e micologica della stomatite ($P \leq 0,001$). I dati statistici suggeriscono che l'eliminazione di <i>C. albicans</i> è più rapida con <i>M. alternifolia</i> rispetto alla nistatina	no	Catalán <i>et al.</i> 2008
Studio clinico controllato aperto randomizzato	24 pz con diagnosi clinica di candidosi orale (stomatite da protesi) e positivi per la presenza di <i>C. albicans</i>	Gruppo 1 <i>Zataria multiflora</i> Boiss gel 0,1% (n.12) Gruppo 2 Miconazolo gel 2% (n.12)	Il gel è stato applicato alla base della protesi 4 v/die per 4 sett.	Il gel <i>Z. multiflora</i> ha ridotto l'eritema superficiale del palato in modo più efficiente rispetto al gel di miconazolo, ma non ha ridotto il numero di colonie sulla superficie della protesi con la stessa efficacia del miconazolo. Riduzione statisticamente significativa del numero di CFU e dei segni e sintomi della candidosi orale nei due gruppi. Nessuna differenza significativa tra i due gruppi	no	Amanlou 2006
Studio clinico aperto singolo randomizzato	27 pz sieropositivi AIDS con candidosi orale refrattaria al fluconazolo	Gruppo 1 15 mL soluz. alcolica orale a base di TTO** (n.13) Gruppo 2 5 mL soluz. non alcolica orale a base di TTO** (n.14)	4 v/die 30-60 s per 2-4 sett.	Risposta micologica e clinica in: 58% (soluz. alcolica) 54% (soluz. non alcolica)	66,7% (soluz. alcolica) 15,4% (soluz. non alcolica)	Vasquez <i>et al.</i> 2002
Studio clinico aperto	12/13 pz sieropositivi AIDS con candidosi orale refrattaria al fluconazolo	Gruppo 1 15 mL soluz. orale a base di TTO** (n.12)	Sciacqui 4 v/die 30-60 s per 2-4 sett.	Dopo quattro sett.: 67% risposta clinica 58% risposta globale (risposta micologica + risposta clinica)	no	Jandourek <i>et al.</i> 1998

* mentolo; timolo; eucaliptolo; metilsalicilato; fluoruro di sodio

**Preparazioni commerciali a base di TTO con concentrazione sconosciuta. Le formulazioni sembrano essere terapie alternative efficaci in caso di candidosi resistente

CT: Condizionatori tissutali: materiali acrilici morbidi per impronte, usati anche per facilitare la guarigione di tessuti molli edentuli danneggiati (stomatite da protesi); **UFC** Unità Formanti Colonia; **pz:** pazienti; **v/die:** volte al giorno

Tabella 4. Studi clinici con oli essenziali nei confronti di infezioni da *Malassezia* spp.

Tipo di studio	Popolazione valutata/arruolata	Gruppi di trattamento (n. pz valutati)	Trattamento e durata	Risultati	Eventi avversi	Rif.
Studio clinico	120 pz con <i>Pitiriasi versicolor</i> con lesioni ipo- e iperpigmentate da <i>Malassezia</i> spp.	TTO 1 -veicolato in membrana amniotica umana (HAM)* (n.48 con lesioni ipo-pigmentate) Tioconazole 2 1% in crema (n.48 con lesioni ipo-pigmentate) TTO 3 (HAM) (n.12 con lesioni iper-pigmentate) Tioconazole 4 1% in crema (n.12 con lesioni iper-pigmentate)	TTO 1 -veicolato in HAM Una volta/sett per 8 sett. Tioconazole 2 2 v/die per 8 sett.	Il trattamento con TTO-veicolato in HAM per curare le lesioni ipo-pigmentate risulta superiore in confronto al trattamento con tioconazole, in concordanza con i dati microbiologici, quindi altamente significativo ($P<0,001$). Per le lesioni iper-pigmentate si ha efficacia per entrambi i trattamenti senza differenza significativa tra i gruppi trattati	no	Nashwa 2020
Studio clinico randomizzato in doppio cieco	74/90 pz con forfora da <i>Malassezia</i> spp.	Soluzione 1 con <i>Myrtus communis</i> L. al 2% (n.37)** Placebo 2 Shampoo 3 al ketoconazole 2% (n.37) Placebo 4	8 volte in un mese	Entrambi i gruppi hanno mostrato un miglioramento altamente significativo ($P<0,001$). Non c'erano differenze significative tra i gruppi in termini di efficacia, tasso di soddisfazione ed effetti collaterali. ($P> 0,05$ per ciascun risultato)	In 8 pz (11%), ma nessuna differenza significativa tra i gruppi ($P> 0,05$)	Chaijan et al. 2018
Studio clinico randomizzato in doppio cieco	30 pz con forfora da <i>Malassezia</i> spp.	Formulazione 1 15% OE di citronella (<i>Cymbopogon flexuosus</i>) in tonico per capelli (n.10) Formulazione 2 10% OE (n.10) Formulazione 3 5% OE (n.10) Placebo 4 solo tonico base	5 gocce di OE 2 v/die (mattina e sera) per 2 sett. in metà della testa e placebo (solo tonico base) nell'altra metà testa per 14 gg	OE di citronella al 10% ha ridotto la forfora del 75% a 7 gg ($P<0,005$) e dell'81% a 14 gg ($P<0,005$) Significativo	no	Chaisripipat et al. 2015
Studio clinico randomizzato in doppio cieco	42/54 pz con dermatite seborroica	Gel 5% TTO 2 (n.21) Placebo 2 (veicolo hydroxypropyl cellulose) (n.21)	3 v/die per 4 sett.	Miglioramento di eritema, desquamazione, prurito, croste Significativo ($P<0,05$)	no	Beheshti et al. 2014

Tipo di studio	Popolazione valutata/arruolata	Gruppi di trattamento (n. pz valutati)	Trattamento e durata	Risultati	Eventi avversi	Rif.
Studio clinico randomizzato	20 pz (fase I) + 76 pz (fase II) con <i>Pitiriasi versicolor</i> da <i>Malassezia</i> spp.	Cymbopogon citratus 1 OE 1,25 µl/mL Shampoo e crema (n.47) Ketoconazolo 2 2% Shampoo e crema (n.29) Nessun placebo 3	Crema 2 v/die Shampoo 3 volte a sett. per 40 gg	Tasso di guarigione micologica: Gruppo 1 OE <i>C. citratus</i> 60% ($P < 0,05$) Gruppo 2 ketoconazolo > 80% ($P < 0,05$) Entrambi i gruppi hanno mostrato un miglioramento significativo	no	Carmo <i>et al.</i> 2013
Studio clinico randomizzato in singolo cieco	126 pz con forfora da lieve a moderata da <i>Malassezia furfur</i>	5% TTO 1 Shampoo (n.63) Placebo 2 Shampoo (n.63)	1 v/die per 4 sett.	Gruppo 1 TTO 41,2%, Gruppo 2 Placebo 11,2% Significativo $P < 0,001$	no	Satchell <i>et al.</i> 2002

* HAM: *Human Amniotic Membrane*, tessuto placentare, con attività antimicrobiche e antinfiammatorie, utile come medicazione per la guarigione delle lesioni cutanee.

**Non è un vero e proprio OE, ma un herbal product preparato secondo la medicina tradizionale iraniana

Tossicità ed effetti collaterali degli OE

Sebbene gli OE presentino comprovate attività biologiche, non sono però privi di effetti collaterali, anche se molti componenti di questi prodotti sono generalmente riconosciuti come sicuri (*Generally Recognized as Safe*, GRAS) dalla *Food and Drug Administration* (FDA).

Infatti, 80 diversi OE possono essere responsabili di allergie o dermatiti (De Groot, 2016) e causare anche stomatite o ototossicità. La somministrazione sistemica dell'OE può causare neuro-epato-tossicità, irritazione renale e alterazioni della mucosa intestinale. Alcuni di essi, come gli OE di agrumi, possono anche essere fototossici. Questi effetti sono chiaramente correlati al dosaggio, alla composizione dell'OE (variabile a seconda della stagione o della pianta utilizzata), al modo di somministrazione, allo stato di salute della persona che lo utilizza o agli additivi presenti negli oli. Anche l'ossidazione dovuta alla conservazione dell'OE può svolgere un ruolo nella tossicità. Ad esempio, l'OE di *Melaleuca alternifolia*, come ogni OE, può causare irritazioni e allergie, ma quest'ultime sembrano verificarsi soprattutto nel caso di un OE mal conservato o vecchio (Carson, 2006). Un altro esempio è l'OE di *Cinnamomum zeylanicum* (cannella), che può causare lieve dolore, prurito o sensazione di bruciore e allergie da contatto (Shreaz *et al.*, 2016b). Diversi effetti collaterali sono già stati evidenziati dopo l'uso dell'OE di *Mentha piperita* L. Ad esempio, può causare nausea e vampate oltre a reazioni allergiche già attribuite ad altri OE. Questi effetti potrebbero essere dovuti alle interazioni farmacologiche causate dall'OE. Infatti, è noto che l'OE di *Mentha piperita* L. interferisce con il citocromo P450, che svolge un ruolo importante nel metabolismo dei farmaci (McKay, 2006). Uno studio *in vitro* sui fibroblasti ha permesso di dimostrare un effetto tossico dell'OE di *Syzygium aromaticum* (chiodi di garofano) a una concentrazione dello 0,03% (1,8 µM). Questa tossicità era principalmente dovuta all'eugenolo, un importante componente dell'OE di chiodi di garofano, che portava a danni alla membrana plasmatica o a un effetto apoptotico (Prashar, 2006). Altri danni sono stati rilevati quando gli OE sono somministrati a un'elevata concentrazione in studi *in vitro*. Ad esempio, sono stati rilevati

cambiamenti ultrastrutturali (segregazione nucleolare, degenerazione lipidica, mitocondri danneggiati) (D'Agostino, 2019).

Resistenza indotta dagli OE

Esistono pochi dati sulla resistenza indotta dagli OE, e in particolare sui funghi responsabili delle infezioni. La maggior parte degli studi riguardano batteri patogeni. Alcuni batteri hanno mostrato resistenza agli OE, ad esempio uno studio su *Pseudomonas aeruginosa* ha mostrato un aumento della tolleranza contro i componenti del TTO durante il contatto con una concentrazione sub-inibitoria (Papadopoulos, 2008). È stato anche dimostrato che la presenza di una concentrazione sub-inibitoria di un OE può influenzare la sensibilità dei batteri agli antibiotici (Langeveld, 2014). Ad esempio, la coltivazione di *Proteus mirabilis* nell'OE di *Origanum vulgare* ha aumentato la sensibilità all'ampicillina di 8 volte. Questo fenomeno dipende dalla specie e dall'olio studiati. Infatti, l'esposizione di *P. aeruginosa* all'OE di *Origanum vulgare* o all'OE di *Cinnamomum zeylanicum* non modifica la MIC per tutti gli antibiotici testati (Becerril, 2012). La resistenza indotta dagli OE è ancora poco conosciuta e richiede ulteriori studi. Attualmente è considerata generalmente debole, reversibile e dipendente dalle specie studiate e dall'olio studiato. Va inoltre presa in considerazione la possibilità di una resistenza innata di alcune specie (Piątkowska, 2016).

Conclusioni

Gli OE sono già ampiamente utilizzati in vari campi come la cosmetologia o l'industria alimentare e numerosi sono gli studi scientifici che ne hanno evidenziato e confermato anche i loro molteplici effetti biologici, soprattutto antimicrobici.

Per quanto riguarda le infezioni fungine, in letteratura gli studi preclinici dimostrano l'elevata attività antifungina degli OE verso *C. albicans* in modelli di infezione mucosale nella ratta, anche con l'uso di ceppi fungini resistenti ai comuni antimicotici, ma anche verso infezioni da funghi dermatofiti e da *Malassezia* spp. Gli studi clinici, con trattamenti antifungini a base di OE sull'uomo, sono promettenti, ma ancora non esaustivi. Infatti, sono necessarie ulteriori conferme, attraverso le quali si conosceranno meglio gli eventuali effetti collaterali di questi prodotti naturali o dei suoi singoli componenti, in particolare contro una data specie patogena.

Gli effetti antifungini di questi OE, da soli o in combinazione con antimicotici convenzionali, rappresenterebbero una soluzione molto interessante per superare i fallimenti terapeutici legati alla comparsa di ceppi fungini resistenti e all'aumento dei trattamenti immunosoppressivi in medicina. C'è ancora molto lavoro da fare prima di poter effettivamente includere gli OE negli attuali trattamenti medici, ma questi prodotti naturali rimangono buoni candidati per una possibile integrazione e/o un'alternativa, in alcuni casi estremi di farmaco-resistenza, alla terapia antifungina, soprattutto nel campo delle infezioni fungine cutanee e mucosali.

Bibliografia

- Ahmad A, van Vuuren S, Viljoen A. Unravelling the complex antimicrobial interactions of essential oils-- the case of *Thymus vulgaris* (thyme). *Molecules* 2014;6;19(3):2896-910.
- Amanlou M, Beitollahi JM, Abdollahzadeh S, Tohidast-Ekrad Z. Miconazole gel compared with *Zataria multiflora* Boiss. gel in the treatment of denture stomatitis. *Phytother Res* 2006;20(11):966-9.

- Ayaz M, Ullah F, Sadiq A, Ullah F, Ovais M, Ahmed J, Devkota HP. Synergistic interactions of phytochemicals with antimicrobial agents: Potential strategy to counteract drug resistance. *Chem Biol Interact* 2019;308:294-303.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils—A review. *Food Chem Toxicol* 2008;46(2):446-475.
- Becerril R, Nerin C, Gómez-Lus R. Evaluation of bacterial resistance to essential oils and antibiotics after exposure to oregano and cinnamon essential oils. *Foodborne Pathog Dis* 2012;9(8):699-705.
- Beheshti Roy A, Tavakoli-far B, Fallah Huseini H, Tousi P, Shafigh N, Rahimzadeh M. Efficacy of *Melaleuca alternifolia* Essential Oil in the Treatment of Facial Seborrheic Dermatitis: A Double-blind, Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Med Plants* 2014;13(51):26-32.
- Bicchi C, Rubiolo P. Oli Essenziali: Controllo di qualità. In: Mondello F, Marella AM, Bellardi MG, Di Vito M. (Ed.). *Oli essenziali per la salute dell'uomo e la salvaguardia dell'ambiente*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2015. (Rapporti ISTISAN 15/6).
- Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. *J Fungi* (Basel) 2017;3(4):57.
- Brown GD, Denning DW, Gow NAR, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Sci Transl Med* 2012;4(165):165rv13.
- Camporese A. Gli oli essenziali nelle patologie infettive. *Natural 1* 2013;34-37. Disponibile all'indirizzo: https://www.natural1.it/media/k2/attachments/oe_patologie_infettive.pdf; ultima consultazione 03/06/2021.
- Carmo ES, Pereira Fde O, Cavalcante NM, Gayoso CW, Lima Ede O. Treatment of *Pityriasis versicolor* with topical application of essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf - therapeutic pilot study. *An Bras Dermatol* 2013;88(3):381-5.
- Carson CF, Hammer K, Riley T. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: A Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clin Microbiol Rev* 2006;19(1):50-62.
- Catalán A, Pacheco JG, Martínez A, Mondaca MA. In vitro and in vivo activity of *Melaleuca alternifolia* mixed with tissue conditioner on *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105(3):327-32.
- CDC. *Fungal Diseases*. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention; 2019. Disponibile all'indirizzo: <https://www.cdc.gov/fungal/about-fungal-diseases.html>; ultima consultazione 13/05/2019.
- CDC. *Fungal Diseases and Covid 19*. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention; 2021a. Disponibile all'indirizzo: <https://www.cdc.gov/fungal/covid-fungal.html>; ultima consultazione 03/06/2021.
- CDC. *Fungal Diseases, Mucormycosis*. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention; 2021b. Disponibile all'indirizzo: <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/mucormycosis/index.html>; ultima consultazione 25/02/2021.
- CDC. *Fungal Diseases, Candida auris*. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention; 2021c. Disponibile all'indirizzo: <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/index.html>; ultima consultazione 11/05/2021.
- Chaijan MR, Handjani F, Zarshenas M, Rahimabadi MS, Tavakkoli A. The *Myrtus communis* L. solution versus ketoconazole shampoo in treatment of dandruff: A double blinded randomized clinical trial. *J Pak Med Assoc* 2018;68(5):715-20.
- Chaisripipat W, Lourith N, Kanlayavattanukul M. Anti-dandruff Hair Tonic Containing Lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) Oil. *Forsch Komplementmed* 2015;22(4):226-9.

