

**DOTTORATO DI RICERCA INTERNAZIONALE IN SCIENZE
MICROBIOLOGICHE E BIOCHIMICHE**

Ciclo XXVI

**Dipartimento di Scienze Bio-Mediche – Sezione Microbiologia
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA**

Dott. ANDREA AMODEO

**Attività antimicrobica e antitumorale di estratti dei
ramoscelli di *Celtis aetnensis* (Tornab.) Strobl.**

TESI DI DOTTORATO

Coordinatore:
Prof. Adriana Garozzo

Tutor:
Prof. Liliana Iauk

TRIENNIO 2011 □ 2013

INDICE

| | |
|--|----------|
| Introduzione | Pag. 1 |
| Il metabolismo vegetale | Pag. 7 |
| Oli essenziali | Pag. 12 |
| Estrazioni dei principi attivi da matrici vegetali | Pag. 19 |
| Tecniche di estrazione | Pag. 22 |
| Estrazione con solventi | Pag. 23 |
| Ulmaceae | Pag. 26 |
| <i>Celtis australis</i> | Pag. 28 |
| <i>Celtis aetnensis</i> Tornab. Strombl | Pag. 31 |
| <i>Celtis africana</i> | Pag. 34 |
| <i>Celtis asperrima</i> | Pag. 36 |
| <i>Celtis caucasica</i> | Pag. 38 |
| <i>Celtis integrifolia</i> | Pag. 39 |
| <i>Celtis philippinensis</i> | Pag. 40 |
| <i>Celtis sinensis</i> | Pag. 41 |
| <i>Celtis spinosa</i> Spreng | Pag. 43 |
| Utilizzi biologici del genere <i>Celtis</i> | Pag. 45 |
| Antiossidanti | Pag. 47 |
| Saggio DPPH | Pag. 49 |
| Radicali liberi | Pag. 51 |
| Sistemi di difesa | Pag. 55 |
| Glutazione | Pag. 55 |
| Eme ossigenasi | Pag. 60 |
| Meccanismo di reazione | Pag. 63 |
| Caspasi | Pag. 66 |
| Scopo della tesi | Pag. 70 |
| Materiali e Metodi | Pag. 74 |
| Preparazione dell'estratto | Pag. 74 |
| Attività antimicrobica | Pag. 75 |
| Microrganismi in esame | Pag. 77 |
| Attività antitumorale | Pag. 79 |
| Risultati | Pag. 85 |
| Conclusioni | Pag. 102 |
| Bibliografia | Pag. 107 |

Riassunto

Il genere *Celtis* (Ulmaceae) comprende circa 70 specie di alberi o arbusti diffusi principalmente nelle regioni temperate e tropicali dell'Emisfero Nord. Nell'Italia peninsulare il genere *Celtis* è rappresentato esclusivamente da *Celtis australis* L.; in Sicilia è, invece, presente un'altra specie, *Celtis aetnensis*, molto affine a *Celtis tournefortii* Lam., specie diffusa nell'area del Mediterraneo orientale. *Celtis aetnensis* (Tornab.) Strobl (Bagolaro dell'Etna), arbusto endemico del Monte Etna (Sicilia), alto 3-5 m, cresce tra i 500 ed i 900 metri s.l.m.. E' una pianta legnosa, le cui foglie sono cuoriformi e debolmente crenate sul bordo. Alcune specie di *Celtis* sono impiegate in medicina tradizionale per la cura di lombalgie, disturbi gastrici, dolori addominali, nonché per la loro azione astringente e lenitiva in caso di diarrea, enterite ed infiammazione del cavo orale. Tali proprietà sono principalmente attribuibili a principi attivi contenuti nelle foglie, quali tannini, saponine e flavonoidi, ma, recentemente, alcuni studi fitochimici hanno mostrato che i ramoscelli delle specie di *Celtis* contengono betulina, acido gallico, acido 3,3'-di-O-metil-ellagico, acido ursolico, alcaloidi e triterpeni, sostanze che posseggono attività antiossidante e anti-tumorale [1-2]. Oggi c'è un grande interesse sugli effetti protettivi che gli antiossidanti naturali contenuti nelle piante possono esercitare nei riguardi del danno ossidativo causato dai radicali liberi dell'ossigeno (ROS). Lo stress ossidativo è coinvolto in diverse patologie degenerative, quali il cancro, e studi epidemiologici hanno evidenziato una diretta correlazione tra gli antiossidanti naturali e la bassa incidenza di neoplasie. Per questo motivo, ci è sembrato interessante valutare l'effetto di un estratto cloroformico ottenuto da ramoscelli di *C. aetnensis* in colture di cellule di carcinoma umano di colon (Caco 2). Inoltre abbiamo valutato l'attività antimicrobica di *C. aetnensis*.