- Chalhoub E, Emami E, Freijé M, Kandelman D, Campese M, St-Georges A, Voyer R, Rompré P, Barbeau J, Leduc A, Durand R. Effectiveness of an alcohol-free essential oil-containing mouthwash in institutionalised elders receiving long-term care: a feasibility study. *Gerodontology* 2016;33(1):69-78.
- Chami F, Chami N, Bennis S, Trouillas J, Remmal A. Evaluation of carvacrol and eugenol as prophylaxis and treatment of vaginal candidiasis in an immunosuppressed rat model. *J Antimicrob Chemother* 2004;54(5):909-14.
- Chami N, Bennis S, Chami F, Aboussekhra A, Remmal A. Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol *in vitro* and *in vivo*. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20(2):106-11.
- D'Agostino M, Tesse N, Fripiat JP, Machouart M, Debourgogne A. Essential oils and their natural active compounds presenting antifungal properties. *Molecules* 2019;24(20):3713.
- D'Auria FD, Tecca M, Strippoli V, Salvatore G, Battinelli L, Mazzanti G. Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essential oil against *Candida albicans* yeast and mycelial form. *Med Mycol* 2005;43(5):391-6.
- De Groot AC, Schmidt E. Essential Oils, Part I: Introduction. *Dermatitis* 2016;27(2):39-42.
- de Oliveira JR, de Jesus D, Figueira LW, de Oliveira FE, Pacheco Soares C, Camargo SE, Jorge AO, de Oliveira LD. Biological activities of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) extract as analyzed in microorganisms and cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2017a;242(6):625-34.
- de Oliveira Lima MI, Araújo de Medeiros AC, Souza Silva KV, Cardoso GN, de Oliveira Lima E, de Oliveira Pereira F. Investigation of the antifungal potential of linalool against clinical isolates of fluconazole resistant *Trichophyton rubrum*. *J Mycol Med* 2017b;27(2):195-202.
- Derby R, Rohal P, Jackson C, Beutler A, Olsen C. Novel treatment of onychomycosis using over-the-counter mentholated ointment: a clinical case series. *J Am Board Fam Med* 2011;24(1):69-74.
- Di Vito M, Fracchiolla G, Mattarelli P, Modesto M, Tamburro A, Padula F, Agatensi L, Giorlandino FR, Girolamo A, Carbonara GG, Carrieri A, Corbo F, Mondello F. Probiotic and Tea Tree Oil Treatments Improve Therapy of Vaginal Candidiasis: A Preliminary Clinical Study. *Med J Obstet Gynecol* 2016;4(4):1090.
- Dutta BK, Karmakar S, Naglot A, Aich JC, Begam M. Anticandidial activity of some essential oils of a mega biodiversity hotspot in India. *Mycoses* 2007;50(2):121-4.
- Elansary HO, Salem MZM, Ashmawy NA, Yessoufou K, El-Settawy AAA. In vitro antibacterial, antifungal and antioxidant activities of *Eucalyptus* spp. leaf extracts related to phenolic composition. *Nat Prod Res* 2017;31(24):2927-930.
- Essid R, Hammami M, Gharbi D, Karkouch I, Hamouda TB, Elkahoui S, Limam F, Tabbene O. Antifungal mechanism of the combination of *Cinnamomum verum* and *Pelargonium graveolens* essential oils with fluconazole against pathogenic *Candida* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 2017;101(18):6993-7006.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). *Rapid risk assessment: Candida auris in healthcare settings – Europe, 2018*. Solna: ECDC; 2018. Disponibile all'indirizzo: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/rapid-risk-assessment-candida-auris-healthcare-settings-europe>; ultima consultazione 23/04/2018.
- European Pharmacopoeia Commission. *The European Pharmacopoeia* (10th edn.). Strasbourg: Council of Europe 2021; p. 864.
- Homa M, Fekete IP, Böszörményi A, Singh YR, Selvam KP, Shobana CS, Manikandan P, Kredics L, Vágvölgyi C, Galgóczy L. Antifungal effect of essential oils against *Fusarium Keratitis* isolates. *Planta Med* 2015;81(14):1277-84.
- Hood JR, Burton DM, Wilkinson JM, Cavanagh HM. The effect of *Leptospermum petersonii* essential oil on *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* 2010;48(7):922-31.
- Horn F, Heinekamp T, Kniemeyer O, Pollmächer J, Valiante V, Brakhage AA. Systems biology of fungal infection. *Front Microbiol* 2012;3:108.

- Inouye S, Uchida K, Yamaguchi H. *In-vitro* and *in-vivo* anti-*Trichophyton* activity of essential oils by vapour contact. *Mycoses* 2001;44(3-4):99-107.
- Jandourek A, Vaishampayan JK, Vazquez JA. Efficacy of melaleuca oral solution for the treatment of fluconazole refractory oral candidiasis in AIDS patients. *AIDS* 1998;12(9):1033-7.
- Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH. Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:693-715.
- Karpinsky TM. Essential oils of Lamiaceae family plants as antifungals. *Biomolecules* 2020;10(1):103.
- Khan MSA, Ahmad I. Antifungal activity of essential oils and their synergy with fluconazole against drug-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;90(3):1083-94.
- Ksouri S, Djebir S, Bentorki AA, Gouri A, Hadeif Y, Benakhla A. Antifungal activity of essential oils extract from *Origanum floribundum* Munby, *Rosmarinus officinalis* L. and *Thymus ciliatus* Desf. against *Candida albicans* isolated from bovine clinical mastitis. *J Mycol Med* 2017;27(2):245-49.
- Lahmer T, Kriescher S, Herner A, Rothe K, Spinner CD, Schneider J, Mayer U, Neuenhahn M, Hoffmann D, Geisler F, Heim M, Schneider G, Schmid RM, Huber W, Rasch S. Invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients with severe COVID-19 pneumonia: Results from the prospective AspCOVID-19 study. *PLoS One*. 2021;16(3):e0238825.
- Lang G, Buchbauer G. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. *Flavour Fragr J* 2012;27(1):13-39.
- Langeveld WT, Veldhuizen EJA, Burt SA. Synergy between essential oil components and antibiotics: A review. *Crit Rev Microbiol* 2014 40(1):76-94.
- Mahboubi M, Haghi G. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *J Ethnopharmacol* 2008;119(2):325-7.
- Manohar V, Ingram C, Gray J, Talpur NA, Echard BW, Bagchi D, Preuss HG. Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. *Mol Cell Biochem* 2001;228(1-2):111-7.
- McKay DL, Blumberg JB. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.) *Phytother Res* 2006;20(8):619-633.
- Minoeianhaghighi MH, Sepehrian L, Shokri H. Antifungal effects of *Lavandula binaludensis* and *Cuminum cyminum* essential oils against *Candida albicans* strains isolated from patients with recurrent vulvovaginal candidiasis. *J Mycol Med* 2017;27(1):65-71.
- Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A, Cassone A, Salvatore G. In vivo activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species. *BMC Infect Dis* 2006;6:158.
- Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A, Salvatore G, Cassone A. *In vitro* and *in vivo* activity of tea tree oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic yeasts. *J Antimicrob Chemother* 2003;51(5):1223-9.
- Mondello F, Girolamo A, Di Vito M. Potenzialità degli oli essenziali nelle malattie infettive. In: Mondello F, Marella AM, Bellardi MG, Di Vito M. (Ed.). *Oli essenziali per la salute dell'uomo e la salvaguardia dell'ambiente*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2015. (Rapporti ISTISAN 15/6).
- Mondello F. *Funghi patogeni per l'uomo: generalità e prospettive*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2008. (Rapporti ISTISAN 08/10).
- Nardoni S, Costanzo AG, Mugnaini L, Pisseri F, Rocchigiani G, Papini R, Mancianti F. Study comparing an essential oil-based shampoo with miconazole/chlorhexidine for haircoat disinfection in cats with spontaneous microsporidiosis. *J Feline Med Surg* 2017;19:697-701.

- Nardoni S, Mugnaini L, Pistelli L, Leonardi M, Sanna V, Perrucci S, Pisseri F, Mancianti F. Clinical and mycological evaluation of an herbal antifungal formulation in canine *Malassezia dermatitis*. *J Mycol Med* 2014;24:234-40.
- Nardoni S, Pistelli L, Baronti I, Najar B, Pisseri F, Bandeira Reidel RV, Papini R, Perrucci S, Mancianti F. Traditional mediterranean plants: Characterization and use of an essential oils mixture to treat *Malassezia otitis* externa in atopic dogs. *Nat Prod Res* 2017;31:1891-1894.
- Nashwa RK, Ahmed EB, Nemr WA. Comparative study between topically applied irradiated human amniotic membrane in combination with tea tree oil versus topical tioconazole in pityriasis versicolor treatment. *Cell Tissue Bank* 2020;21(2):313-20.
- Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R, De Feo V. Essential Oils and Antifungal Activity. *Pharmaceuticals* (Basel) 2017;10(4):86.
- Papadopoulos CJ, Carson CF, Chang BJ, Riley TV. Role of the MexAB-OprM efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* in tolerance to tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its monoterpene components terpinen-4-ol, 1,8-cineole, and alpha-terpineol. *Appl Environ Microbiol* 2008;74(6):1932-5.
- Piątkowska E, Rusiecka-Ziółkowska J. Influence of essential oils on infectious agents. *Adv Clin Exp Med* 2016;25(5):989-95.
- Pietrella D, Angiolella L, Vavala E, Rachini A, Mondello F, Ragno R, Bistoni F, Vecchiarelli A. Beneficial effect of *Mentha suaveolens* essential oil in the treatment of vaginal candidiasis assessed by real-time monitoring of infection. *BMC Complement Altern Med* 2011;11:18.
- Pinto E, Pina-Vaz C, Salgueiro L, Gonçalves MJ, Costa-de-Oliveira S, Cavaleiro C, Palmeira A, Rodrigues A, Martinez-de-Oliveira J. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J Med Microbiol* 2006;55(Pt 10):1367-373.
- Pisseri F, Bertoli A, Nardoni S, Pinto L, Pistelli L, Guidi G, Mancianti F. Antifungal activity of tea tree oil from *Melaleuca alternifolia* against *Trichophyton equinum*: an in vivo assay. *Phytomedicine* 2009;16(11):1056-8.
- Prashar A, Locke IC, Evans CS. Cytotoxicity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil and its major components to human skin cells. *Cell Prolif* 2006;39(4):241-8.
- Rai M, Paralikar P, Jogee P, Agarkar G, Ingle AP, Derita M, Zacchino S. Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles: Emerging trends and future perspectives. *Int J Pharm* 2017;519(1-2):67-78.
- Sabzghabae AM, Shirdare Z, Ebadian B, Aslani A, Ghannadi A. Clinical evaluation of the essential oil of *Pelargonium graveolens* for the treatment of denture stomatitis. *Dent Res J (Isfahan)* 2011;8(Suppl 1):S105-8.
- Salam AM, Quave C.L. Opportunities for plant natural products in infection control. *Curr Opin Microbiol* 2018;45:189-94.
- Santoyo S, Cavero S, Jaime L, Ibañez E, Señoráns FJ, Reglero G. Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with antimicrobial activity from *Origanum vulgare* L.: determination of optimal extraction parameters. *J Food Prot* 2006;69(2):369-75.
- Satchell AC, Saurajen A, Bell C, Barnetson RS. Treatment of dandruff with 5% tea tree oil shampoo. *J Am Acad Dermatol* 2002;47(6):852-5.
- Shreaz S, Shiekh RA, Raja V, Wani WA, Behbehani JM. Impaired ergosterol biosynthesis mediated fungicidal activity of Co(II) complex with ligand derived from cinnamaldehyde. *Chem Biol Interact* 2016a;247:64-74.
- Shreaz S, Wani WA, Behbehani JM, Raja V, Irshad M, Karched M, Ali I, Siddiqi WA, Hun LT. Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. *Fitoterapia* 2016b;112:11-131.

- Soković M, Glamoclija J, Cirić A, Kataranovski D, Marin PD, Vukojević J, Brkić D. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* L. and thymol on experimentally induced dermatomycoses. *Drug Dev Ind Pharm* 2008;34(12):1388-93.
- Stringaro A, Colone M, Angiolella L. Antioxidant, Antifungal, Antibiofilm, and Cytotoxic Activities of *Mentha* spp. Essential Oils. *Medicines* (Basel) 2018;5(4):112.
- Tiwari TN, Chansouria JPN, Dubey NK. Antimycotic potency of some essential oils in the treatment of induced dermatomycosis of an experimental animal. *Pharm Biol* 2003; 41(5):351-6.
- Vazquez JA, Zawawi AA. Efficacy of alcohol-based and alcohol-free melaleuca oral solution for the treatment of fluconazole-refractory oropharyngeal candidiasis in patients with AIDS. *HIV Clin Trials* 2002;3(5):379-85.
- Wang Z, Yang K, Chen L, Yan R, Qu S, Li YX, Liu M, Zeng H, Tian J. Activities of Nerol, a natural plant active ingredient, against *Candida albicans* *in vitro* and *in vivo*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2020;104:5039-52.

PIANIFICAZIONE EQUILIBRATA DELLE DIETE VEGETARIANE

Stefania Agrigento

Associazione Italiana di Dietetica e Nutrizione Clinica, Regione Lazio, Roma

Introduzione

Gli argomenti a favore di un regime vegetariano o vegano possono essere molteplici e validi, tuttavia evitare di assumere alimenti di origine animale potrebbe predisporre a pericolose carenze nutrizionali (vitamina B12, proteine, Fe, Zn, Ca, vitamina D, acidi grassi omega-3).

I diversi regimi vegetariani possono essere così classificati:

- *regime latte-ovo-vegetariano* (LOV) che esclude carne e derivati, pesce, molluschi e crostacei; permette il consumo di latte e derivati, uova e derivati, oltre a qualunque tipo di alimento vegetale, anche marino. In tale modello è compreso il regime latte-vegetariano (LV) e ovo-vegetariano (OV).
- *regime vegano* (VEG) che esclude tutti i prodotti di origine animale (carne e derivati, pesce, molluschi e crostacei, uova e derivati, latte e derivati, miele) e permette qualunque alimento di origine vegetale (tranne il miele) anche marino.
- *regime crudista*, variante vegana, dove vengono assunti esclusivamente verdure, frutta fresca e secca, semi, cereali e legumi germogliati, gli alimenti vengono prevalentemente consumati crudi o con cotture che non superino i 42 °C.
- *regime fruttariano* che prevede l'assunzione esclusivamente di frutta fresca e secca, semi e verdura a frutto.
- *dieta macrobiotica*, derivata dalla filosofia orientale Zen, dalla tradizione rituale dei monaci tibetani e dalla medicina cinese che inserisce anche la dietetica tra le sue pratiche curative. Nella sua variante vegetariana, è previsto il consumo di cereali, legumi, verdure, alghe, prodotti a base di soia, e viene evitato quello di latticini e uova.

Il crudismo, il fruttarismo e la dieta macrobiotica nella variante vegetariana vengono considerati "restrittivi" e quindi a rischio di inadeguatezza nutrizionale e peraltro non risultano esserci effetti positivi sulla salute attualmente validati. Quindi il riferimento all'adeguatezza delle diete vegetariane equilibrate si riferisce ai due modelli principali, peraltro i più diffusi, che includono il consumo variato di tutti gli alimenti vegetali, il LOV e il VEG.

Di seguito vengono riportate le principali indicazioni della Società Italiana di Nutrizione Umana (SINU) (1).

Adeguatezza nutrizionale

In generale possiamo dire che i vegani assumono molti cibi a basso apporto energetico. L'elevato consumo di fibra può ostacolare l'assorbimento dei nutrienti presenti nella razione alimentare. La copertura del fabbisogno energetico è comunque assicurata da strategie nutrizionali adeguate (6-8 pasti al giorno).

Riguardo l'adeguatezza nutrizionale dei regimi LOV o VEG occorre valutare l'apporto dei seguenti nutrienti:

- proteine;
- vitamina B12 (cianocobalamina);
- calcio;
- vitamina D;
- ferro;
- zinco;
- acidi grassi omega-3 (ω -3).

Proteine

Il valore nutrizionale, anche detto "qualità biologica", di una proteina dipende dalla sua composizione in aminoacidi essenziali e dalla biodisponibilità degli stessi (ovvero la frazione che può essere assorbita e poi utilizzata per la sintesi proteica endogena). Le proteine vegetali hanno una digeribilità media e trattamenti termici o altri trattamenti tecnologici possono limitarne la biodisponibilità (es. reazione di Maillard).

Molti alimenti di origine vegetale possono contenere livelli elevati di fattori anti-nutrizionali, naturalmente presenti (es. tannini, fitati, inibitori della tripsina, glucosinolati) o che si formano durante la lavorazione (es. D-aminoacidi, lisino-alanina, isotiocianati); legumi, cereali, patate e pomodori contengono inibitori enzimatici attivi nelle varie fasi della digestione (anti-tripsina, anti-chimotripsina, anti-carbossipeptidasi, anti-elastasi e anti- α -amilasi), ma essendo termolabili, vengono inattivati con la cottura.

Un apporto deficitario proteico non comporta nell'immediato manifestazioni di rilevanza clinica, tuttavia tale carenza potrebbe essere rilevata con degli opportuni dosaggi di *marker* sierici come albumina e transferrina. Per un'adeguata assunzione proteica bisogna tener conto dei cosiddetti aminoacidi limitanti (lisina, triptofano e metionina) e quindi complementare diverse fonti proteiche vegetali: ad esempio cereali (ridotto contenuto in lisina e triptofano) e legumi (ridotto contenuto in metionina). Pertanto, sebbene il fabbisogno metabolico di proteine per i vegetariani non si discosti da quello dei non vegetariani, potrebbe essere opportuno aumentare del 5-10% il *Population Reference Intake* (PRI) rispetto a quanto indicato per la popolazione generale nella IV revisione dei Livelli di Assunzione Raccomandata di Nutrienti e energia (LARN) per la popolazione italiana (2).

Vitamina B12

La vitamina B12 è presente negli alimenti di origine animale. Alcune alghe utilizzate in cucina o come integratori alimentari possono contenere discrete quantità di vitamina B12, tuttavia bisogna tenere presente che analoghi della vitamina B12, biologicamente inattivi, possono interferire con l'assorbimento delle forme attive; per tale motivo, insieme ai prodotti fermentati a base di soia, le alghe non rappresentano una fonte affidabile di vitamina B12. La biodisponibilità della vitamina B12 è ridotta in presenza di qualsiasi situazione che ne alteri l'assorbimento intestinale: gastrite atrofica, riduzione dell'acidità gastrica, anche iatrogena, terapie farmacologiche (metformina, inibitori di pompa), ileite terminale.

La vitamina in forma cristallina, contenuta negli alimenti fortificati e negli integratori, risulta meglio assorbibile in confronto a quella contenuta nel cibo e viene raccomandata in condizioni di possibili difetti di assorbimento.

La carenza di vitamina B12 nell'adulto può manifestarsi lentamente, in quanto i depositi epatici ne sostengono il fabbisogno per circa 3-5 anni; può invece comparire più velocemente quando il fabbisogno è elevato, durante la crescita, come può accadere nei lattanti di madri VEG che non integrino la vitamina B12 secondo quanto raccomandato.

Poiché nei vegetariani l'assunzione di folati è elevata, diversamente dagli onnivori (OMN), possono non manifestarsi le alterazioni degli indicatori ematologici quali volume cellulare medio (MCV), ematocrito, emoglobina, risposta reticolocitaria e ipersegmentazione dei leucociti. Secondo i LARN il valore plasmatico di vitamina B12 non è sufficientemente specifico per la valutazione dello stato di carenza, in quanto include anche il dosaggio della sua forma metabolicamente inerte (Cbl-aptocorrina). Poiché le diete vegetariane abbondano di folati e vitamina B6, l'unico parametro per la valutazione precoce dello stato nutrizionale affidabile e di facile esecuzione appare essere l'omocisteina (HCY), che deve essere $<12 \mu\text{mol/L}$.

In conclusione, è necessario porre l'attenzione nei confronti dello stato nutrizionale della vitamina B12 di tutti i soggetti a rischio come prassi consolidata di prevenzione; nello specifico, per chi segue i modelli VEG e LOV si raccomanda di includere adeguate quantità di questa vitamina tramite cibo e/o integratori in forma cristallina di derivazione batterica.

Calcio

La biodisponibilità di calcio è influenzata da diversi fattori favorenti o inibenti, presenti negli alimenti. Anche se molti alimenti vegetali, soprattutto verdura, legumi e frutta secca, contengono buone quantità di calcio, la biodisponibilità di questo minerale è inversamente proporzionale al contenuto di ossalati e fitati nell'alimento. In quanto queste ultime formano sali insolubili con il calcio riducendone l'assorbimento. Pertanto gli alimenti vegetali a basso contenuto di ossalati, in particolare tutte le verdure a foglia (eccetto gli spinaci, la bieta e le foglie di rapa), rappresentano una buona fonte di calcio.