Per valutare l'attività antitumorale, l'estratto è stato preparato mettendo a macerare i ramoscelli di *Celtis* per 48 h, evaporando la soluzione estrattiva in rotavapor, e riprendendo il residuo secco con MeOH 60%. Dopo aver trattato tale soluzione con esano, la porzione metanolica è stata estratta con cloroformio in imbuto separatore, e la fase cloroformica è stata portata a secco. In questo studio, le colture di Caco 2 sono state trattate per 72 h in assenza ed in presenza di differenti concentrazioni di estratto cloroformico di ramoscelli di *C. aetnensis*. E' stata valutata la vitalità cellulare, il rilascio di lattico deidrogenasi (LDH), i livelli di glutatione (GSH) e di ROS. Inoltre, al fine di individuare i meccanismi coinvolti nell'attività dell'estratto, abbiamo analizzato l'espressione di proteine implicate nella crescita cellulare e nell'apoptosi. I nostri dati hanno mostrato che l'estratto di *C. aetnensis* riduce la proliferazione cellulare, provoca una deplezione dose-dipendente di

GSH con un incremento dei livelli intracellulari di ROS e modifica l'espressione di proteine, quali HO-1 e caspasi. Inoltre, anche la vitalità cellulare risente in maniera significativa della presenza dell'estratto. I risultati ottenuti nella presente ricerca indicano un significativo effetto di *C. aetnensis* sulle cellule Caco 2, suggerendo quindi un possibile impiego coadiuvante nella terapia classica antineoplastica.

Per l'analisi microbiologica dell'estratto di *C. aetnensis*, sono stati preparati un decotto e due estratti alcolici, utilizzando foglie previamente essiccate all'aria e polverizzate. Il decotto è stato preparato facendo bollire 10g di foglie in 100 ml di acqua demonizzata per 10 minuti. Il prodotto è stato filtrato con carta da filtro e portato a pH 5,7 con HCl. Il decotto è stato, quindi, liofilizzato per garantire le condizioni ottimali di conservazione. Sono stati inoltre preparati un estratto etanologico ed uno n-butanolico: 10 g di foglie sono state estratte, rispettivamente, con i due alcoli (3x100 ml) per 24h; i due estratti sono stati, quindi, filtrati e portati a secco in evaporatore rotante. Prima del saggio di sensibilità degli estratti ottenuti, sono stati disciolti in DMSO. Per il saggio, sono stati utilizzati 9 ceppi standard: *E. coli* ATCC 25212, *E. coli* ATCC 35218, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. pneumoniae* ATCC 49619, *C. albicans* ATCC 90028, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019. L'estratto n-butanolico ha mostrato un'attività antimicrobica migliore rispetto agli altri due (EtOH e H₂O), in quanto è risultato attivo sia sui ceppi batterici Gram-positivi e Gram-negativi che sui miceti. L'estratto etanologico ha mostrato, invece, maggiore attività nei confronti di *E. coli* (MIC 5120 μ g/ml), *C. krusei* (MIC 2560 μ g/ml) e *C. parapsilosis* (MIC 2560 μ g/ml). Il decotto, infine, ha mostrato maggiore attività su *S. pneumoniae* (MIC 5120 μ g/ml), *E. faecalis* (MIC 5120 μ g/ml) e sui miceti testati (MIC 1280 μ g/ml). Inoltre, l'estratto n-butanolico potrebbe essere utilizzato in formulazioni per uso topico, in quanto ha mostrato una significativa attività antimicrobica ed antifungina.

Abstract

Celtis aetnensis Strobl is a bushy shrub present on Mount Etna (Sicily). The genus *Celtis* (Ulmaceae) includes about 70 species of shrubs or trees, primarily distributed in temperate and tropical regions. In previous reports on species of this genus, the presence of some antitumor triterpenes was shown, in particular in twigs. Today there is an increasing interest in the protective effects *in vivo* of natural compounds contained in plants against oxidative damages involved in several human diseases such as cancer.