I sali di calcio usati per fortificare gli alimenti hanno una biodisponibilità paragonabile a quella del calcio presente nel latte vaccino; tuttavia, il fosfato tricalcico, utilizzato per la fortificazione del latte di soia, presenta una biodisponibilità di circa il 75% rispetto a quello contenuto nel latte vaccino. Tra i sali di calcio quello è risultato più biodisponibile il citromalato. Nel caso del tofu, invece, è stata dimostrata una biodisponibilità del cloruro di calcio e del solfato di calcio paragonabile a quella del calcio nel latte vaccino.

La fibra alimentare non sembra influenzare negativamente l'assorbimento di calcio: in diverse varietà di cavoli questo è risultato maggiore rispetto al calcio assorbito dal latte vaccino. È altresì importante ricordare che un'ottima fonte di calcio, soprattutto in forma di bicarbonato e solfato, proviene dall'acqua minerale; in questi casi la biodisponibilità è paragonabile o superiore a quella del latte vaccino. In generale, la biodisponibilità del calcio presente in qualunque forma nell'acqua è maggiore quando il consumo è concomitante ad altri alimenti.

La teoria secondo cui un'elevata introduzione di proteine (soprattutto quelle ricche di aminoacidi solforati, contenuti principalmente nelle carni, nei cereali, nella frutta secca e nei derivati del latte) incrementerebbe l'escrezione di calcio, per un effetto di acidificazione, è stata recentemente criticata (1)

Un alto consumo di sodio favorisce l'escrezione renale di calcio, in quanto entrambi competono per lo stesso sistema di riassorbimento tubulare: ogni 2300 mg di sodio escreto i reni espellono 40-60 mg di calcio.

Vitamina D

Per quanto riguarda la vitamina D, il contenuto presente negli alimenti rappresenta una percentuale ridotta di quanto viene reso disponibile alle cellule; infatti gran parte della vitamina D proviene dalla sintesi endogena, che avviene nella cute per esposizione diretta alla luce solare. I grassi alimentari sono i principali determinanti della biodisponibilità della vitamina D. La presenza di fibra e fitati influisce negativamente sui livelli circolanti della 25-OH-D3 in quanto interferisce con il ricircolo enteroepatico, favorendone l'escrezione.

Chi segue una dieta VEG possiede un bilancio del calcio in parità, per la minor escrezione di calcio per via fecale; per questo motivo non si sarebbero riscontrate differenze nel bilancio del calcio, nell'assorbimento apparente e sull'assorbimento dell'osso valutato con un *marker* urinario. Si è invece evidenziata una carenza di vitamina D e calcio nei soggetti che seguivano una dieta macrobiotica (in particolare in gravidanza, durante l'allattamento e nei bambini).

Ferro

Il ferro è presente negli alimenti sotto forma di ferro eme e non-eme. Il ferro eme viene assorbito direttamente nel duodeno mentre il ferro non-eme viene convertito, con l'aiuto della vitamina C, in ione ferroso e assorbito dal duodeno. Il ferro assorbito si lega alla transferrina (proteina di trasporto), passa nel sangue e da qui ai vari organi e tessuti.

Il ferro eme è assorbito in misura del 15-35% ed è inoltre poco sensibile a quei fattori che influenzano invece fortemente l'assorbimento del ferro non-eme. Va tuttavia messo in evidenza che anche carne e pesce contengono una grande quantità di ferro non-eme: circa il 60% del totale. L'assorbimento intestinale del ferro non-eme può variare moltissimo, dallo 0,7 al 34%, poiché è fortemente influenzato da molti fattori facilitanti o inibenti presenti nella dieta che modificano sia la solubilità che lo stato di ossidazione di questo metallo.

Le diete LOV e VEG, di composizione assai diversa rispetto alle diete OMN, rappresentano una situazione in cui si possono manifestare notevoli variazioni nella biodisponibilità del ferro. Anche se le diete LOV e VEG hanno spesso un contenuto di ferro simile o leggermente superiore a quello della dieta OMN, la biodisponibilità di questo metallo in una dieta LOV e VEG sarebbe inferiore rispetto a quella riscontrata in diete OMN. In condizioni fisiologiche normali, l'assorbimento del ferro in una dieta OMN è circa il 14-18% mentre in una dieta LOV e VEG è il 5-12% del totale ingerito. La minore biodisponibilità del ferro nelle diete LOV e VEG rispetto alle OMN è dovuta principalmente a differenze nella forma chimica del ferro e alla presenza di fattori che possono inibirne l'assorbimento intestinale. In una dieta LOV e VEG il 100% del ferro ingerito è ferro non-eme.

Per i vegetariani l'assorbimento di ferro dalla dieta è limitato fra l'altro anche dall'elevato consumo di fibra, acido fitico e fitati. La biodisponibilità del ferro può inoltre essere influenzata dalla cottura e dalla preparazione dei cibi, nonché dall'assunzione di vitamina C con la frutta e la verdura. Un altro fattore importante è lo stato di riserva endogena di questo minerale: se le riserve sono basse, l'organismo aumenta la quota di ferro non-eme assorbita dalla dieta.

La forma ossidata del ferro (ione ferrico Fe³⁺) non può essere assorbita dall'enterocita e pertanto deve necessariamente essere ridotta a ferro ferroso (ione ferroso Fe²⁺) o da enzimi presenti nella membrana cellulare enterocitaria oppure da molecole presenti nella dieta, come l'acido ascorbico (vitamina C). Una forma particolare di ferro non-eme è quella legata alla ferritina. Diversi studi hanno dimostrato che la biodisponibilità del ferro dalla ferritina della soia è molto alta (22-34%) ed è simile a quella del ferro eme (15-35%). Per questo motivo la ferritina presente nei legumi, e principalmente nella soia, può quindi rappresentare una forma di ferro di

origine vegetale facilmente utilizzabile e biodisponibile e perciò utile per i soggetti che presentano uno stato critico del ferro.

Il principale fattore facilitante è l'acido ascorbico, che ha la capacità sia di ridurre il ferro sia di chelarlo, formando un complesso con un assorbimento maggiore; quest'azione può essere ottimizzata includendo alimenti ricchi di acido ascorbico nei singoli pasti. Altri fattori facilitanti sono gli acidi organici della frutta e della verdura (citrico, malico, lattico, tartarico ecc.), i caroteni e il retinolo. Al contrario, i principali composti che inibiscono l'assorbimento del ferro sono i fitati e i suoi derivati (presenti in cereali integrali, noci, semi, legumi) e i polifenoli (presenti nel tè, nel cacao, nel vino rosso e in molti cereali come anche in verdure e spezie). Anche lo zinco e il calcio, soprattutto se assunti come integratori, sono in grado di diminuire l'assorbimento del ferro.

La valutazione dello stato nutrizionale di questo minerale riguarda i seguenti parametri ematici:

- emoglobina nel sangue (indicatore dell'anemia);
- transferrina sierica (che indica la quantità di ferro circolante);
- ferritina sierica (che indica la quantità di riserva corporea).

Essendo quest'ultima anche una proteina di fase acuta, sarebbe consigliabile misurarla insieme a un marcatore dello stato infiammatorio quale la proteina C reattiva (PCR). L'analisi della combinazione di questi parametri ematici permette di accertare l'entità della carenza di ferro in un individuo a partire dalla deplezione delle riserve di ferro e fino alla comparsa dell'anemia. In conclusione, si confermano le raccomandazioni LARN che consigliano di aumentare dell'80% l'assunzione di ferro nei vegetariani rispetto a quanto previsto per una dieta onnivora (PRI).

Zinco

Nelle diete onnivore la maggior parte dello zinco introdotto proviene da fonti animali (54,9%). Le persone che seguono una dieta LOV e VEG, per raggiungere il fabbisogno quotidiano di zinco devono consumare prodotti vegetali che siano buone fonti di zinco quali i cereali integrali, i legumi, la frutta secca oleaginosa e i semi oleosi. Tali alimenti, tuttavia, contengono anche un'alta quantità di fitati, che sono potenti chelanti dello zinco e lo rendono meno disponibile per l'assorbimento; anche altri componenti degli alimenti vegetali come la fibra e gli ossalati interferiscono con l'assorbimento di questo metallo. L'assorbimento dello zinco si colloca, in media, tra il 15% e il 26% per una dieta vegetariana e tra il 33 e il 35% per una dieta onnivora.

Tra i fattori favorevoli l'assorbimento intestinale dello zinco vi sono oltre alle proteine animali, procedure che attivano le fitasi endogene presenti negli alimenti, come la lievitazione, la germinazione e la fermentazione.

I fattori sfavorevoli l'assorbimento intestinale sono invece:

- acido fitico e derivati: si complessano con lo zinco, riducendo la biodisponibilità di questo minerale;
- ossalati: con lo stesso meccanismo dell'acido fitico;
- calcio: il complesso calcio-zinco-fitati risulta più insolubile del complesso zinco-fitati, riducendo ulteriormente la biodisponibilità del minerale nel lume intestinale.

Analogamente a quanto accade con il ferro, l'assorbimento dello zinco aumenta in caso di stati carenziali.

Omega-3

Gli acidi grassi omega-3 rappresentano un gruppo di acidi grassi essenziali, con numerose funzioni biologiche fondamentali per il mantenimento di un'omeostasi corretta e di un buono stato di salute. I più importanti sono:

- acido- α -linolenico (ALA 18:3);
- acido eicosapentaenoico (EPA 20:6);
- acido docosaesaenoico (DHA 20:6).

L'ALA è l'unico acido grasso omega-3 presente in quantità rilevante nei prodotti vegetali, mentre è scarsamente presente in quelli animali. Le principali fonti di ALA sono alcuni semi (lino, canapa e chia) e i loro oli, le noci e alcune alghe. Per quanto riguarda l'EPA e il DHA le uniche fonti vegetali sono rappresentate dalle alghe, presentandone tuttavia una quantità molto limitata poiché alimenti molto poveri in grassi; le microalghe, al contrario, ne sono ricche: forniscono il 10-40% per peso secco.

Altri fattori sfavorevoli la biodisponibilità di ALA e dei suoi metaboliti sono:

- quantità insufficienti di energia e proteine, piridossina, biotina, calcio, rame, magnesio e zinco;
- un eccessivo consumo di acidi grassi trans e di alcol, che diminuisce l'attività degli enzimi di conversione.

Per chi consuma scarse quantità di EPA e DHA, come può verificarsi nei vegetariani, il rapporto omega-6/omega-3 potrebbe assumere un'importanza più rilevante rispetto a condizioni in cui si consumano grandi quantità di EPA e DHA; il rapporto ottimale è $\omega-6/\omega-3 = 2-4:1$.

Poiché gli acidi grassi omega-3 vengono incorporati negli sfingolipidi e fosfolipidi di membrana, un buon indicatore di stato di nutrizione è la loro presenza nella membrana fosfolipidica degli eritrociti, in quanto rifletterebbe l'assunzione per un periodo di tempo lungo quanto la vita dei globuli rossi (120 giorni).

I vegetariani possono migliorare il loro stato di nutrizione per quanto riguarda gli acidi grassi omega-3 attraverso i seguenti accorgimenti dietetici:

- assumere regolarmente buone fonti di ALA (es. noci, semi di lino e di chia, oli da essi derivati);
- ridurre le fonti di acido linoleico (*Linoleic Acid*, LA) (es. oli vegetali quali olio di mais e olio di girasole);
- evitare l'assunzione di sostanze interferenti come alcol e grassi trans.

Eventualmente si consiglia di ricorrere a un integratore da fonte microalgale a contenuto titolato.

Gravidanza ed età evolutiva

Le diete prive di carne e di derivati animali, soprattutto nella fase di crescita o in gravidanza, se non applicate correttamente possono essere associate al rischio di carenze nutrizionali. La Società Italiana di Pediatria Preventiva e Sociale (SIPPS), insieme alla Federazione Italiana Medici Pediatri (FIMP) e alla Società Italiana di Medicina Perinatale (SIMP), ha redatto un *Position Paper* riguardante l'adeguatezza delle diete vegetariane sulla base della ricerca e della valutazione delle evidenze scientifiche ad oggi disponibili. (3).

La dieta vegana non deve essere raccomandata in età pediatrica perché priva di vitamina B12 e carente di DHA, ferro, vitamina D e calcio. Se viene consigliata deve assolutamente essere integrata con tutti i nutrienti succitati. I bambini che seguono questa dieta devono essere attentamente monitorati nella loro crescita e nel loro sviluppo generale.

La dieta LOV e le sue varianti risultano carenti di vitamina B12, DHA, ferro e, a volte, anche di vitamina D e calcio. Pertanto, seppure più ricca di nutrienti rispetto alla vegana, anche questa dieta ha necessità di essere monitorata e integrata con i nutrienti carenti.

Conclusioni

L'Academy of Nutrition and Dietetic, ex American Dietetic Association (ADA), ha emanato nel 1988 un *Position Paper*, da allora periodicamente aggiornato (4) dove dichiara che “le diete vegetariane correttamente pianificate, comprese le diete vegane, sono salutari, adeguate dal punto di vista nutrizionale e possono conferire benefici per la salute nella prevenzione e nel trattamento di alcune patologie”.

In questo breve articolo e, anche grazie alle indicazioni della SINU (1), si è evidenziato cosa debba intendersi per “diete correttamente pianificate” e quali siano le strategie da adottare per evitare pericolose carenze nutrizionali.

Bibliografia

1. Società Italiana di Nutrizione Umana. *Documento SINU sulla dieta vegetariana*. Milano: SINU; 2019. Disponibile all'indirizzo: <https://sinu.it/wp-content/uploads/2019/06/documento-diete-veg-esteso-finale-2018.pdf>; ultima consultazione 08/11/2021.
2. Società Italiana di Nutrizione Umana. *Livelli di Assunzione Raccomandata di energia e Nutrienti per la popolazione italiana (LARN) (IV Revisione)*. Milano: SINU; 2014. Disponibile all'indirizzo: <https://sinu.it/tabelle-larn-2014/>; ultima consultazione 08/11/2021.
3. Società Italiana di Pediatria Preventiva e Sociale, Federazione Italiana Medici pediatri e Società di Medicina Perinatale. *Position Paper: Diete vegetariane in gravidanza ed età evolutiva*. Roma: SIPPS; 2020. Disponibile all'indirizzo: <https://www.sipps.it/wp/wp-content/uploads/2020/04/Position-Paper-Diete-vegetariane-2017.pdf>; ultima consultazione 08/11/2021.
4. Melina V, Craig W, Levin S. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: vegetarian diets. *J Acad Nutr Diet* 2016;116(12):1970-80.

VERDURA DIMENTICATA DA RIVALUTARE: IL CASO DEL SEDANO SELVATICO (*SMYRNIUM OLUSATRUM*)

Filippo Maggi, Eugenia Mazzara, Eleonora Spinozzi
Scuola di Scienze del Farmaco e dei Prodotti della Salute, Università di Camerino, Camerino

Introduzione

A causa della globalizzazione e dell'introduzione di nuove specie di ortaggi per uso alimentare, molte piante impiegate in passato in cucina hanno subito un significativo abbandono. Tra queste, spicca un membro della famiglia delle Apiaceae, *Smyrniium olusatrum* L., il sedano selvatico (Figura 1), dotato di notevole importanza storica e meritevole di studi e approfondimenti volti alla sua rivalutazione, non solo come verdura, ma anche come fonte di importanti sostanze bioattive.



Figura 1. Infiorescenze di *Smyrniium olusatrum* L.

La pianta si distribuisce nei Paesi mediterranei, nel nord Africa e anche nell'Europa settentrionale, fino a naturalizzarsi in Gran Bretagna, dove i Romani ne hanno introdotto la coltivazione.

È localizzato anche in quasi tutte le regioni italiane, soprattutto in quelle affacciate sul mare, prediligendo luoghi ombrosi e incolti, scarpate, suoli profondi e nitrofilo.

Smyrniium olusatrum è una pianta erbacea biennale alta fino a 1,5 m, che fiorisce una sola volta prima di completare il ciclo. È caratterizzata da una radice robusta, a fittone, aromatica. Il fusto è eretto con striature rossastre, cilindrico, cavo a maturità. Le foglie sono ternate, con segmenti ovato-rombici e margini crenulato-dentati.

Le infiorescenze sono ombrelle composte a 7-15 raggi, con fiori giallo-verdastri che compaiono tra marzo e aprile. I frutti compaiono a maggio e sono diachenio, dapprima verdi, poi nero lucenti a maturità con evidenti costolature.

Tra le proprietà medicinali dello *Smyrniium* vi sono quelle antiscorbutiche della radice, e poi aromatiche, stomachiche, diuretiche e lassative del succo della radice, antiasmatiche dei frutti e infine depurative del fusto.

Nonostante l'uso alimentare di questa pianta si sia ridotto a partire dal XVI secolo, tanti sono gli usi culinari delle sue parti: le foglie sono impiegate in insalate, i piccioli cotti al vapore, i boccioli fiorali per fare frittelle e sottaceti, i frutti in sostituzione del pepe e le radici consumate crude o al vapore.

Dall'intera pianta si ricava un Olio Essenziale (OE) ricco di furanosesquiterpeni. Il più importante di questi è l'isofuranodiene, il capostipite della classe dei 1,5-dieni (Hikino, 1968), che viene sfruttato nella medicina tradizionale cinese contro tumori e infiammazioni.

Tale molecola è presente anche nelle foglie di *Eugenia uniflora* L. (Amorim, 2009), che trova applicazioni in ambito cosmetico e nella cura di infiammazioni, dolori di stomaco e febbre; è contenuta anche nell'essudato resinoso della *Commiphora sphaerocarpa* Chiov. (Dekebo, 2002), e in molluschi e coralli (McPhail, 2001).

L'isofuranodiene e molecole affini, se sottoposti a riscaldamento, subiscono il riarrangiamento di Cope: a causa di questo riarrangiamento sigmatropico molecolare, l'isofuranodiene si converte nel suo isomero curzerene (Setzer, 2008). Per questo, la sua quantificazione negli OE può risultare complessa. Un altro componente dell'OE di *Smyrniium* è il germacrone, che subisce ad alte temperature lo stesso fenomeno, trasformandosi in β -elemenone.