In this study we investigated the effects of *Celtis aetnensis* twig extract on the viability of Caco2 cell line. In addition, we evaluated the antimicrobial activity of *C. aetnensis*.

In order to elucidate mechanisms of action of this extract, LDH release, GSH content and ROS levels were also evaluated. Our results evidenced the ability of this extract to significantly reduce cell viability. Data obtained, regarding LDH release, ROS and GSH levels suggested the involvement of oxidative stress in the reported effect. Thus, our study suggests that *Celtis aetnensis* may have a potential impact on cancer therapy and on human health.

For microbiological analysis of the extract of *C. aetnensis* were prepared a decoction and two alcoholic extracts (ethanol and n-butano). For the test, 9 standard strains were used: *E. coli* ATCC 25212, *E. coli* ATCC 35218, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. pneumoniae* ATCC 49619, *C. albicans* ATCC 90028, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019. The n-butanol extract showed better antimicrobial activity than the other two (EtOH and H₂O), as it is found to be active on both bacterial strains Gram-positive and Gram-negative bacteria that on fungi. Moreover, the extract n-butanol could be used in formulations for topical use, as showed significant antimicrobial activity and antifungal.

Introduzione

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), le piante medicinali sarebbero la fonte migliore per ottenere una varietà di droghe. Circa l'80% della popolazione dei paesi sviluppati utilizzano farmaci tradizionali derivati dalle piante, che hanno composti derivati da piante medicinali. Pertanto, le droghe derivanti, devono essere esaminate per capire meglio le loro proprietà, la sicurezza e l'efficienza.

La continua evoluzione della resistenza batterica agli antibiotici attualmente disponibili ha reso necessaria la ricerca di nuovi ed efficaci composti antimicrobici.

A livello globale, gli estratti vegetali sono impiegati per le loro attività antibatteriche, antimicotiche e antivirali. E' noto che più di 400.000 specie di piante tropicali hanno proprietà medicinali e questo ha reso più economica rispetto alla medicina tradizionale moderna. Le fonti vegetali hanno reso possibile l'utilizzo come agenti anti-infettivi, che hanno un ottimo rapporto costo-efficacia e hanno meno effetti collaterali. Lo sviluppo di resistenza batterica agli antibiotici e la popolarità crescente della

medicina tradizionale ha portato i ricercatori a studiare i composti antibatterici nelle piante.

Le proprietà terapeutiche di molte piante sono tradizionalmente note agli uomini fin dall'antichità, utilizzandole come "erbe curative". L'impiego primitivo delle piante per gli scopi medicinali avveniva sulla base di esperienze empiriche maturate utilizzando direttamente la pianta stessa, fresca o sotto forma di droga (essiccata), oppure sottoposta a procedimenti di estrazione molto semplici, di origine domestica, quali gli infusi e i decotti con acqua o i macerati con alcool o liquidi alcolici (tinture). La diversità chimica che caratterizza le piante rende l'esplorazione delle loro proprietà biologiche non solo una delle principali fonti di nuovi composti potenzialmente utilizzabili per la realizzazione di nuovi farmaci, ma anche uno strumento utile per la scoperta di nuovi meccanismi d'azione. Esse, infatti, sono state e sono oggetto di continuo studio per la ricerca di nuove sostanze; attraverso screening fitochimico e biologico, e quindi tramite criteri scientifici oggettivi, si è cercato e si cerca di ottenere risultati concreti e sicuri.

Anche in Italia l'impiego delle erbe, utilizzate nella cura delle malattie, ha tradizioni antichissime e raggiunge il suo maggior interesse tra il XVI e XVIII secolo, periodo in cui si ha la testimonianza, tramite importanti esperienze e scoperte, di una approfondita cultura botanica.

A partire dalla prima metà dell'ottocento, invece, i progressi della chimica hanno consentito di ottenere per sintesi i singoli composti chimici e la farmacologia ha permesso di saggiare la loro attività biologica specifica, favorendo l'uso dei prodotti sintetici purificati e riducendo l'impiego delle piante e dei loro derivati. I continui miglioramenti in merito alle caratteristiche farmacologiche, farmacocinetiche e tossicologiche delle strutture molecolari hanno consentito la realizzazione di farmaci molto potenti in sostituzione delle primitive medicine vegetali⁽¹⁾.