Per quanto riguarda le proprietà farmacologiche, l'isofuranodiene ha mostrato attività epatoprotettiva, anti-infiammatoria e anti-tumorale (Lu, 2012; Zhong, 2012). A tal proposito, è capace di indurre apoptosi e inibire la proliferazione di diverse linee cellulari tumorali, con un'efficacia simile a quella della ciclofosfamida. Ha anche azione inibitoria dell'angiogenesi e inoltre non causa effetti citotossici su linee non tumorali dell'epitelio del seno e del fegato.

I metaboliti di fase I in cui è convertito l'isofuranodiene dopo somministrazione orale, rinvenuti in urine e bile, sono lattoni sesquiterpenici come aeruginolattoni, glechomanolidi ed eudesmanolidi, che hanno funzione difensiva nelle piante e sono riportati come *marker* tassonomici del genere *Smyrniium* (Chen, 2013; Wu, 2008).

Altri furanosesquiterpeni derivati dell'isofuranodiene sono furanoeremofil-1-one e 1 β -acetossifuranoeudesm-4(15)-ene (Mölleken, 1998).

Risultati e discussione

Il nostro studio è stato incentrato in primo luogo sull'ottenimento dell'OE di *Smyrniium olusatrum* da radici, foglie, fiori e frutti, che sono stati soggetti a idrodissillazione per 6 ore. Le foglie basali e i fiori sono risultati più ricchi di acqua (più dell'80%), seguiti dalle radici e infine dai frutti (circa il 14%).

Le più elevate rese di OE sono state ottenute dai fiori (1,8%) e dalle radici (1,0%), mentre per i frutti le rese sono risultate più ridotte. Per l'identificazione e la quantificazione dei componenti dell'OE, è stata impiegata la Gas Cromatografia accoppiata a Spettrometria di Massa (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS) e la Gas Cromatografia con Rivelatore a Ionizzazione di Fiamma (*Gas Chromatography-Flame Ionization Detector*, GC-FID), rispettivamente, utilizzando una colonna capillare apolare HP-5 in entrambi i casi.

L'isofuranodiene è stato ottenuto per cristallizzazione dell'olio, mentre il curzerene mediante riflusso con glicole etilenico per 30 min sotto azoto (Baldovini, 2001). Altri costituenti dell'OE dei frutti sono stati isolati mediante cromatografia su colonna, impiegando cicloesano e cicloesano-etilacetato in diverse proporzioni.

Per cromatografia su colonna dell'OE di radici, invece, è stato ricavato furanoeremofil-1-one, mentre dall'OE dei fiori il germacrone. La struttura di tutti questi componenti è stata confermata mediante spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR). Negli OE ottenuti dalle radici, l'analisi gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS) ha evidenziato come componenti principali, tra i furanosesquiterpeni, isofuranodiene, curzerene e furanoeremofil-1-one, e soprattutto β -fellandrene e δ -3-carene tra i monoterpeni.

L'analisi GC-FID ha confermato la predominanza di furanosesquiterpeni, rappresentati principalmente da curzerene e isofuranodiene. Dallo *score plot* effettuato su *S. olusatrum* sono emersi diversi chemotipi. In particolare, le foglie sono risultate particolarmente ricche di furanoeremofilone, mentre i frutti hanno mostrato come *marker* principale l'1- β -acetossifurano-4-15-eudesmene.

I fiori sono risultati più ricchi di isofuranodiene e in misura minore di germacrone e le radici hanno invece mostrato una situazione intermedia, essendo caratterizzate sia da furanodiene che da furanoeremofilone.

Al fine di mettere in luce gli effettivi livelli di isofuranodiene, curzerene e germacrone negli OE di *S. olusatrum*, nel presente studio si è optato per un approccio analitico non termodistruttivo, sviluppando un metodo quantitativo in cromatografia liquida – rivelatore spettrofotometrico a serie di diodi (*High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection*, HPLC-DAD). Dall'analisi dell'OE ottenuto dai fiori, l'isofuranodiene è risultato uno dei componenti maggioritari (48%), seguito da germacrone (12,7%) e curzerene (8%) (Figura 2).

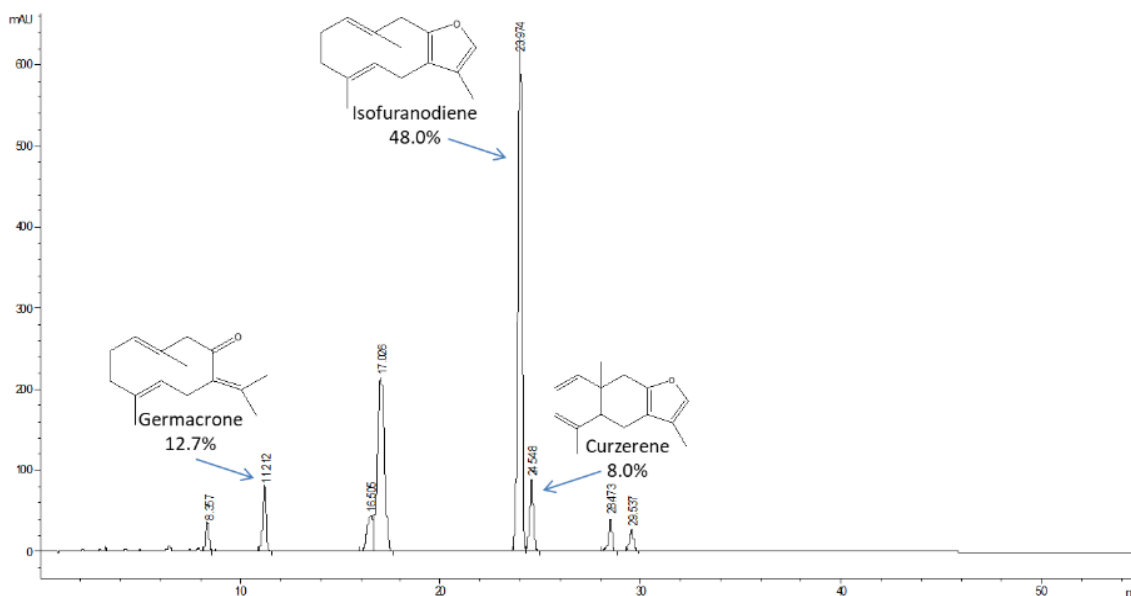


Figura 2. Analisi in HPLC-DAD dell'olio essenziale ottenuto dai fiori di *Smyrniololusatrum*

Al fine di dimostrare che il curzerene presente nell'OE fosse un prodotto derivante da degradazione termica, lo stesso metodo HPLC è stato applicato a estratti ottenuti in seguito a estrazione a temperatura ambiente. Dall'analisi sono emerse la presenza di tale composto in sole tracce nelle radici, e la sua totale assenza nei frutti. Tali risultati hanno avvalorato l'ipotesi della formazione del curzerene durante il processo di idrodistillazione. Dall'analisi di 45 OE ottenuti da *S. olusatrum*, l'isofuranodiene è risultato il componente principale, con elevate concentrazioni soprattutto nei fiori (dal 31 al 56%) e nelle radici (dal 23 al 47%). Il germacrone è risultato più abbondante nei fiori (dal 5 al 41%), risultando quasi totalmente assente nei frutti.

Per quanto concerne l'attività biologica dell'olio essenziale e delle principali molecole da esso isolate, è stato condotto il saggio colorimetrico MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) su 3 linee cellulari tumorali umane (glioblastoma, T98G; adenocarcinoma mammario, MDA-MB 231; carcinoma del colon, HCT116) al fine di determinare la loro citotossicità.

Questo test è basato sulla capacità del composto MTT (sale di tetrazolio, [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) di essere metabolizzato dall'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi, rappresentando così un indicatore della respirazione cellulare.

Tabella 1. Saggio MTT su tre linee cellulari umane

Composti	Linea cellulare (IC ₅₀ µg/mL*)		
	MDA-MB 231	T98G	HCT116
δ-3-Carene	59,94	53,71	47,26
Isofuranodiene	7,99	15,93	15,06
Curzerene	13,91	60,26	33,24
1β-Acetossifuranoeudesm-4(15)-ene	11,74	14,78	10,54
Furanoeremofil-1-one	20,03	27,50	16,57
Glechomafurano	92,97	176,05	101,48
Cisplatino (riferimento)	2,07	2,34	2,10

* Half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) = è la concentrazione necessaria dei composti per inibire il 50% delle cellule in esame

Sebbene tutti gli OE testati abbiano mostrato una promettente attività, il campione più attivo è risultato l'OE ottenuto dalle foglie. Tra le molecole isolate, l'isofuranodiene è risultato particolarmente attivo sulle cellule di adenocarcinoma mammario con valori medi di IC₅₀ intorno a 7,99 µg/mL (36,9 µM), mentre il curzerene è risultato significativamente meno attivo su tutte le linee testate. Il componente più attivo su tutte le linee cellulari testate è risultato il 1β-acetossifuranoeudesm-4(15)-ene, con valori medi di IC₅₀ da 10 a 15 µg/mL (Tabella 1).

Dallo studio è inoltre emerso che sia l'OE che l'isofuranodiene inducono apoptosi nelle cellule trattate con dosi corrispondenti alla IC₅₀. La presenza di frammenti di *Deoxyribo Nucleic Acid* (DNA) è stata confermata mediante elettroforesi su gel d'agarosio. Conferma dell'apoptosi è stata anche fornita dal test dell'annexina V e dall'attivazione della caspasi-3, sia da parte dell'OE che dell'isofuranodiene. Quest'ultimo si è dimostrato inoltre in grado di diminuire la proliferazione di cellule MCF-7 in maniera dose-dipendente. L'attività antiossidante degli OE e delle molecole isolate è stata valutata mediante i saggi DPPH (test chimico nel quale si valuta il decadimento del radicale difenilpicrilidrazile, DPPH, in assenza o in presenza di sostanze antiossidanti) e ABTS utilizzando come sostanza di riferimento il Trolox.

Il 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, ABTS, è un composto chimico utilizzato per osservare la cinetica di reazione di enzimi specifici.

I campioni di OE provenienti dalle varie parti della pianta hanno mostrato attività riducente nei confronti del radicale DPPH, mentre alcuni di essi (foglie e radici) sono risultati più attivi verso il radicale ABTS con valori di IC₅₀ vicini a quelli del Trolox. L'attività maggiore è stata mostrata dall'OE ottenuto dalle foglie basali. Tra le molecole testate, il curzerene è stata quella con l'attività antiradicalica più spiccata, soprattutto nei confronti del radicale ABTS. L'attività antimicrobica degli OE di frutti e radici è stata valutata secondo il metodo della diffusione su agar su Gram-positivi (*Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* Rosenbach), Gram-negativi (*Escherichia coli* Migula e *Pseudomonas aeruginosa* Schröter) e un fungo (*Candida albicans* C.P. Robin Berkhout). I valori di inibizione sono risultati in tutti poco significativi. Per l'analisi della frazione polare della pianta, frutti, radici e foglie sono stati estratti mediante macerazione in

etanolo. L'estratto di foglie è stato purificato utilizzando la cromatografia su colonna di gel di silice utilizzando come eluente una soluzione satura di butanolo (1:20). Le frazioni di maggior interesse sono state nuovamente cromatografate utilizzando una diversa miscela di eluenti a polarità crescente e le sostanze purificate (saccarosio, acido clorogenico, isoquercetina e acido 3-indolacetico) sono state caratterizzate mediante spettroscopia NMR. Lo studio delle strutture secernenti di *S. olusatrum* ha evidenziato un'elevata uniformità nella distribuzione nei vari organi delle stesse, caratterizzate da dotti e viti (Figura 3).

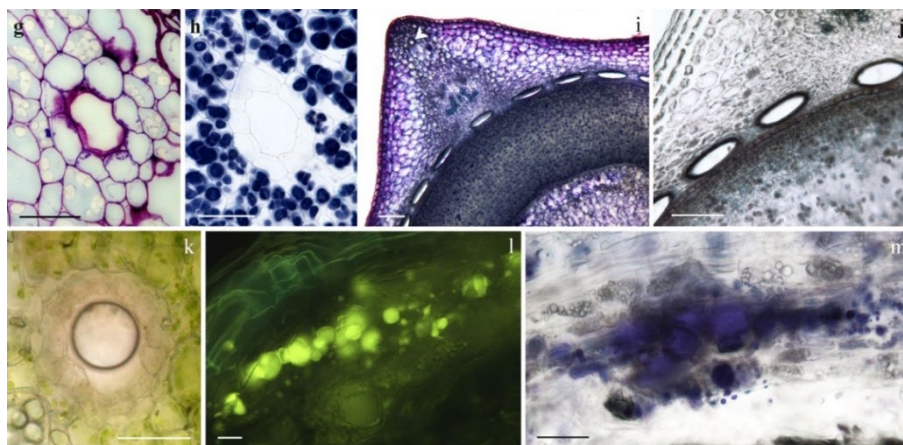


Figura 3. Strutture secernenti identificate in *S. olusatrum*

Il secreto contenuto in queste strutture si è inoltre rivelato ricco di terpeni, dimostrando che queste sono il sito principale di produzione dell'OE. Nel secreto di radici e fiori si è inoltre evidenziata la presenza di polifenoli, tannini e flavonoidi. L'analisi del contenuto di acido ascorbico in HPLC-MS ha evidenziato elevati livelli nei frutti (10,87 mg/kg), nelle foglie (8,54 mg/kg) e nei fiori (7,89 mg/kg). Per quanto riguarda l'analisi del contenuto di acidi grassi in GC-MS, si sono riscontrati elevati livelli di acido palmitico, acido linoleico e acido linolenico nelle radici, nei fiori e nelle foglie.

Conclusioni

In conclusione, l'analisi chimica ha mostrato che i farnosesquiterpeni possono essere considerati come *marker* tassonomici nel genere *Smyrniolobos*. L'analisi HPLC si è inoltre dimostrata un sistema conveniente e semplice a scopo quantitativo, mostrando come componente principale l'isofuranodiene. Vista l'attività antiossidante, ma anche citotossica su linee tumorali dell'OE di *S. olusatrum*, tale studio sottolinea l'importanza di questa pianta come vegetale edibile e come fonte di isofuranodiene, da essere poi sfruttato a livello farmaceutico.

Bibliografia

Amorim ACL, Lima CKF, Hovell AMC, Miranda ALP, Rezende CM. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga). *Phytomedicine* 2009;16(10):923-8.

- Baldovini N, Tomi F, Casanova J. Identification and quantitative determination of furanodiene, a heat-sensitive compound, in essential oil by ¹³C-NMR. *Phytochem Anal* 2001;12(1):58-63.
- Chen M, Lou Y, Wu Y, Meng Z, Li L, Yu L, Zeng S, Zhou H, Jiang H. Characterization of *in vivo* and *in vitro* metabolites of furanodiene in rats by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectra. *J Pharm Biomed Anal* 2013;86:161-8.
- Dekebo A, Dagne E, Sterner O. Furanosesquiterpenes from *Commiphora sphaerocarpa* and related adulterants of true myrrh. *Fitoterapia* 2002;73(1):48-55.
- Hikino H, Agatsuma K, Takemoto T. Furanodiene, a precursor of furan-containing sesquiterpenoids. *Tetrahedron Lett* 1968;9(8):931-3.
- Lu JJ, Dang YY, Huang M, Xu WS, Chen XP, Wang YT. Anti-cancer properties of terpenoids isolated from *Rhizoma Curcumae*--a review. *J Ethnopharmacol* 2012;143(2):406-11.
- McPhail KL, Davies-Coleman MT, Starmer J. Sequestered chemistry of the Arminacean nudibranch *Leminda millecra* in Algoa Bay, South Africa. *J Nat Prod* 2001;64(9):1183-90.
- Mölleken U, Sinnwell V, Kubeczka KH. Essential oil composition of *Smyrniololus olusatrum*. *Phytochemistry* 1998;49(6):1709-1714.
- Setzer WN. Ab initio analysis of the Cope rearrangement of germacrane sesquiterpenoids. *J Mol Model* 2008;14(5):335-42.
- Wu B, Chen J, Qu H, Cheng Y. Complex sesquiterpenoids with tyrosinase inhibitory activity from the leaves of *Chloranthus tianmushanensis*. *J Nat Prod* 2008;71(5):877-80.
- Zhong Z, Dang Y, Yuan X, Guo W, Li Y, Tan W, Cui J, Lu J, Zhang Q, Chen X, Wang Y. Furanodiene, a natural product, inhibits breast cancer growth both *in vitro* and *in vivo*. *Cell Physiol Biochem* 2012;30(3):778-90.

ALOE EMODINA: UNA MOLECOLA AD AZIONE CITOTOSSICA DI POTENZIALE INTERESSE NELLA TERAPIA ONCOLOGICA

Giorgio Cinque (a), Marisa Colone (b), Maria Luisa Dupuis (b), Annarita Stringaro (b)

(a) Dipartimento di Medicina, Laboratorio di Biochimica, Università degli Studi di Udine, Udine

(b) Centro Nazionale per la Ricerca e la Valutazione Preclinica e Clinica dei Farmaci,
Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Il termine “tumore”, o più generalmente “neoplasia”, indica un gruppo di cellule che crescono in maniera incontrollata rispetto ai tessuti sani e continuano tale crescita anche dopo la cessazione degli stimoli che ne hanno causato lo sviluppo anomalo. Questa la definizione coniata dal patologo australiano Rupert Allan Willis. Tale definizione è tuttavia oggi molto contrastata e criticata poiché non sempre tale patologia è progressiva. Il termine “tumore” nasce dal fatto che frequentemente esso si presenta sotto forma di una massa cellulare come se si trattasse di un rigonfiamento (*tumor*=rigonfiamento). Il termine neoplasia invece mette in risalto le caratteristiche biologiche di tale patologia costituita da cellule di “nuova formazione”.

Attualmente con tale termine si fa riferimento a un processo patologico caratterizzato dall’abnorme accrescimento di un tessuto, che determina la comparsa di una tumefazione localizzata, con disturbi legati a distruzione del tessuto normale preesistente e quindi a perdita di funzioni specifiche, o legati a compressione di strutture vicine, o a ostruzione di visceri cavi con ristagno dei secreti in essi contenuti. Così definiti i tumori comprendono processi patologici di natura diversa, quali iperplasie, displasie, malformazioni, cisti, processi infiammatori cronici: in senso più ristretto il termine è inteso, in patologia, come sinonimo di neoformazione o neoplasia, a indicare un particolare tipo di proliferazione cellulare caratterizzata dal fatto di essere più o meno autonoma rispetto ai meccanismi che in condizioni normali regolano la proliferazione dei tessuti, e dal fatto di presentare alterazioni di vario tipo nella differenziazione cellulare e nell’organizzazione del tessuto. Ciò dipende da una o più mutazioni a carico del DNA. Questa è la caratteristica comune a tutte le forme di tumore. Esistono tuttavia differenze, anche significative, tra un tumore e un altro a seconda degli organi o dei tessuti in cui si sviluppa. Il tumore può presentarsi in forma solida e liquida. Nel primo caso le cellule che diventano tumorali appartengono a tessuti, come quello polmonare o le ossa. I tumori liquidi sono invece quelli del sangue. Così, il tumore può svilupparsi in qualsiasi distretto corporeo e, sebbene l’incidenza sia maggiore con l’avanzare dell’età, nemmeno gli individui più giovani ne sono immuni. In base al loro grado di aggressività, possiamo distinguere due tipologie di tumore: quelli benigni, a crescita lenta e non in grado di invadere gli altri distretti corporei, e quelli maligni, comunemente chiamati cancro, caratterizzati da crescita rapida e alta capacità di invasione degli altri organi.

Il processo che trasforma una cellula sana in una neoplastica prende il nome di “carcinogenesi”. L’innesco di questo sviluppo anomalo è causato da una o più mutazioni a carico delle unità funzionali del nostro DNA, i geni: quando risultano alterati proprio quelli deputati al controllo della replicazione della cellula, è lì che il processo di carcinogenesi ha inizio. I fattori che causano tali mutazioni possono essere intrinseci che estrinseci alla cellula, tra questi ultimi i più famosi sono senz’altro: gli inquinanti ambientali, gli agenti industriali, la dieta, il tabacco e

l'alcol. Una cellula trasformata non costituisce di per sé un pericolo a meno che uno stimolo esterno non ne promuova la crescita selettiva. Questo dà origine a un clone preneoplastico che, se non trattato, può evolvere ulteriormente fino alla sua conversione maligna: è in questo stadio che il tumore può stimolare la formazione di un proprio circolo sanguigno (angiogenesi) e invadere altri organi all'interno del nostro organismo mediante il processo di metastatizzazione.

Il nostro organismo è in grado di mettere in atto una serie di risposte per contrastare la crescita neoplastica. I primi eventi di trasformazione delle cellule sono le mutazioni a carico dei geni, la cellula interrompe il ciclo cellulare per consentire la riparazione di tali geni e la proteina che media l'intero processo si chiama p53. Anche il sistema immunitario interviene per arginare lo sviluppo delle neoplasie, ma spesso le cellule neoplastiche sono in grado di "evadere" alla sua azione. Una delle risposte più efficaci è rappresentata dall'innescò dell'apoptosi, un programma di morte cellulare programmata operato da alcuni geni, inducendo la degenerazione progressiva del nucleo e successivamente della membrana cellulare che si conclude con l'eliminazione della cellula stessa.

Laddove le risposte dell'organismo non sono sufficienti a fermare lo sviluppo del tumore, l'intervento terapeutico esterno si rivela necessario. Le terapie variano a seconda del tipo di neoplasia e del suo grado di sviluppo e i trattamenti oggi più comuni per debellare il cancro includono:

1. Chirurgia: rimozione del tessuto tumorale e prelievi biotici di campioni istologici da analizzare in istopatologia, immunohistochimica e biologia molecolare.
2. Radioterapia: uccisione delle cellule tumorali mediante le radiazioni ionizzanti come i raggi X.
3. Chemioterapia: impiego di sostanze citotossiche in grado di interferire con la crescita cellulare; la loro azione sarà maggiore nei confronti delle cellule tumorali, proprio perché si riproducono più velocemente rispetto alle cellule sane.
4. Immunoterapia: attivazione del sistema immunitario, mediante anticorpi costruiti "ad hoc" che sono in grado di modulare il funzionamento del sistema immunitario.

Per quanto riguarda la chemioterapia purtroppo questa non è specifica per le cellule neoplastiche, anche le cellule sane vengono danneggiate inducendo una serie di effetti collaterali che possono essere più o meno gravi. Per ovviare a questo problema e per aggredire le neoplasie "resistenti" negli ultimi anni si sono sviluppate nuove terapie "a bersaglio cellulare" che utilizzano gli anticorpi o molecole designate per colpire solo le cellule tumorali e, più recentemente, con meccanismi di azione diversi, l'immunoterapia ha ottenuto significativi successi nella terapia di molti tumori tra cui i melanomi.

Molecole di origine naturale

In questi ultimi anni, sempre più spesso recentemente si fa ricorso anche alla terapia integrata, in cui la chemioterapia viene affiancata dall'utilizzo di sostanze di origine naturale che agiscono rinforzando il sistema immunitario. Tra queste ricordiamo la *Boswellia serrata* (Ammon, 2010) e il Resveratrolo (Feng, 2002).

Negli ultimi anni la ricerca in campo biomedico si è concentrata sullo studio delle sostanze di origine naturale come possibili agenti chemiosensibilizzanti.

Piante, funghi, organismi marini e batteri

Piante e funghi sono gli organismi da cui si recupera la frazione maggiore di molecole candidate a questi studi. Nel 1940 è stato isolato il primo antibiotico antitumorale, l'actinomicina D, dal fungo *Actinomyces antibioticus* (Waksman, 1941). Da allora, molte sostanze di origine naturale sono state sottoposte a studi *in vitro* e *in vivo* per valutarne la capacità di contrastare lo sviluppo dei tumori o migliorare l'indice terapeutico della chemioterapia a cui sono sottoposti i pazienti oncologici. Negli ultimi anni i tassani, derivati dalle piante appartenenti al genere *Taxus*, sono stati oggetto di numerosi studi; il paclitaxel, un semi-sintetico del tassolo, è utilizzato per la cura di numerosi tumori, tra cui quello al seno; il gruppo di ricerca del dottor Bernardo ha condotto dei *trials* clinici per dimostrare l'efficacia delle nanoparticelle di paclitaxel, legate all'albumina, per contrastare i tumori al seno in stadio avanzato, e i risultati sono stati molto incoraggianti (Bernardo, 2017). Ricordiamo inoltre, che anche dalla *Vinca roseus* si ottengono alcuni alcaloidi oggi approvati per l'utilizzo contro numerosi tumori: la vincristina, la vinblastina e la vinorelbina. Più recentemente la vinflunina, un alcaloide ottenuto dalla fluorazione della vinblastina, è stato registrato tramite procedura centralizzata europea per il trattamento di seconda linea del tumore della vescica, dopo fallimento di un regime a base di 4-6 cicli di cisplatino e gemcitabina (Sidaway, 2017).

Inoltre, da numerosi organismi marini derivano sostanze che oggi sono oggetto di studio in *trials* clinici per il trattamento di numerose tipologie di cancro. Tra le sostanze di origine marina citiamo: l'aplidina, la dolastatina 10, la didemmina B, il kahalalide F e l'elasidepsina (Negi, 2016).

Altre sostanze naturali sono state isolate anche dai batteri; tra questi ricordiamo gli eptiloni, provenienti da *Sorangium cellulosum*; gli eptiloni A e B sono oggetto di *trials* clinici (Nobili, *et al.*, 2009). Dall'albero cinese *Camptotheca acuminata* si possono ottenere due derivati semi-sintetici: il topotecano e l'irinotecano. Quest'ultimo, veicolato nei liposomi, è stato approvato per l'utilizzo nei pazienti affetti da adenocarcinoma del pancreas in fase metastatica, in combinazione con altri due composti, il 5-fluorouracile e la leucovorina (Lamb, 2017). Tra le molecole oggetto di numerosissimi studi c'è la curcumina, estratta dalla *Curcuma longa*: diversi gruppi di ricerca stanno mettendo a punto una formulazione ideale per la cura del cancro al seno (Tajbakhsh, 2017).

Anche sul resveratrolo, un polifenolo presente nell'uva rossa, soprattutto nei suoi acini, si stanno conducendo numerosi *trials* clinici per valutarne l'efficacia contro alcuni tumori, sebbene questa molecola, a fronte di un'alta attività biologica, mostri una bassa biodisponibilità (Tomè-Carneiro, 2013).

Aloe emodina

Tra le sostanze naturali in grado di inibire la vitalità delle cellule neoplastiche vi è anche l'aloemodina che è stata protagonista di numerosi studi negli ultimi anni.

Questa molecola si ottiene dal gel dell'aloè, una pianta a fiore tipica dei climi secchi e aridi. Delle circa 600 specie di *Aloe* classificate, quella più nota è senza dubbio *Aloe vera*. Il gel contenuto nelle sue foglie, le cui proprietà organolettiche sono note sin dai tempi dell'antichità, racchiude ben 75 principi potenzialmente attivi (Atherton, 1997; Shelton 1991; Atherton, 1998) appartenenti a diverse classi molecolari tra cui: minerali, enzimi, zuccheri, acidi grassi, ormoni e metaboliti secondari.

Tra le molecole appartenenti a quest'ultima classe sono presenti gli antrachinoni, di cui fa parte l'aloemodina. È stata già ampiamente dimostrata la capacità di questa molecola di contrastare lo sviluppo di molte neoplasie attraverso diversi meccanismi come l'avvio del processo apoptotico delle cellule tumorali (Chen, 2007) e l'induzione del differenziamento cellulare (Guo, 2007). Inoltre, è stato dimostrato che l'aloemodina è in grado di inibire la

proliferazione delle cellule murine B16-F10 (melanoma della pelle) aumentando la loro capacità di adesione al substrato (Tabolacci, 2010).

L'obiettivo principale del nostro lavoro è stato quello di studiare il meccanismo di azione dell'aloè emodin su una linea cellulare tumorale di adenocarcinoma mammario umano, denominata SKBR3. Lo studio è stato condotto trattando questa linea con l'aloè emodina a diversi tempi e concentrazioni. Per valutare l'effetto che questa molecola ha sulle cellule SKBR3 è stato condotto un saggio biochimico-colorimetrico chiamato MTT. Inoltre, per visualizzare le alterazioni morfologico-ultrastrutturali a carico di queste cellule, dopo il trattamento con aloè emodina, sono state condotte osservazioni al microscopio elettronico a scansione (*Scanning Electron Microscope*, SEM).

Inoltre l'aloè emodina ha la capacità di modulazione dell'immunità e potrebbe essere utile nel trattamento di varie malattie infiammatorie (Lu, 2009). Tuttavia il ruolo della aloè emodina nella modulazione delle risposte immunitarie umane non è ancora del tutto noto. L'altro obiettivo di questo studio è stato quello di analizzare la capacità dell'aloè emodina di modulare la risposta immunitaria delle cellule T. A questo scopo, sono stati reclutati soggetti sani per valutare la capacità dell'aloè emodina di modulare i suoi effetti sulle funzioni delle cellule T (cioè apoptosi, proliferazione e produzione di citochine) attraverso l'analisi citofluorimetrica.

Materiali e metodi

Colture cellulari

Gli esperimenti sono stati condotti su cellule SKBR3, una linea tumorale umana isolata per la prima volta nel 1970 da un versamento pleurico in una donna caucasica di 43 anni affetta da adenocarcinoma della mammella. Questa linea, in particolare, è stata fornita dalla ATCC (*American Type Culture Collection*).

Le cellule sono state coltivate in terreno RPMI (Roswell Park Memorial Institute) (*EuroClone*) addizionato con il 10% di siero fetale bovino (Fetal Bovine Serum, FBS) (*HyClone*, *Thermo Scientific*), 1% di penicillina-streptomina, 1% di L-glutammina (*EuroClone*), 1% di amminoacidi non essenziali (*EuroClone*), incubate a 37°C in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂ e sub-coltivate a confluenza usando tripsina/ acido etilendiamminotetraacetico (EDTA).

Aloè emodina

L'aloè emodina (1,8-diidrossi-3-(idrossimetil)-9,10-antracenedione) (Figura 1) della Sigma-Aldrich è mantenuta in una soluzione 50 mg/mL con DMSO (dimetilsolfossido).

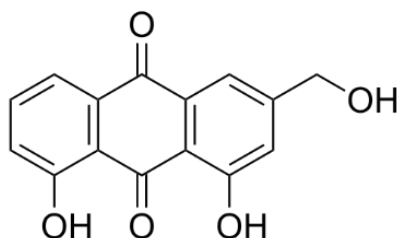


Figura 1. Struttura dell'aloè emodina (1,8-diidrossi-3-(idrossimetil)-9,10-antracenedione)

Test di citotossicità

La citotossicità è la capacità posseduta da un agente di tipo chimico, fisico o biologico di causare danno a una cellula. Per valutare l'entità di questo danno, sono stati messi a punto alcuni saggi, tra cui quello da noi utilizzato, è il saggio con MTT. L'acronimo indica il composto chimico utilizzato per eseguirlo (bromuro di dimetil-tiazolo-difenil-tetrazolio). Le cellule sono state seminate in una piastra da 96 pozzetti e trattate a concentrazioni e tempi crescenti, in triplicato. Terminato il trattamento, viene aggiunta la soluzione di MTT 0,5 mg/mL in tampone fosfato salino (*Phosphate-Buffered Saline*, PBS) e le cellule vengono nuovamente incubate per 1-3 ore a 37°C affinché si formi il sale di formazano. Le cellule vive sono in grado di assumere questo composto e convertirlo, grazie a un enzima contenuto nei mitocondri, in cristalli di formazano dal colore blu-violaceo. Quante più cellule sono sopravvissute, tanto maggiore sarà la frazione di mitocondri metabolicamente attivi e, di conseguenza, la proporzione di MTT convertito in formazano. Al termine, il sale viene solubilizzato in una soluzione di DMSO e la piastra viene letta al luminometro per misurare l'assorbanza a 570 nm. Quello utilizzato per la lettura è un *Fusion Universal Microplate Analyzer* della *Packard* in dotazione presso l'Istituto Superiore di Sanità (ISS).

Analisi statistica

Il saggio con MTT è stato ripetuto in maniera indipendente per tre volte per ogni linea cellulare. I risultati sono stati quindi rappresentati come media \pm deviazione standard. L'analisi statistica è stata effettuata con il t-test e le differenze sono state considerate significative per $p < 0,05$.

Microscopia elettronica a scansione

La microscopia elettronica a scansione permette lo studio della morfologia di superficie di campioni biologici opportunamente preparati e delle eventuali modificazioni indotte, ad esempio, dal trattamento con agenti di varia natura.

L'osservazione delle cellule al SEM prevede una preparazione del campione. Le cellule sono state seminate nelle piastre da 12 pozzetti su vetrini da microscopia da 13 mm. Dopo aver rimosso il terreno, la fissazione è stata effettuata con glutaraldeide al 2,5% (si lega alle proteine delle cellule) e tetrossido di osmio (OsO_4) all'1% preparati entrambi in tampone cacodilato 0,2 M (pH 7,2).

Dopo i lavaggi con lo stesso tampone, è stata effettuata la disidratazione dei campioni in concentrazioni crescenti di etanolo in acqua. La successiva fase di essiccamento è stata eseguita mediante l'essiccamento da punto critico (*Critical Point Dryer*, CPD). I campioni quindi sono stati montati sugli stubs di alluminio e resi conduttivi grazie alla ricopertura con d'oro utilizzando lo *Sputtering* (SCD 040 Balzers). I campioni sono stati osservati e fotografati al SEM. Nel nostro studio è stato utilizzato il SEM FEI Quanta Inspect FEG (FEI, USA) in dotazione presso l'ISS.

Isolamento delle cellule mononucleate del sangue periferico e colture cellulari

Le cellule mononucleate del sangue periferico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMC), ottenute da campioni di sangue di donatori sani trattati con l'eparina, sono state isolate mediante centrifugazione in gradiente di densità *Ficoll-Hypaque* e coltivate in terreno RPMI-1640 (Gibco

BRL, Grand Island, NY, USA) addizionato con il 10% di siero fetale bovino (Hyclone Laboratories, South Logan, UT, USA), 2 mM di glutammina (Sigma, St. Louis, MO, USA) e 50 µg/mL di gentamicina (Sigma). Per l'attivazione dei linfociti, i PBMC sono stati coltivati in presenza di anticorpo monoclonale anti-CD3 legato alla piastra (mAb, clone UCHT1, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) a 4 µg/mL per 72 h e trattati con Aloe Emodin per le ultime 48 h di coltura. Per la produzione di citochine, le PBMC non trattate o trattate sono state stimulate come segue: per l'analisi di IFN- γ e TNF- α , 25 ng/mL di forbolo miristato acetato (PMA, Sigma) e 1 µg/mL di ionomicina (Sigma) per l'ultimo 16 h di coltura; per l'analisi dell'IL-17, 50 ng/mL di PMA (Sigma) e 1 µg/mL di ionomicina (Sigma) per le ultime 4 ore di coltura; e per IL-10, 2,5 µg/mL di fitoemoagglutinina (Sigma) per le ultime 16 ore di coltura. Per inibire la secrezione di citochine, sono stati aggiunti 10 µg/mL di brefeldina A (Sigma) a ciascuna condizione all'inizio della stimolazione.

Citofluorimetria

La fenotipizzazione della superficie cellulare è stata eseguita mediante citometria a flusso. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali (mAb): anti-CD4 coniugati con allofococianina (APC), anticorpi anti-CD8 coniugati con peridina clorofilla (PerP) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). La stessa quantità dell'isotipo di controllo, IgG di topo, è stata usata in parallelo. Per l'analisi della produzione di citochine, le cellule trattate sono state fissate con paraformaldeide al 4% e permeabilizzate con soluzione permeabilizzante FACS (BD Biosciences) per il rilevamento dell'IFN- γ , TNF- α , e IL-10 mentre per l'IL-17 le cellule sono state fissate e permeabilizzate con fissativo intracellulare e tampone di permeabilizzazione dell'*eBioscience* (eBioscience, San Diego, CA, USA). Sono stati utilizzati i seguenti mAb specifici per le citochine: anti-IFN- γ marcato con fluoresceina isotiocianato (FITC), anti-TNF- α marcato con PE, anti-IL-10 marcato PE (tutti da BD Biosciences) e anti-IL-17 marcato FITC (eBioscience). In parallelo sono stati utilizzati appropriati controlli isotipici negativi. L'apoptosi è stata quantificata utilizzando il kit di rilevamento dell'annessina V (AV) coniugata con FITC e dello ioduro di propidio (PI) (Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA, USA) secondo il protocollo della casa produttrice. La proliferazione è stata valutata misurando l'espressione dell'antigene nucleare Ki-67 utilizzando mAb Ki-67 marcato con FITC secondo il protocollo della casa produttrice (BD Biosciences). L'acquisizione è stata eseguita su un citometro a flusso FACSCalibur (BD Biosciences) e sono stati eseguiti almeno 50.000 eventi per campione. I dati sono stati analizzati utilizzando il software Cell Quest Pro (BD Biosciences).