L'attività terapeutica delle piante dipende dai suoi costituenti chimici, e tali costituenti anche se con struttura chimica molto simile tra loro possono conferire alle piante diversa attività farmacologica.

Da un punto di vista farmacologico i prodotti a base di piante medicinali e loro derivati si potrebbero inquadrare in tre gruppi. Il primo gruppo risulta essere costituito da farmaci di origine vegetale; essi hanno un'efficacia dimostrata, si conoscono i loro principi attivi, vengono utilizzati a precisi dosaggi, stabiliti in base alle caratteristiche farmacodinamiche e farmacocinetiche dei principi attivi stessi. Nel secondo gruppo possono essere inseriti i fitoterapici, dove la loro efficacia è, in qualche modo, dimostrata clinicamente anche se mediante trials non sempre rigorosi; si possono individuare in essi componenti dotati di attività farmacologica (marker farmacologici) sulla base dei quali i preparati vengono standardizzati. Per questi prodotti è più difficile stabilire un dosaggio ottimale che si potrebbe desumere dagli studi clinici in cui è stata dimostrata un'efficacia. Ovviamente preparati diversi possono avere una composizione e quindi un'attività diversa, per cui è opportuno utilizzare preparati standardizzati. Infine, il terzo gruppo è costituito da droghe vegetali e loro preparati di impiego tradizionale: la loro efficacia clinica non è stata ancora

riconosciuta e non sempre è possibile individuare in essi principi farmacologicamente attivi; tuttavia la loro lunga tradizione d'impiego suggerisce che possono avere degli effetti benefici ed essere abbastanza sicuri, almeno nell'ambito di un corretto impiego. Essi possono quindi essere utili in disturbi di lieve entità. L'impiego di queste droghe dovrebbe rispecchiare fedelmente l'uso tradizionale per quanto riguarda l'indicazione, il tipo di preparato, la concentrazione specifica, la posologia e la via di somministrazione, in linea con quanto previsto dalla recente Direttiva Comunitaria ⁽²⁾.

È chiaro che, man mano che si proseguono le indagini e aumentano le evidenze scientifiche sull'efficacia di una determinata droga, la stessa può passare dal terzo gruppo al secondo o al primo ed è auspicabile che questo avvenga il più frequentemente possibile. Ciononostante, i prodotti appartenenti al II e III gruppo, che risultano essere altamente diffusi in commercio, sono generalmente identificati, spesso in maniera del tutto intercambiabile, come "prodotti erboristici", "fitoterapici" o più genericamente "prodotti a base di erbe officinali".

A livello dell'opinione pubblica e, talvolta, anche tra gli operatori del settore, è diffusa la convinzione che le erbe medicinali siano sostanzialmente innocue, e, pertanto, sono abitualmente utilizzate come forma di automedicazione. È ben documentato, invece, che tali preparati possono danneggiare la salute umana o risultare, a volte, perfino letali poiché possono determinare nell'organismo una serie di reazioni avverse o di effetti collaterali in relazioni ai costituenti chimici. ⁽³⁾

Il metabolismo vegetale

Tutti gli organismi vegetali, anche se tra loro diversi per forma, organizzazione ed adattabilità all'ambiente, per i differenti processi biochimici legati al proprio metabolismo, utilizzano un numero piuttosto limitato di sostanze.

A. Kossel (1891) distinse il processo metabolico in primario e secondario:

1. Il metabolismo primario, o di base, comprende tutte le vie necessarie per la sopravvivenza delle cellule.
2. I prodotti del metabolismo secondario sono sostanze spesso presenti solo in alcuni tipi di cellule specializzate e differenziate e non sono necessarie per le cellule stesse, ma sono utili alla pianta nel suo insieme. ⁽⁴⁾

Da tale definizione si può, quindi, affermare che a partire dalla fotosintesi clorofilliana, tutti i processi, di biosintesi di composti e della loro successiva degradazione, legati alla vita cellulare costituiscono il metabolismo primario.

In realtà tutte le piante sintetizzano una varietà di composti maggiore di quella necessaria al solo metabolismo primario. Si può, quindi, pensare al

metabolismo secondario come alla biosintesi di tali composti che avviene attraverso vie metaboliche utilizzando prodotti intermedi del metabolismo primario che si accumulano nelle cellule vegetali per differenti cause.

Il metabolismo secondario può variare da specie a specie vegetale ed è condizionato da fattori ecologici (relativi all'ambiente) e genetici (relativi al vegetale) e può dar luogo a differenti metaboliti secondari che si formano prevalentemente durante il periodo di accrescimento del vegetale, cioè quando le trasformazioni metaboliche raggiungono la massima attività.

Le sostanze di interesse (principi attivi) contenute nei vegetali possono appartenere sia ai metaboliti primari (proteine, lipidi, polisaccaridi), che ai metaboliti intermedi come acidi organici.

I composti secondari delle piante sono generalmente classificati, in accordo con la loro via biosintetica, in tre grandi famiglie molecolari: fenoli, terpeni e steroidi (detti terpenoidi) e alcaloidi.⁽⁵⁾

Il gruppo dei fenoli comprende i fenoli semplici, come acidi benzoici, acidi cinnamici, stilbeni e cumarine e i fenoli complessi, come flavanoidi, antociani e tannini. La biosintesi dei composti fenolici semplici deriva dalla via dell'acido scichimico, che determina la produzione di amminoacidi aromatici (fenilalanina e tiroxina) i quali vengono deaminati rispettivamente dagli enzimi fenilalanina ammonio liasi (PAL) e tirosina ammonio liasi (TAL), producendo acido trans- cinnamico e acido p-idrossicinnamico, che sono le unità di base dei fenoli.

I composti fenolici complessi hanno origine dal calcone che, per azione dell'enzima calcone isomerasi (CHI) produce la naringenina, un flavanone. Da essa poi derivano i flavonoli e gli isoflavonoli, che in seguito a sostituzione e desaturazione forniscono isoflavoni, isoflavonoli e isoflavanoli.

I terpeni, detti anche isoprenoidi, sono costituiti dall'isoprene come unità base. L' isopropene è una molecola costituita da 5 atomi di carbonio: quattro disposti linearmente, che presentano due doppi legami in posizione 1-3 e il quinto che forma una ramificazione in

posizione 2 sotto forma di gruppo metilico. A seconda del numero di ripetizioni isopreniche, si distinguono le classi mono, di, tri, tetra, sesqui e politerpeni. Sono molte le funzioni dei terpeni nelle piante: i monoterpeni (C10) e i sesquiterpeni (C15), sono i principali costituenti degli oli essenziali; tra i diterpeni (C20) si distinguono le giberelline, ormoni stimolatori di crescita; i triterpeni (C30) comprendono molti composti che fungono da deterrenti nei confronti degli erbivori. La biosintesi avviene a partire dall'isopentenil pirofosfato (IPP) che condensa con il suo isomero dimetilallil pirofosfato per dare geranyl pirofosfato, dal quale originano i monoterpeni. Altri precursori sono l'acido mevalonico e la gliceraldeide fosfato\piruvato. Mediante successive condensazioni con l'IPP, si giunge alla formazione delle diverse classi terpeniche. I triterpeni derivano dalla condensazione di due molecole di farnesil pirofosfato e i tetra terpeni dalla condensazione di due molecole di geranyl-geranyl pirofosfato. I vari intermedi subiscono modificazioni successive che portano anche a ciclizzazioni.

Gli alcaloidi sono sostanze azotate in cui almeno uno degli atomi di azoto presenti deriva da un amminoacido e fa parte di un anello eterociclico o di un extraciclo ⁽⁶⁾. Sono classificati, in base alla loro origine biochimica e dal punto di vista biosintetico in:

- alcaloidi derivanti da amminoacidi: tirosina, fenilalanina, ornitina, lisina, istidina, triptofano, arginina ecc.;
- alcaloidi derivati da un composto purinico;
- terpeni amminati o pseudo alcaloidi;
- alcaloidi polichetici.

Oli essenziali

Le piante aromatiche hanno tessuti specializzati nella secrezione di metaboliti secondari e situati in parti diverse: radici, rizomi, foglie, fiori. I prodotti di secrezione hanno natura chimica diversa tra loro: cristalli di ossalato di calcio, resine, gomme, mucillagini, terpeni, tannini, latici, pigmenti, oli essenziali.⁽⁷⁾

Questi ultimi sono i secreti più diffusi ed abbondanti, sono formati da miscele di molecole organiche volatili (cioè che evaporano o sublimano facilmente a temperatura ambiente), solubili nei solventi organici ed insolubili in acqua, aventi sapore pungente ed odore caratteristico della pianta che li compone.