Risultati

Effetto dell'aloë emodina sulla vitalità delle cellule SKBR3

Nella Figura 2 sono mostrati i risultati del saggio MTT ottenuti dopo incubazione (per 24 e 48 ore) con aloë emodina alla concentrazione di 6,25; 12,5 e 25,0 µM. Come si può osservare l'aloë emodina è in grado di inibire la crescita delle cellule SKBR3 in maniera tempo e dose-dipendente. Infatti, l'effetto citotossico dell'aloë emodina, con una significativa riduzione della vitalità cellulare, è maggiore nelle cellule SKBR3 trattate con aloë emodina alla concentrazione più alta (25,0 µM) per 48 ore. La percentuale di vitalità cellulare (esaminata con test MTT) è stata calcolata considerando il valore di controllo come 100%.

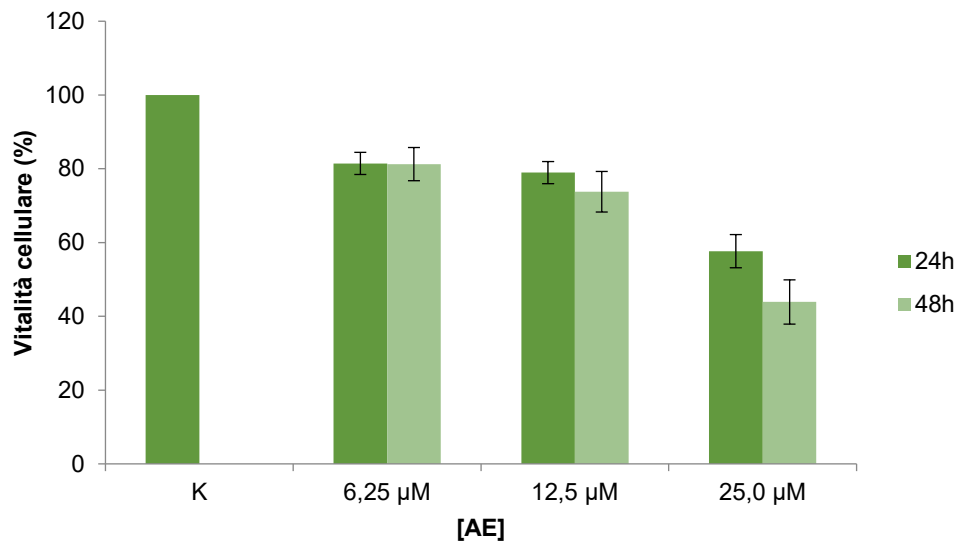


Figura 2. Saggio MTT ottenuti sulle cellule di adenocarcinoma mammario umano, SKBR3 dopo incubazione (24 e 48 ore) con aloe emodina alla concentrazione di 6,25; 12,5 e 25,0 µM

Alterazioni morfologiche indotte dal trattamento con Aloe emodin

Nel corso del nostro lavoro sperimentale abbiamo inoltre osservato al SEM le alterazioni morfologico-ultrastrutturali delle cellule SKBR3 dopo incubazione con aloe emodina (6,25; 12,5 e 25,0 µM per 24 e 48 ore). La Figura 3a mostra le cellule SKBR3 di controllo con la loro tipica morfologia poligonale. Sulla superficie cellulare sono ben visibili i numerosi microvilli e “ruffles” distribuiti in modo casuale sulla loro superficie cellulare. Il trattamento con aloe emodina a 6,25 µM per 24 ore non causa significative alterazioni morfologiche, infatti in Figura 3b le cellule SKBR3 appaiono molto simili alle cellule di controllo (Figura 3a) confermando che l’aloe emodina a questa concentrazione non è citotossica come già dimostrato dai dati ottenuti con il saggio MTT (Figura 2). Minime alterazione morfologiche (cellule meno adese al substrato con microvilli non uniformemente distribuiti sulla superficie cellulare) si possono rilevare nelle cellule tumorali trattate per 24 ore con aloe emodina alla concentrazione più alta (25,0 µM), come mostrato nelle Figure 3c e d (ingrandimento dell’inserito della Figura 3c). Le alterazioni morfologiche ultrastrutturali più evidenti, si osservano invece nelle cellule SKBR3, trattate con aloe emodina al 25,0 µM per 48 ore, (Figure 4c-d). Le microfotografie acquisite al SEM mostrano che alcune cellule appaiono arrotondate e parzialmente staccate dal substrato; in altre si possono osservare anche le “bolle” (*bleb* in inglese) ovvero i caratteristici rigonfiamenti della membrana cellulare presenti sulla superficie delle cellule in cui si è attivato il processo di morte cellulare per apoptosi (Figura 4c, frecce). È noto infatti che durante il processo apoptotico il citoscheletro della cellula subisce dei seri danni che causano il rigonfiamento della membrana plasmatica con la formazione delle “blebs” di superficie. In Figura 4d, l’ingrandimento dell’inserito evidenziato nella Figura 4c, mostra che il trattamento con aloe emodina a 25,0 µM causa in alcune cellule delle alterazioni morfologiche molto particolari: queste mostrano delle estroflessioni filiformi che escono dalla membrana.

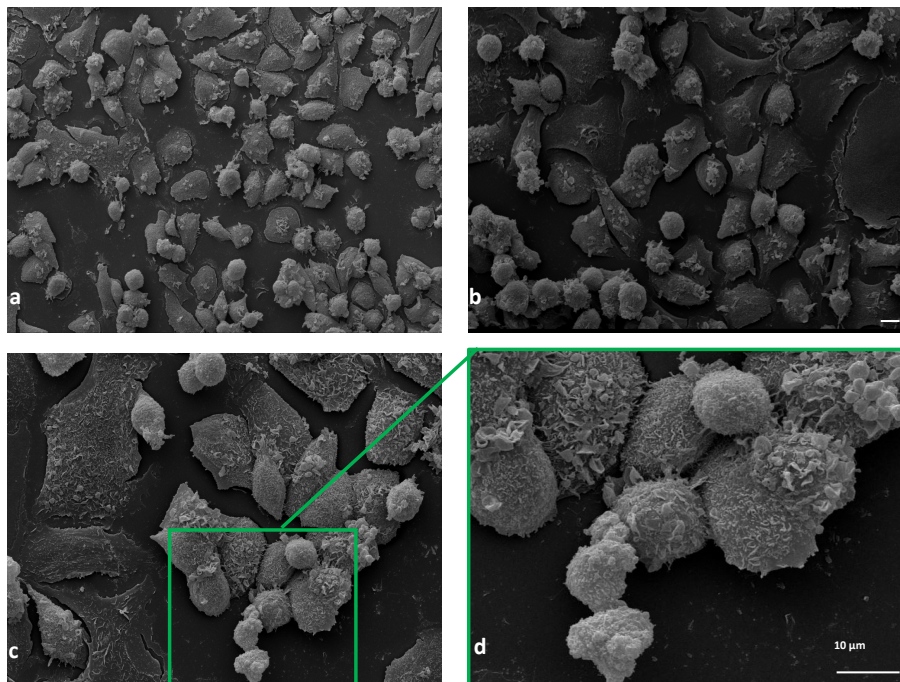


Figura 3. Microfotografie SEM delle cellule SKBR3: a) cellule di controllo; b) cellule SKBR3 trattate con 6,25 μM di aloe emodina per 24 ore; c) cellule SKBR3 trattate con 25,0 μM di aloe emodina per 24 ore e d) ingrandimento dell'inserto della Figura 3c

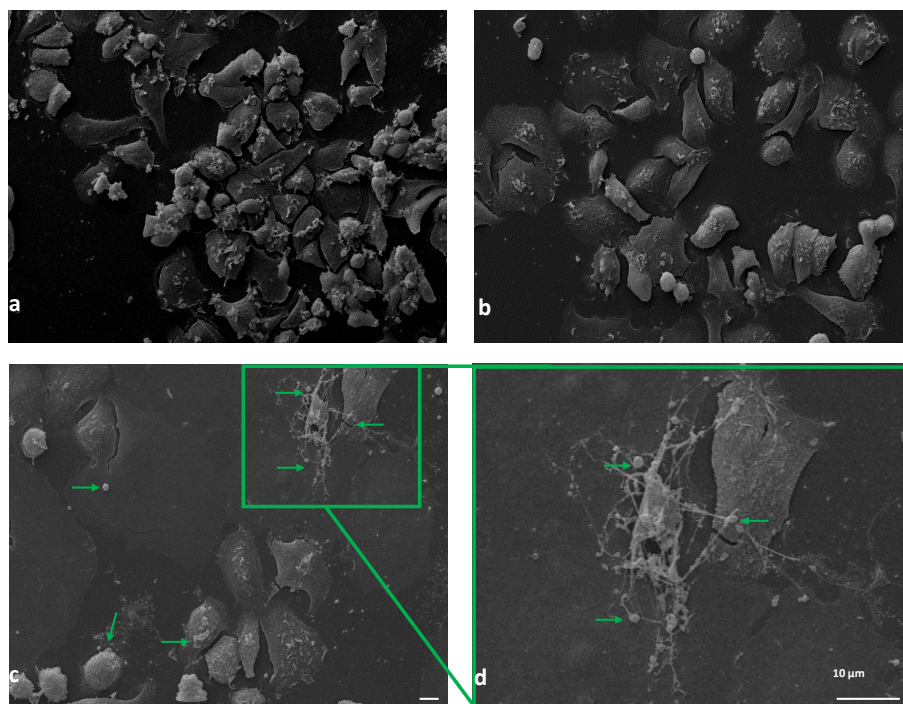


Figura 4. Microfotografie SEM delle cellule SKBR3: a) cellule di controllo; b) cellule SKBR3 trattate con 6,25 μM di AE per 48 ore; c) cellule SKBR3 trattate con 25,0 μM di aloe emodina per 48 ore; le frecce indicano le blebs presenti sulla superficie delle cellule sofferenti; d) ingrandimento dell'inserto della Figura 4c

Effetti dipendenti dall'aloè emodina sull'apoptosi, sulla proliferazione e sulla produzione di citochine nei linfociti T del sangue periferico da donatori sani

Successivamente abbiamo valutato la capacità dell'aloè emodina di influenzare l'omeostasi dei linfociti T in termini di apoptosi cellulare, proliferazione e produzione di citochine. L'aloè emodina è stata in grado di indurre un aumento dell'apoptosi e una riduzione della proliferazione nei linfociti T, misurata attraverso il saggio di apoptosi che prevede la doppia colorazione con annessina V (AV) e ioduro di propidio (PI) e l'analisi dell'espressione dell'antigene nucleare Ki-67 dopo trattamento con l'aloè emodina. Sono state studiate anche le citochine pro-infiammatorie (IFN γ , TNF- α e IL-17) e anti-infiammatorie (IL-10). In particolare, l'aloè emodina ha ridotto il livello di espressione intracellulare delle citochine pro-infiammatorie IL-17, IFN γ e TNF- α nei linfociti T CD4+ e CD8+ e ha aumentato il livello di IL-10+.

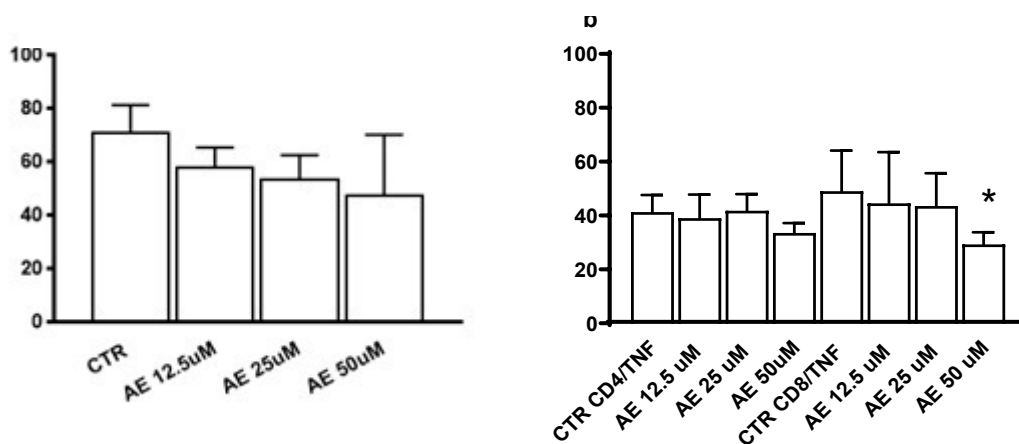


Figura 5. Effetti dell'aloè emodina sulla proliferazione dei linfociti T nel sangue periferico di soggetti sani. I dati sono riportati come media \pm SD (B). *P < 0,05 verso le cellule non trattate. A: analisi dell'espressione dell'antigene nucleare Ki-67 dopo trattamento con l'aloè emodina; B: valutazione dell'espressione delle citochine pro-infiammatorie dopo trattamento con l'aloè emodina

In Figura 5 sono mostrati gli effetti dell'aloè emodina sulla proliferazione dei linfociti T nel sangue periferico di soggetti sani. La proliferazione cellulare è stata valutata mediante citometria a flusso misurando l'espressione dell'antigene nucleare Ki-67 sui linfociti T dopo attivazione con mAb anti-CD3 per 72 ore e trattamento con diverse concentrazioni di aloè emodina per le ultime 48 ore di coltura. I dati sono riportati come media \pm SD (A). Per la produzione di citochine, i dati mostrano che l'aloè emodina riduce l'espressione della citochina pro-infiammatoria TNF- α nei linfociti T CD4+ e CD8+ di donatori sani.

Discussione

L'Aloe (gen. *Aloe*) identifica un gruppo di piante succulente appartenente alla famiglia delle *Aloaceae*. La maggior parte originarie dell'Africa. Sono piante perenni, con fusto semplice o

ramificato, alto anche qualche metro in alcune specie. Il fusto e i rami terminano con un ciuffo di foglie carnose, spesso aculeate al margine; queste presentano vari adattamenti al clima arido, come cuticola spessa, cera o mucillagine nei tessuti interni. I fiori sono in grappoli semplici o composti, hanno i sei tepali saldati in un tubo e sono rossi, gialli o verdicci. Il fusto presenta struttura secondaria.

Dalla specie oggi più nota, *Aloe vera*, si ricava un gel dalle numerose proprietà organolettiche. Tra i composti contenuti al suo interno, l'aloè emodina presenta proprietà curative di grande interesse biomedico. Molti studi hanno individuato un suo ruolo nella cura della retinopatia diabetica (Wu, 2013), nella protezione delle cellule β del pancreas dalla glucotossicità (Alshatwi, 2016), nella lotta alla leishmaniosi (Dalimi, 2015) e alla psoriasi (Divya, 2016). L'aloè emodina è inoltre in grado di stimolare, nelle cellule ATDC5 (una linea cellulare condrogenica), la sintesi della cartilagine (Yang, 2016).

In ambito oncologico, è noto che l'aloè emodina è in grado di indurre l'apoptosi in molti tipi di cellule tumorali (Pecere, 2000; Suboj, 2012; Adamczyk, 2015; Chihara, 2015).

In questo studio abbiamo valutato l'attività dell'aloè emodina sulla vitalità e sulla morfologia della linea cellulare SKBR3 di adenocarcinoma mammario umano.

La valutazione della vitalità cellulare ottenuta mediante il saggio MTT ha dimostrato che la vitalità cellulare decresce in maniera dose/tempo dipendente. Inoltre, le osservazioni eseguite al SEM dopo 24 ore di incubazione hanno dimostrato che a basse concentrazioni l'aloè emodina (6,25 μ M) non induce cambiamenti ultrastrutturali significativi, mentre a concentrazioni più alte (25,0 μ M) le cellule risultano maggiormente alterate: alcune di queste, ancora adese al substrato, presentano numerose lunghe e sottili estroflessioni dalla superficie cellulare. Si può quindi ipotizzare che l'Aloè emodin sia in grado di alterare anche il citoscheletro delle cellule tumorali SKBR3 favorendo la loro adesione al substrato e riducendone in questo modo la loro capacità invasiva a livello tissutale. Inoltre, i risultati preliminari ottenuti hanno dimostrato che l'aloè emodina è in grado di ridurre l'espressione della citochina pro-infiammatoria TNF- α nelle popolazioni linfocitarie T, sia CD4+ e CD8+ di donatori sani.

Conclusioni

Questo lavoro sperimentale ha confermato che l'Aloè emodin è in grado di ridurre sensibilmente la proliferazione delle cellule tumorali di adenocarcinoma mammario SKBR3. Il nostro obiettivo futuro sarà quello di chiarire quale sia il processo biochimico attivato dall'aloè emodina in modo tale da poter meglio spiegare i risultati ottenuti. Dalla letteratura scientifica si evince infatti che nelle cellule tumorali trattate con aloè emodina sono state valutate ad esempio l'espressione delle caspasi, del citocromo c e della proteina PARP (Suboj, 2012; Lee, 2001).

Il nostro interesse sarà quindi di studiare, in modo più approfondito, l'espressione delle molecole coinvolte nel processo apoptotico.

Inoltre, saranno eseguiti degli esperimenti in microscopia a fluorescenza per studiare le alterazioni del citoscheletro delle cellule SKBR3 dopo incubazione con l'aloè emodina per valutare se e come questa molecola possa andare a interferire con il citoscheletro cellulare. In conclusione, il nostro studio *in vitro* ha fornito informazioni sulle attività antinfiammatorie dell'aloè emodina. Tuttavia, sono necessari ulteriori test per confermare il potenziale ruolo di questo composto come strumento terapeutico.