In base ai gruppi funzionali, i costituenti di un'essenza possono essere raggruppati in quattro categorie principali:

- idrocarburi non ramificati;
- derivati del benzene;
- terpeni aciclici e ciclici;
- composti vari: ossigenati (aldeidi, chetoni, alcoli, esteri ed acidi), solforati od azotati.

I componenti di un olio essenziale possono poi subire trasformazioni chimiche nel corso dello sviluppo della pianta. Ad esempio, si è constatato che nei primi stadi di vegetazione la pianta presenta, nelle sue parti verdi, un'essenza contenente molti composti a funzione alcolica; durante il periodo di formazione e sviluppo delle infiorescenze, gli acidi liberi che si trovano nella pianta reagiscono con gli alcoli formando gli esteri, la cui concentrazione aumenta col progredire della fioritura, mentre diminuisce, perché sono rimessi in libertà gli alcoli, quando i fiori appassiscono.

Inoltre, molte sostanze odorose sono presenti nella struttura vegetale sotto forma di glucosidi; successivamente, per scissione di questi, tali sostanze possono entrare in circolo ed essere trasferite nei vari distretti dell'organismo vegetale. Le sostanze odorose compaiono generalmente nelle parti verdi della pianta sin dai primi mesi di vita; poi continuano a formarsi e ad accumularsi fino al principio della fioritura; con il progredire della fioritura, rallenta il loro processo di formazione. Esse, quindi, sono soggette ai fenomeni di

diffusione ed osmosi, per cui passano dalle foglie agli steli e di qui alle infiorescenze.

Per un completo studio della formazione ed evoluzione degli oli essenziali nelle piante vanno presi in considerazione alcuni aspetti come: l'effetto della crescita, il momento stagionale, l'influsso climatico. Ad esempio, le piante che crescono in alta montagna, dove le funzioni clorofilliane sono più attive per effetto della maggiore luce, danno oli essenziali più ricchi in esteri di quelle che si trovano ad altitudini minori; ciò è importante perchè il pregio di un'essenza è dato proprio da un'elevata presenza di composti ossigenati.

Non essendo stata riscontrata una loro precisa funzionalità, varie teorie sono state ipotizzate circa la funzione degli oli essenziali nella pianta. Si pensa che gli oli essenziali siano di origine accidentale e non funzionale, pertanto si tratterebbe di prodotti di eliminazione nei processi vitali.

Un'altra ipotesi vuole che le essenze rivestano una funzione di riserva alimentare, ciò sarebbe provato, fra l'altro, dal fatto che nelle piante da essenze, in mancanza

di luce, si verifica una scomparsa quasi completa dei principi odorosi che verrebbero utilizzati al posto dei composti di riserva.

Si ritiene che gli oli essenziali abbiano una notevole importanza per attrarre gli insetti e favorire così l'impollinazione oppure che abbiano anche un ruolo importante nel creare delle “barriere di protezione”. Alcune piante, infatti, sono in grado di produrre difese chimiche sottoforma di sostanze che inibiscono la crescita di individui di altre specie.

La capacità di produrre sostanze tossiche e trattenerle nei tessuti, dunque, fornisce alle piante un enorme vantaggio competitivo paragonabile a quello che per altre piante rappresenta la produzione di spine o foglie coriacee.

Gli oli essenziali possono essere classificati in base al costituente chimico maggiormente rappresentato. I principali gruppi sono i seguenti:

- a prevalente contenuto di idrocarburi (limone, ginepro);

- a prevalente contenuto di aldeidi (cannella, mandorlo, melissa);

□ a prevalente contenuto di alcoli (sandalò, geranio, coriandolo);

□ a prevalente contenuto di chetoni (carvi, salvia, assenzio, maggiorana);

□ a prevalente contenuto di fenoli (anice, timo comune, santoreggia, garofano);

□ a prevalente contenuto di composti solforati (aglio, cavolo);

□ a prevalente contenuto di esteri (lavanda, mirtillo, pompelmo);

□ a prevalente contenuto di acidi (sedano, fragola);

□ a prevalente contenuto di lattoni (bergamotto, cocco) ⁽⁸⁾.

Lungo gli anni gli oli essenziali e altri estratti delle piante, hanno suscitato un notevole interesse come risorsa di prodotti naturali. Sono stati saggiati come rimedi alternativi a numerose malattie. Gli oli essenziali hanno mostrato possedere proprietà antibatteriche, antifungine, antivirali, insetticide e antiossidanti ⁽⁹⁾. Alcuni oli essenziali vengono usati anche nel trattamento del cancro ⁽¹⁰⁾. Gli oli essenziali vengono impiegati anche per la

conservazione dei cibi ⁽¹¹⁾, nell'aromaterapia ⁽¹²⁾, nell'industria cosmetica. In passato, così come negli ultimi anni, c'è stato un notevole interesse per le proprietà antimicrobiche degli oli essenziali. Il meccanismo di azione degli oli essenziali sui microrganismi non è stato molto indagato. Alcuni autori hanno attribuito l'attività antimicrobica degli oli essenziali all'interazione del loro gruppo funzionale (essenzialmente il fenolo) con lo sviluppo delle cellule microbiche, mentre altri autori hanno evidenziato come gli oli essenziali causano un deterioramento della membrana citoplasmatica ⁽¹³⁾. È stato anche ipotizzato che la complessa costituzione degli oli essenziali rappresenta una forte barriera per la crescita dei microrganismi patogeni.

Oltre a proprietà antimicrobiche ⁽¹⁴⁾ è stato dimostrato che gli oli essenziali posseggono anche proprietà antivirali ⁽¹⁵⁾, antimicotiche, antitossinogene ⁽¹⁶⁾, antiparassitarie ⁽¹⁷⁾, insetticide ⁽¹⁸⁾ ed antigerminative. Queste caratteristiche sono, senza dubbio, correlate alle funzioni che tali oli hanno nelle piante ⁽¹⁹⁾.

I processi estrattivi degli oli essenziali sono molteplici e variano a seconda della natura delle proprietà e del tessuto che contiene l'essenza. Il metodo estrattivo può influenzare notevolmente la composizione e il pregio stesso dell'olio. Le tecniche di preparazione delle essenze sono:

- spremitura;
- distillazione a pressione ridotta o in corrente di vapore.
- estrazione mediante grassi o solventi.: “*Enfleurage*”;
- estrazione con fluidi supercritici.

Estrazione di principi attivi da matrici vegetali

I principi attivi presenti nelle piante rappresentano spesso la base di farmaci di moderna concezione. Le piante che presentano una provata attività terapeutica vengono definite piante medicinali. Gli estratti vegetali possono essere definiti come preparazione di droghe, ovvero le parti della pianta ricche in principi attivi, in cui tutti i costituenti sono solubili nel solvente usato per la preparazione dell'estratto. Nell'estratto secco tutto il solvente è stato rimosso, mentre gli estratti umidi e gli estratti fluidi sono preparati utilizzando come solvente miscele di acqua ed etanolo. Diversi fattori possono influenzare il processo di estrazione. I principi attivi delle piante sono usualmente contenuti all'interno delle cellule, pertanto la scelta del solvente è importante, poiché deve essere in grado di diffondere all'interno della cellula per solubilizzare i composti desiderati. Il solvente ideale per un certo costituente farmacologicamente attivo deve essere altamente selettivo per il composto da estrarre, non deve reagire con il composto estratto o con altre sostanze presenti nel materiale vegetale, deve essere innocuo per

l'operatore, per l'ambiente e deve essere completamente volatile. Il solvente più comunemente usato è l'alcol etilico, generalmente miscelato con acqua per indurre il rigonfiamento delle particelle vegetali e aumentare la porosità delle pareti cellulari, in modo da facilitare la diffusione dei principi attivi dall'ambiente intracellulare al solvente circostante. La procedura di estrazione più frequentemente utilizzata è la macerazione, la quale rappresenta il metodo più semplice per ottenere un estratto. Di solito viene eseguita a temperatura ambiente, miscelando la droga polverizzata con il solvente e lasciandola per il periodo previsto sotto agitazione. Successivamente, si procede alla filtrazione dell'estratto e, perché l'estrazione sia quantitativa, la droga viene ulteriormente trattata con lo stesso solvente. L'estratto ottenuto mediante macerazione può, ad ogni modo, contenere impurità che devono essere rimosse prima dell'ulteriore trattamento dell'estratto. Le metodiche utilizzate a tale scopo sono la decantazione, la centrifugazione e la filtrazione. Infine, per poter utilizzare l'estratto per i saggi biologici, è necessario allontanare il

solvente, ovvero portarlo a secco. Per fare ciò, si ricorre all'evaporatore rotante, uno strumento in cui la concentrazione dell'estratto avviene sottovuoto ad una temperatura costante di 25-30°C per tutta la procedura, fattore importante poiché i principi attivi sono spesso termolabili.