Bibliografia

- Adamczyk A, Niemiec J, Janecka A, Harazin-Lechowska A, Ambicka A, Grela-Wojewoda A, Domagala-Haduch M, Cedrych I, Majchrzyk K, Kruczak A, Rys J, Jakubowicz J. Prognostic value of PIK3CA mutation status, PTEN and androgen receptor expression for metastasis-free survival in HER2-positive breast cancer patients treated with trastuzumab in adjuvant setting. *Pol J Pathol* 2015;66:133-41.
- Alshatwi AA, Subash-Babu P. Aloe-Emodin protects RIN-5F (Pancreatic β -cell) cell from glucotoxicity via regulation of pro-inflammatory cytokine and downregulation of bax and caspase 3. *Biol Ther* 2016;24(1):49-56.
- Ammon HPT. Modulation of the immune system by *Boswellia serrata* extracts and boswellic acids. *Phytomed* 2010;17:862-7.
- Atherton P. (Ed.) *The essential Aloe vera: The actions and the evidence*. 2nd ed Mill Enterprises;1997.
- Atherton P. *Aloe vera* revisited. *Br J Phytother* 1998;4:76-83.
- Bernardo A, Palumbo R, Pedersini R, Rota Caremoli E, Gambaro AR, Ferzi A, Riva F, Grasso D, Danova M, Tarenzi E, Torri V, Cazzaniga ME. Nab-Paclitaxel in advanced HER2-negative breast cancer patients: efficacy and safety beyond clinical trials. *Clin Breast Cancer* 2017;8:433-40.
- Chen SH, Lin KY, Chang CC, Fang CL, Lin CP. Aloe-emodin-induced apoptosis in human gastric carcinoma cells. *FoodChem Toxicol* 2007;45(11):2296-303.
- Chihara T, Shimpo K, Beppu H, Yamamoto N, Kaneko T, Wakamatsu K, Sonoda S. Effects of Aloe-emodin and emodin on proliferation of the mkn45 human gastric cancer cell line. *Asian Pac J Cancer P* 2015;16(9):3887-91.
- Dalimi A, Delavari M, Ghaffarifar F, Sadraei J. *In vitro* and *in vivo* antileishmanial effects of aloe-emodin on *Leishmania major*. *J Tradit Complement Med* 2015;5(2):96-9.
- Divya G, Panonnummal R, Gupta S, Jayakumar R, Sabitha M. Acitretin and aloe-emodin loaded chitin nanogel for the treatment of psoriasis. *Eur J Pharm Biopharm* 2016;107:97-109.
- Feng YH, Zhou WL, Wu QL, Li XY, Zhao WM, Zou JP. Low dose of resveratrol enhanced immune response of mice. *Acta Pharmacol Sin* 2002;23(10):893-7.
- Guo JM, Xiao BX, Liu Q, Zhang S, Liu DH, Gong ZH. Anticancer effect of aloe-emodin on cervical cancer cells involves G2/M arrest and induction of differentiation. *Acta Pharmacol Sin* 2007;28(12):1991-5.
- Lamb YN, Scott LJ. Liposomal Irinotecan: a review in metastatic pancreatic adenocarcinoma *Drugs* 2017;77:785-92.
- Lee HM. Protein Kinase C Involvement in Aloe-Emodin- and emodin-induced apoptosis in lung carcinoma cell. *Brit J Pharmacol* 2001;134(5):1093-103.
- Lu HF, Lai KC, Hsu SC. Involvement of matrix metal-loproteinases on the inhibition of cells invasion and migration by emodin in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurochem Res* 2009;34:1575-83.
- Negi B, Kumar D, Rawat DS. Marine peptides as anticancer agents: a remedy to mankind by nature. *Current Protein Pept Sc* 2016;17:18(9):885-904.
- Nobili S, Lippi D, Witort E, Donnicic M, Bausic L, Minia E, Capaccioli S. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacol Res* 2009;59(6):365-78.
- Pecere T, Gazzola MV, Mucignat C, Parolin C, Dalla Vecchia F, Cavaggioni A, Basso G, Diaspro A, Salvato B, Carli M, Palu' G. Aloe-emodin is a new type of anticancer agent with selective activity against neuroectodermal tumors. *Cancer Res* 2000;60:2800-4.
- Shelton M. *Aloe vera*, its chemical and therapeutic properties. *Int J Dermatol* 1991;30: 679-83.
- Sidaway P. Vinflunine is an effective maintenance therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14:328

- Suboj P, Babykuttya S, Srinivasb P, Gopalaa S. Aloe emodin induces g2/m cell cycle arrest and apoptosis via activation of caspase-6 in human colon cancer cells. *Pharmacology* 2012;89:91-8.
- Tabolacci C, Lentini A, Mattioli P, Provenzano B, Oliverio S, Carlomosti F, Beninati S. Antitumor properties of aloe-emodin and induction of transglutaminase 2 activity in B16-F10 melanoma cells. *Life Sci* 2010;87:316-24.
- Tajbakhsh A, Hasanzadeh M., Rezaee M, Khedri M, Khazaei M, Sales SS, Ferns GA, Hassanian SM, Avan, A. Therapeutic potential of novel formulated forms of curcumin in the treatment of breast cancer by the targeting of cellular and physiological dysregulated pathways. *J Cell Physiol* 2017;233(3) 2183-92.
- Tomé-Carneiro J, Larrosa M, González-Sarriás A, Tomás-Barberán FA, García-Conesa MT, Espín JC. Resveratrol and clinical trials: the crossroad from *in vitro* studies to human evidence. *Cur Pharm Des* 2013;19(34):6064-93.
- Waksman SA, Woodruff HB. Actinomyces antibioticus, a new soil organism antagonistic to pathogenic and non-pathogenic bacteria. *J Bacteriol* 1941;42:231-49.
- Wu J, Ke X, Wang W, Zhang H, Ma N, Fu W, Zhao M, Gao X, Hao X, Zhang, Z. Aloe-emodin suppresses hypoxia-induced retinal angiogenesis via inhibition of HIF-1 α /VEGF pathway. *Int J Biol Sci* 2016;12(11):1363-71.
- Yang M, Li L, Heo SM, Soh Y. Aloe-Emodin induces chondrogenic differentiation of ATDC5 cells via MAP kinases and BMP-2 signaling pathways. *Biomol Ther* 2016;24(4):395-401.

AZIONE ANTINFIAMMATORIA E ANTALGICA DELLA CURCUMINA OROSOLUBILE

Massimo Bonucci (a), Cristina Villivà (a) Simona Dell'Arte (b), Alberto Siniscalchi (b)

(a) Associazione per la ricerca di terapie oncologiche integrate (ARTOI), Roma

(b) Dipartimento di Cure Palliative Oncologiche, Casa di Cura "Villa Silvana", Aprilia, Roma

Introduzione

L'infiammazione è considerata uno stato patologico dell'essere umano. Sono noti tutti i processi che inducono uno stato infiammatorio e tutti quelli che conducono da questo a una patologia cronico degenerativa fino al cancro.

Il mantenimento dello stato flogistico produce un danno a molte strutture cellulari con conseguente perdita di controlli riparativi. Uno stato infiammatorio conduce, tra l'altro, alla liberazione di mediatori chimici con conseguente ripercussione sullo stato recettoriale a livello cellulare e il risultato finale è l'innescò del dolore. In natura molte sostanze di origine vegetale hanno dimostrato la loro azione anti-infiammatoria con meccanismi specifici. Fra queste annoveriamo la *Curcuma longa*, e in particolare uno dei suoi maggiori principi attivi, la curcumina (1).

Questa molecola ha dimostrato molteplici azioni e una fra le più importanti è il blocco del fattore nucleare K-B (*nuclear factor kappa-B*, NF-κB), indicato come il principale gene deputato all'innescò della infiammazione (2).

Uno dei maggiori problemi nell'uso della curcumina è la sua scarsa biodisponibilità con conseguente scarsa attività biologica (3). Studi *in vivo* infatti hanno dimostrato una bassa concentrazione plasmatica del principio attivo anche dopo assunzione di abbondanti quantità di sostanza: presenza di sole 50 nmoli/mL nel sangue dopo assunzione di 12 grammi di curcuma per bocca (3). Il difficile passaggio attraverso la mucosa gastrica e successivo il passaggio enteroepatico ne limitano la biodisponibilità (4).

In questo studio si è voluto valutare l'azione di un preparato a base di curcuma orosolubile, dimostrando la sua efficacia nel ridurre l'infiammazione sistemica valutando due parametri a essa strettamente legati, la velocità di eritrosedimentazione (VES) e la proteina C-reattiva (PCR).

Inoltre come secondo dato collaterale è stata fatta una valutazione, attraverso la misurazione dell'intensità del dolore utilizzando la *Visual Analogue Scale* (VAS), una scala di valutazione soggettiva del dolore attraverso la quale il paziente descrive l'intensità del dolore percepito da un minimo di zero a un massimo di 10.

Materiale e metodi

Lo studio ha preso in esame 41 pazienti afferenti alla Struttura Hospice "Villa Silvana". Tutti i pazienti erano giunti con un loro trattamento farmacologico che veniva mantenuto (antidolorifici, cortisonici, antiinfiammatori).

Essi presentavano una malattia neoplastica in progressione ed erano stati dichiarati *non responder* per trattamenti antitumorali (Tabella 1).

Tabella 1. Tipi di neoplasie riscontrate nello studio per sede

Sede della neoplasia	Totale neoplasie
Tratto Gastroenterico	11
Polmone	7
Mammella	4
Testa/Collo	3
Multipli	3
Fegato	2
Glioblastoma	2
Ematologico	2
Ignoto	2
Tumore stromale gastrointestinale (GIST)	1
Vescica	1
Vulva	1
Prostata	1
Sarcopenia	1
Totale	41

Essi mostravano inoltre un *Karnofsky performance status scale* (KPS), o indice di *Karnofsky* (un indice di valutazione della qualità della vita, dell'autonomia, che va da una percentuale di 0 fino a 100, dove 100 coincide col pieno benessere) di 30-50 alla prima valutazione.

All'entrata nella struttura Hospice a questi pazienti è stato fatto un prelievo ematologico per la valutazione di numerosi parametri di funzionalità d'organo fra cui anche i due principali indici di flogosi (VES e PCR) (T0 in Tabella 2).

Veniva inoltre eseguita una valutazione del dolore attraverso la scala VAS e la rivalutazione è stata eseguita ogni settimana per 2 settimane.

A questi pazienti è stata somministrata in aggiunta al trattamento standard sopra riportato, 1 bustina al giorno di curcumina orosolubile.

Gli stessi esami ematologici sono stati ripetuti dopo 10 giorni (T10 in Tabella 2).

Risultati

Dei 41 pazienti hanno concluso il trattamento in 38. Per quanto riguarda il dato ematologico dei 38 casi 31, ovvero il 76%, hanno avuto una riduzione degli indici infiammatori mentre in 7 (24%) non ci sono stati miglioramenti.

Andando a valutare nello specifico la percentuale di riduzione degli indici infiammatori presi in esame dei pazienti che hanno avuto risultati positivi in 11 casi (35%) la riduzione di VES e PCR è stata in media di oltre il 70%, in 5 casi (15%) la media è stata del 35% e nei restanti 15 (50%) la riduzione è stata in media del 15%.

Per quanto riguarda la componente del dolore anche in questo caso hanno concluso la rilevazione in 38 pazienti. In questi pazienti abbiamo avuto in tutti una riduzione del dolore che è stata completa nel 62% (23 casi) e parziale nel 38% (15%).

Tabella 2. Quadro riassuntivo dei 41 pazienti con i valori di VES e PCR all'ingresso (T0) e dopo 10 giorni (T10) di trattamento con curcumina idrosolubile. (Valori Normali di VES=10-20 mm/h, PCR < a 5-10 mg/L)

Neoplasia	T0		T10	
	VES	PCR	VES	PCR
Metastasi da tumore primitivo ignoto	97	54	22	10
Epatocarcinoma	154	67	38	15
Gastrico	162	24	84	7
Polmone + vescica	44	17	40	15
Colon + mammella	53	32	-	-
Polmone	28	41	11	12
Polmone	13	11	20	19
Mammella	41	14	35	9
Polmone	102	72	78	36
Polmone	18	9	17	11
Mieloma multiplo	84	50	75	36
Mielodisplasia	102	94	64	45
Polmone	20	12	18	20
Metastasi da tumore primitivo ignoto	56	23	29	18
Prostata	98	57	74	49
Colon	18	9	18	8
Pancreas	102	87	90	64
Glioblastoma	24	12	21	10
Colon	75	77	98	78
Polmone	112	53	90	50
Polmone	42	20	34	18
Mammella	65	14	-	-
Laringe	118	79	33	23
Tumore stromale gastrointestinale (GIST)	37	28	25	16
Vescica	158	90	101	38
Retto	21	9	-	-
Retto	85	41	70	11
Mammella	107	75	40	21
Glioblastoma	26	14	24	11
Retto	38	18	24	12
Polmone + vescica	35	9	45	12
Vulva	102	80	90	78
Decadimento organico	50	34	41	24
Stomaco	75	58	50	38
Pancreas	127	90	95	41
Mammella	24	9	22	11
Colon	85	54	33	18
Colangiocarcinoma	43	16	35	12
Colon	29	11	22	10
Laringe	120	80	60	45
Tonsilla	112	64	58	23

Conclusioni

L'infiammazione è una componente importante delle malattie cronico degenerative e la sua presenza può influire anche sulla progressione neoplastica. Il suo controllo e la sua riduzione porta a un miglioramento dello stato generale. Lo scopo dell'uso di sostanze naturali come agenti antiinfiammatori è proprio quello di cercare di controllare questa flogosi con l'intento di controllare anche le patologie cronico degenerative. La curcuma in generale come fitocomplesso

e il suo principio attivo, la curcumina, hanno dimostrato più volte di essere in grado di contenere l'infiammazione, ma il problema più grande è la loro scarsa biodisponibilità. In questo studio è stato dimostrato che la curcumina non solo entra in circolo, ma ha anche la capacità di ridurre in maniera importante gli indici infiammatori nei pazienti oncologici. Inoltre la riduzione degli indici flogistici ha comportato anche una riduzione della componente algica. Ulteriori studi saranno indispensabili per comprendere a fondo la modalità di azione sinergica della curcumina con gli altri trattamenti seguiti dai pazienti oncologici.

Bibliografia

1. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as “Curcumin”: from the kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol* 2008;75(4):787-809.
2. Aggarwal BB. Targeting inflammation-induced obesity and metabolic diseases by curcumin and other nutraceuticals. *Annu Rev Nutr* 2010;30:173-99.
3. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm* 2007;4(6):807-18.
4. Lopresti AL. The problem of curcumin and its bioavailability: could its gastrointestinal influence contribute to its overall health-enhancing effects? *Adv Nutr* 2018;9(1):41-50.

ILDEGARDA DI BINGEN, PIONIERA DELLA MEDICINA INTEGRATA IN EPOCA MEDIEVALE

Andrea Geraci

Centro Nazionale Salute Globale - Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Ildegarda di Bingen nacque nel 1098 a Bermersheim vor der Höhe, in Germania, e morì il 17 settembre 1179 a Bingen am Rhein, sempre in Germania. Fu beatificata nel 1324 e il 10 maggio 2012 Papa Benedetto XVI la nominò dottore della Chiesa. I genitori, Matilde e Ildeberto di Bermersheim, erano dei nobili. Fu una donna “Illuminata”, sensibile e veramente ispirata, lei stessa descriveva così l’evento fondamentale della sua vita: “Nel mio quinto anno di vita vidi una luce così grande che la mia anima ne fu scossa però, per la mia tenera età, non potei parlarne...”. Durante il periodo adolescenziale Ildegarda decise liberamente di entrare nell’ordine benedettino.

Viene descritta come una donna di polso, dal carattere volitivo e delicato allo stesso tempo, una donna che interagì con gli uomini potenti del tempo incontrandoli personalmente e incutendo in loro una certa soggezione. Scrisse circa 300 lettere a numerosi sovrani tra cui Corrado III, Federico Barbarossa, Enrico II di Inghilterra o pontefici come Eugenio III, Anastasio IV, Adriano IV.

Una donna elevata

Immaginiamo che in quel periodo medievale parlare delle problematiche femminili, come il ciclo mestruale, la sessualità, la maternità, il parto, l’allattamento poteva creare qualche perplessità, ma lei lo faceva in maniera chiara e innocente allo stesso tempo. Tra i suoi insegnamenti un posto prioritario merita il concetto della salvaguardia della natura, così ci lascia un messaggio ecologico molto attuale che forse in quel suo tempo era realmente precoce, poco compreso. Un contributo alla sua conoscenza è stato realizzato da Margarethe von Trotta, la regista che l’ha ritratta nel 2009 nel film “Vision”. Recentemente si è discusso delle sue opere anche in alcune prestigiose riviste scientifiche, dove si parla degli scritti di medicina basati in parte sul concetto classico che la salute umana dipende da un equilibrio ideale di umori (sangue, catarro, bile nera e bile gialla) e in parte dalle sue osservazioni nel giardino delle erbe del suo monastero e nella relativa infermeria (1). In un’altra pubblicazione si fa notare come Ildegarda affronta il problema dell’epilessia in maniera originale prendendo le distanze dalle credenze dell’epoca (2). Viene inoltre ipotizzato che ella soffrisse di un disturbo dello spettro autistico e viene discusso il ruolo svolto dal monachesimo nell’aiutare a superare questi comportamenti attraverso tutta una serie di antichi documenti che descrivono gli aspetti che il monachesimo condivide con i moderni programmi di trattamento del disturbo dello spettro autistico (3). Se volessimo riassumere in due concetti il pensiero di Ildegarda, dovremmo concentrarci sul fatto che lei auspicava da un lato, l’assunzione costante nel tempo di una dieta sana per nutrire bene il fisico e dall’altro, un positivo approccio alla vita per nutrire, arricchire la componente spirituale della persona. Queste due indicazioni se vissute giornalmente in maniera viva e cosciente possono favorire uno stato di salute prolungato nel tempo, uno stato di equilibrio. Nel dare uno sguardo

d'insieme ai libri e all'attività di Ildegarda, potremmo ipotizzare che questa figura sia stata la antesignana di quella che oggi viene chiamata medicina integrata. Di fatto lei ha utilizzato tutta una serie di trattamenti che coincidono con le attuali fitoterapia, naturopatia, dietologia, il digiuno, la cristalloterapia, la meditazione, le terapie artistiche come musica, canto, danza e la ginnastica.

Inoltre lei elargiva tutta una serie di consigli che possono essere considerati una vera e propria psicoterapia: le sue 35 virtù, opposte ai 35 vizi relativi, rappresentano dei veri strumenti che ci possono far star bene, possono aiutarci a mantenere quell'equilibrio mentale e spirituale per gestire i "veleni" che ci arrivano ogni giorno dalle situazioni più disparate e che hanno sempre a che fare con la vita di relazione, nel lavoro, in famiglia ecc.

Un'altra indicazione costante era quella di seguire un pensiero positivo: questo coincideva con la fede in Dio secondo una visione cattolica medievale, ma che oggi possiamo riscoprire attraverso il pensiero positivo, una forma più laica, diciamo una spiritualità universale che va oltre le religioni. Altri suggerimenti erano il dare libero sfogo al riso, al pianto o vivere il canto o il ballo come attività liberatorie ed educative tipicamente umane. Un consiglio apparentemente banale era quello di masticare bene, concetto questo che ha a che fare con l'educazione al benessere della medicina antroposofica. Ci suggeriva poi di vivere con moderazione, ricercando l'equilibrio nei vari ambiti, sia nell'assumere cibi o bevande ma anche nel sesso, nel sonno, nel movimento, concetti questi sviluppati e approfonditi nei sistemi medici strutturati della tradizione orientale, come la medicina tradizionale cinese e l'ayurveda, e occidentale come la medicina omeopatica e la medicina antroposofica. Le opere di interesse per la medicina furono *Liber vitae meritorum*, *Liber divinatorum operum Physica*, *Cause et cure*, *Ordo virtutum* (4, 5).

Alcune esperienze di Ildegarda sono ancora attuali; ci dice, ad esempio, che in tutta la creazione, negli alberi, piante, animali o pietre preziose, sono nascoste delle virtù segrete curative che nessun uomo può conoscere se non per rivelazione di Dio: questo è un concetto che ribadisce il legame tra l'uomo, la natura e Dio, il rapporto microcosmo e macrocosmo, caro a tante tradizioni mediche e alchemiche del passato. Ci dice poi che il digiuno attiva l'uomo, lo mobilita e lo rigenera, altro concetto che la medicina attuale sta riscoprendo anche in ambito oncologico (6). Nei suoi testi descrive il significato nascosto delle malattie: altro concetto molto attuale, specie in ambito psicologico secondo cui la malattia può essere un'occasione per cambiare degli atteggiamenti di vita errati.

Ildegarda e le sue piante

Il farro, le castagne, il finocchio utilizzate in cucina vengono indicati da Ildegarda come i cibi più completi per una dieta sana. Poi c'è tutta una serie di rimedi di origine vegetale che questa suora ha utilizzato per curare diversi disturbi fisici. Molte delle piante da lei utilizzate sono attualmente oggetto di studi scientifici in vari ambiti, dai laboratori all'impiego clinico. Di seguito vengono messi in evidenza da un lato l'esperienza che Ildegarda ci tramanda con tanto di descrizione, dall'altro lato la conferma delle sue intuizioni attraverso dei recenti studi scientifici, cioè solo alcune pubblicazioni citate come esempio mentre sui vari motori di ricerca se ne potranno trovare un numero veramente elevato. Iniziamo considerando la menta campestre. Lei dice: "È buona se è cotta come spezia con la carne e il pesce, ma anche cruda. È una spezia di rilevato effetto che favorisce l'evacuazione e che si usa in caso di disturbi digestivi per le persone anziane". Lavori scientifici ne confermano l'effetto protettivo contro la secrezione acida e l'ulcera gastrica (7). Un'altra pianta è l'artemisia (*Artemisia vulgaris*). Ildegarda ne descrive le qualità: "Se è cotta e mangiata con la verdura guarisce gli intestini deboli riscalda lo stomaco freddo".

In effetti può migliorare disturbi intestinali e respiratori come coliche addominali, diarrea e asma (8). Nel caso della santoreggia (*Satureja hortensis*): "Se una persona ha il cuore debole e lo

stomaco malato, mangi questa erba cruda e si rinforzerà. Anche chi è triste ridiventa allegro se mangia la santoreggia. Essa guarisce e rende chiari gli occhi dell'uomo". Gli studi scientifici hanno poi confermato l'attività antispastica e antidiarroica della santoreggia (9). Dell'issopo (*Hyssopus officinalis*): "Chi ha la tosse e soffre di fegato ed ha l'affanno a causa dei polmoni malati, mangi dell'issopo con la carne o arrostito nella salsa e si sentirà meglio. Se il fegato di un essere umano si ammala di tristezza, si deve cuocere un pollo con l'issopo prima che la malattia abbia il sopravvento e si deve mangiarne spesso".

In effetti questa pianta presenta attività antiasmatica (10). L'*Achillea millefolium* è descritta molto bene da Ildegarda: "Colui che viene ferito all'interno del suo corpo, sia con il bisturi che con una ferita interna, prenda l'achillea polverizzata e la beva nell'acqua calda. Quando starà meglio, beva questa polvere nel vino caldo, fino a che sarà guarito".

Le numerose proprietà di questa pianta: antiepatotossica, astringente, coadiuvante nel trattamento di emorroidi, mal di testa, disturbi emorragici, lividi, tosse, influenza, polmonite, calcoli renali, ipertensione, disturbi mestruali, febbre, artrite reumatoide, gotta, artrosi, disturbi emorragici, varicella, cistite, diabete mellito, indigestione, dispepsia, eczema, psoriasi e foruncoli (11). Dell'ortica (*Urtica dioica*) Ildegarda ne descrive l'utilità della polvere e dice: "La polvere di ortica purifica lo stomaco".

Sono numerose le ricerche relative all'ortica e, in particolare, ne è stata messa in evidenza l'attività antitumorale *in vitro* su cellule tumorali dello stomaco e del colon-retto, attività che non presenta alcun effetto tossico significativo sulle cellule normali (12).

Mente e corpo da equilibrare

Oggi in medicina integrata si descrivono gli approcci mente-corpo: la musica ascoltata o suonata è considerata a pieno titolo una terapia. Ildegarda ci ha lasciato degli spartiti musicali e sono in commercio la sua musica, i suoi canti. Attualmente la musico-terapia è largamente utilizzata in ambito psichiatrico, per problematiche di bambini o ragazzi autistici, nelle cure palliative. Ascoltare musica può essere utile per migliorare la pressione sistolica e dovrebbe essere considerata un componente della cura dei pazienti ipertesi (13).

C'è poi tutta una serie di lavori scientifici che riguardano le terapie artistiche: l'arte che cura, nel senso che una persona può utilizzare forme d'arte come la pittura, la scultura creando dei prodotti artistici o semplicemente può avvalersi della visione di opere d'arte, commentarle, possibilmente con dei professionisti e cercare di elaborare quelli che sono i singoli concetti che vengono fuori da un'opera d'arte (14). Ecco che, come è stato descritto recentemente dalla TV americana CNN, i medici canadesi prescrivono regolarmente le visite al museo come approccio integrato a tante problematiche, come integrazione per la gestione dello stress, forse la "malattia" più diffusa in occidente e che è poi il punto di partenza di tutta una serie di patologie croniche. Meditazione, mindfulness, e perdono sono altri approcci mente-corpo che fanno stare bene, combattono lo stress psico-sociale.

La meditazione, che Ildegarda invitava a fare nel suo monastero assieme alle preghiere, è molto utile per il rilassamento e oggi attraverso numerosi studi scientifici sappiamo che determina delle vere modificazioni anatomico funzionali in sede cerebrale, in particolare nella corteccia, nell'area pre-frontale, nel giro cingolato, poi a livello della sostanza bianca, sul sistema limbico, sul sistema nervoso autonomo.

Sono state poi riscontrate variazioni in termini di riequilibrio del valore di alcuni neurotrasmettitori, citochine, ormoni, endorfine ecc. (15, 16). L'attività del perdono può rivelarsi un utile strumento per la riduzione della pressione sanguigna, della frequenza cardiaca, dello

stress, del dolore cronico, degli atteggiamenti ostili, dei sintomi di depressione e di ansia, del rischio di abuso di alcol o sostanze e per una migliore capacità di gestione della rabbia (17).

Medicina preventiva ai tempi di Ildegarda

Ildegarda parlava di 35 virtù che possono contrastare 35 vizi. Ovviamente bisogna considerare i termini usati in quel periodo medievale e oggi forse dovremmo considerare altri termini, ma rivedendo in rassegna tale elenco è importante cogliere il messaggio al di là della descrizione sistematica, cioè riflettere sul fatto che alcuni atteggiamenti personali interiori o relativi alla socialità, possono indurre allo stato di benessere; da qui i suoi consigli e l'invito a vivere una vita equilibrata, sana, basata sulla moralità (Tabella 1).

Tabella 1. I vizi e le virtù secondo Ildegarda

VIZIO	VIRTÙ
<i>Amor saeculi</i> - amore profano	<i>Amor caelestis</i> - amore celeste
<i>Petulantia</i> - esuberanza	<i>Disciplina</i> - buoni costumi
<i>Joculatrix</i> - gusto dei piaceri	<i>Verecundia</i> - pudore
<i>Obduratio</i> - durezza di cuore	<i>Misericordia</i> - misericordia
<i>Ignavia</i> - pigrizia	<i>Divina Victoria</i> - vittoria divina
<i>Ira</i> - collera	<i>Patientia</i> - pazienza
<i>Inepta laetitia</i> - malignità	<i>Gemitus ad Deum</i> - desiderio ardente di Dio
<i>Ingluvies ventri</i> - gozzoviglia	<i>Abstinentia</i> - astinenza
<i>Acerbitas</i> - grettezza di cuore	<i>Vera largitas</i> - generosità
<i>Impietas</i> - empietà	<i>Pietas</i> - pietà, devozione
<i>Fallacitas</i> - slealtà	<i>Veritas</i> - verità, lealtà
<i>Contentio</i> - spirito di scontentezza	<i>Pax</i> - pace
<i>Infelicitas</i> - ipocondria	<i>Beatitudo</i> - beatitudine, fiducia in salvezza
<i>Immoderatio</i> - smoderatezza	<i>Discretio</i> - discrezione, moderatezza
<i>Perditio animarum</i> - ateismo	<i>Salvatio animarum</i> - salvezza anime
<i>Superbia</i> - superbia	<i>Humilitas</i> - umiltà
<i>Invidia</i> - invidia	<i>Charitas</i> - amore del prossimo
<i>Inanis gloria</i> - desiderio di gloria	<i>Timor Domini</i> - timore di Dio
<i>Inobedientia</i> - disubbidienza	<i>Obedientia</i> - ubbidienza
<i>Infidelitas</i> - mancanza di fede religiosa	<i>Fides</i> - fede
<i>Desperatio</i> - disperazione	<i>Spes</i> - speranza
<i>Luxuria</i> - lussuria	<i>Castitas</i> - castità
<i>Injustitia</i> - ingiustizia	<i>Justitia</i> - giustizia
<i>Torpor</i> - torpore, stupidità	<i>Fortitudo</i> - forza
<i>Oblivio</i> - dimenticanza di Dio	<i>Sanctitas</i> - santità
<i>Incostantia</i> - incostanza	<i>Costantia</i> - costanza
<i>Cura terrenorum</i> - materialismo	<i>Caeleste desiderium</i> - desiderio di cose celesti
<i>Obstinatio</i> - durezza di cuore	<i>Compunctio cordis</i> - contrizione
<i>Cupiditas</i> - cupidigia	<i>Contemptus mundi</i> - rifiuto del mondano
<i>Discordia</i> - discordia	<i>Concordia</i> - concordia
<i>Scurrilitas</i> - scurrilità	<i>Reverentia</i> - rispetto
<i>Vagatio</i> - vagabondaggio	<i>Stabilitas</i> - stabilità, costanza
<i>Maleficium</i> - maleficio, magia	<i>Verus cultus Dei</i> - vero culto di Dio
<i>Avaritia</i> - avarizia	<i>Sufficientia</i> - sobrietà
<i>Tristitia saeculi</i> - tristezza mondana	<i>Coeleste gaudium</i> - gaudio celeste

Il pensiero di Ildegarda è presente in ambito antroposofico dove vengono ripresi alcuni concetti delle tradizioni orientali presenti nei Veda dell'antica India, nella tradizione dell'antica Cina e del Buddhismo Tibetano. Vivere la quotidianità con un costante atteggiamento irascibile o con emozioni che non sappiamo gestire, le emozioni negative, può essere l'innescò di tutta una serie di azioni non coscienti che portano a un'iperattività del sistema nervoso autonomo con aumento dell'attività del simpatico. Ciò determina un aumento del cortisolo e delle amine adrenergiche che ci conduce a uno stress cronico, una situazione non più fisiologica che è alla base delle numerose patologie croniche tipiche dei Paesi occidentali (malattie cardiovascolari, dismetaboliche, cancro, ecc.). Ildegarda considera la verità in opposizione alla menzogna come elemento riequilibrante: non a caso questo è un problema sociale attuale, con le cosiddette *fake news* che in qualche modo inquinano le conoscenze, i rapporti umani, i rapporti sociali. Quindi la menzogna a lungo andare può essere considerata un veleno sottile di cui ci nutriamo e che nel tempo non fa altro che intossicarci; l'opposto, il rimedio è la verità. Ne parlava anche Rudolf Steiner, padre dell'antroposofia: la menzogna è un elemento realmente causa di malattia, di squilibrio, creatrice di rapporti sociali distorti che portano a squilibri che coinvolgono il benessere personale e la salute.

Percorsi per il benessere e la salute

Se facciamo una riflessione su cosa sia lo stato di salute, dovremmo considerare il fatto che ciascuno di noi ha un proprio percorso e vive costantemente le passioni, le emozioni, gli eventi della vita di ogni giorno. Ognuno ha delle predisposizioni familiari e una particolare costituzione psicofisica e quindi un temperamento personale e singolarmente viviamo in maniera unica.

Per esempio, una persona reagisce meglio a un evento stressante magari ridendoci su o lasciando andare il problema e quindi non si fissa troppo sull'evento che rimane acuto e non viene in qualche modo attivato nel tempo, evitando così lo stress cronico.

Qualcun altro invece non riesce a staccarsi dall'evento stressante che viene vissuto in maniera persistente nel tempo. È importante ricordare come ciascuno di noi reagisce secondo la propria forza interiore. Poi ovviamente possono accadere degli eventi biologici (malattie infettive) e fisici (incidenti traumatici) che mettono a repentaglio dall'esterno il nostro stato di salute. In generale noi possiamo lavorare sul nostro equilibrio interiore, sulle nostre emozioni e rafforzare i vari distretti del nostro organismo. La scienza della Psiconeuroendocrinoimmunologia ce lo conferma (18). Certe problematiche, certi ostacoli e quindi gli eventi stressanti, possono essere considerati come una richiesta di cambiamento della nostra vita, quindi è molto importante realizzare che la nostra capacità di cambiare può farci stare meglio. Eric Rolf dice che "la vita è cambiamento e la resistenza al cambiamento ci dà il blocco" (19).

Conclusione

I messaggi di Ildegarda sono universali e sempre più validi; parlando del pensiero positivo lei ci suggerisce di mettere l'amore sempre e ovunque nelle nostre attività, nelle piccole azioni di ogni giorno, anche le più insignificanti. Questo ha molto a che fare con certe filosofie orientali: fare bene il proprio lavoro, dal più umile al più elevato. Le buone intenzioni, la correttezza dell'azione come della parola e del pensiero sono la cosa più importante e a lungo andare vedremo che è qualcosa di terapeutico. Lavorare sulla nostra fallace personalità, un altro punto ildegardiano: lei ci suggerisce che siamo venuti al mondo per imparare qualcosa, per migliorarci

e ciascuno di noi ha un piccolo pezzo di terra da coltivare al meglio: in fondo questo è il compito di ciascuno. La natura ci aiuta, ci assiste ed è per questo che dobbiamo vivere con essa in armonia e ricevere il suo aiuto nel momento del bisogno.

Bibliografia

1. Cole TB. Liber Divinorum Operum (Book of Divine Works): Hildegard von Bingen. *JAMA* 2015;314(22):2336-7.
2. Brigo F, Trinka E, Brigo B, Bragazzi NL, Ragnedda G, Nardone R, Martini M. Epilepsy in Hildegard of Bingen's writings: A comprehensive overview. *Epilepsy Behav* 2018;80:135-43.
3. Ranft P. Ruminations on Hildegard of Bingen (1098-1179) and autism. *J Med Biogr* 2014;22(2):107-15.
4. Hertzka G, Strehlow W. *Manuale della medicina di Santa Ildegarda*. Bolzano: Athesia; 1992.
5. Compendio di alcune opere di Ildegarda. Disponibile all'indirizzo [https://www.documentacatholicaomnia.eu/30_10_1098-1179-_Hildegardis_\(Hildegard_von_Bingen\).html](https://www.documentacatholicaomnia.eu/30_10_1098-1179-_Hildegardis_(Hildegard_von_Bingen).html); ultima consultazione 27/05/2021.
6. Patterson RE, Sears DD. Metabolic effects of intermittent fasting. *Annu Rev Nutr* 2017;37:371-93.
7. Londonkar RL, Poddar PV. Studies on activity of various extracts of *Mentha arvensis* Linn against drug induced gastric ulcer in mammals. *World J Gastrointest Oncol* 2009;1(1):82-8.
8. Khan AU, Gilani AH Antispasmodic and bronchodilator activities of *Artemisia vulgaris* are mediated through dual blockade of muscarinic receptors and calcium influx. *J Ethnopharmacol* 2009;126(3):480-6.
9. Hajhashemi V, Sadraei H, Ghannadi AR, Mohseni M. Antispasmodic and anti-diarrhoeal effect of *Satureja hortensis* L. essential oil. *J Ethnopharmacol* 2000;71(1-2):187-92.
10. Ma X, Ma X, Ma Z, Wang J, Sun Z, Yu W, Li F, Ding J. Effect of *Hyssopus officinalis* L. on inhibiting airway inflammation and immune regulation in a chronic asthmatic mouse model. *Exp Ther Med* 2014;8(5):1371-1374.
11. Akram M. Minireview on *Achillea millefolium* Linn. *J Membr Biol* 2013;246(9):661-3.
12. Ghasemi S, Moradzadeh M, Mousavi SH, Sadeghnia HR. Cytotoxic effects of *Urtica dioica* radix on human colon (HT29) and gastric (MKN45) cancer cells mediated through oxidative and apoptotic mechanisms. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand, France)* 2016;62(9):90-6.
13. do Amaral MA, Neto MG, de Queiroz JG, Martins-Filho PR, Saquetto MB, Oliveira Carvalho V. Effect of music therapy on blood pressure of individuals with hypertension: A systematic review and Meta-analysis. *Int J Cardiol* 2016;214:461-4.
14. Lee J, Choi MY, Kim YB, Sun J, Park EJ, Kim JH, Kang M, Koom WS4. Art therapy based on appreciation of famous paintings and its effect on distress among cancer patients. *Qual Life Res* 2017;26(3):707-15.
15. Jindal V, Gupta S, Das R. Molecular mechanisms of meditation. *Mol Neurobiol* 2013;48(3):808-11.
16. Guillaumie L, Boiral O, Champagne J. A mixed-methods systematic review of the effects of mindfulness on nurses. *J Adv Nurs* 2017;73(5):1017-1034.
17. Friedberg JP, Suchday S, Shelov DV. The impact of forgiveness on cardiovascular reactivity and recovery. *Int J Psychophysiol* 2007 Aug;65(2):87-94.
18. Pregnotato M, Damiani G, Pereira A Jr. Patterns of calcium signaling: A link between chronic emotions and cancer. *J Integr Neurosci* 2017;16(s1):S43-S63.
19. Rolf E. *Iniziazione alla medicina dell'anima*. Roma: Edizioni Mediterranee; 2002.

*Serie Rapporti ISTISAN
numero di febbraio 2022*

*Stampato in proprio
Servizio Comunicazione Scientifica – Istituto Superiore di Sanità*

Roma, marzo 2022