Tecniche di estrazione

Fin dall'antichità l'uomo ha sviluppato e perfezionato molteplici metodi per trasformare le matrici vegetali in funzione dei differenti impieghi in campo farmaceutico, cosmetico ed alimentare. La scelta della tecnica di estrazione ottimale è influenzata da numerosi fattori come la specificità della pianta, le differenti parti che si intendono utilizzare (es. radici, corteccia, foglie, frutti) ed il particolare specifico utilizzo dell'estratto. In generale è possibile affermare che dalla stessa matrice vegetale, sottoposta a differenti processi di estrazione, si ottengono estratti che possono differire anche notevolmente per aspetto, composizione chimica ed attività biologica⁽²⁰⁾.

Le tecniche di estrazione tradizionalmente utilizzate sono principalmente basate sulla spremitura a freddo, l'estrazione con solventi e la distillazione. Pur se largamente diffuse, queste tecniche, spesso presentano degli inconvenienti come la degradazione chimica dei componenti ad opera del calore (distillazione ed estrazione con solventi a caldo) o per idrolisi (distillazione e macerazione acquosa), o la presenza indesiderata di

residui di solvente nell'estratto come nel caso dell'estrazione con solventi.

In tempi relativamente recenti, al fine di ridurre gli inconvenienti delle tecniche tradizionali e di ottimizzare gli aspetti legati ai costi energetici e all'impatto ambientale, sono state sviluppate numerose moderne tecniche estrattive che possono essere raggruppate in tre principali categorie: tecniche dello spazio di testa, distillazioni modificate ed estrazioni con solvente modificate.

Estrazione con solventi

L'estrazione con solventi organici è normalmente utilizzata per estrarre composti a più alto peso molecolare rispetto all'estrazione in corrente di vapore e per trattare prodotti termolabili. Questa si realizza mediante due distinti processi: prima si esegue l'estrazione vera e propria da cui si ottiene una miscela costituita dai composti estratti più il solvente (es. esano), poi si procede alla fase di eliminazione del solvente. Su scala di

laboratorio si lavora a pressione ridotta utilizzando un evaporatore rotante.

Gli estratti da materiali secchi ottenuti con questo processo sono spesso definiti oleoresine; quelli ottenuti dai materiali freschi sono definiti essenze concrete o concreti.

I solventi organici apolari hanno generalmente una bassa selettività di estrazione, infatti, vengono estratti praticamente tutti i composti non polari dalla matrice di partenza eccetto i polimeri a più alto peso molecolare. Utilizzando un solvente organico a maggiore polarità o una miscela di più solventi (es. CHCl_3 , MeOH da soli o in miscela) è possibile estrarre anche frazioni polari.

Gli estratti ottenuti con questa tecnica sono poco idonei per l'utilizzo nelle applicazioni alimentari a causa della presenza residua, anche se solo in tracce, del solvente utilizzato. Inoltre, i residui vegetali impregnati di solvente spesso sono molto inquinanti.

L'apparecchio automatico semi-continuo da noi utilizzato in laboratorio è un estrattore solido-liquido di Soxhlet. È costituito da tre parti fondamentali: dal pallone

d'evaporazione, dal corpo centrale, in cui si realizza l'estrazione e dal refrigerante che provvede a condensare i vapori del solvente nel pallone e a farli ricadere nell'estrattore. L'estrazione avviene per percolazione a caldo del solvente nella matrice vegetale; quando il solvente saturo d'estratto raggiunge un determinato livello, per sifonamento ricade nel pallone d'evaporazione. A questo punto l'estrazione diventa continua, automatica ed autosufficiente, con il risultato che la matrice vegetale nella camera di estrazione viene sottoposta a ripetuti passaggi di solvente puro; questo rende il processo molto più efficiente di una macerazione statica in un solvente in cui la concentrazione dei residui estratti aumenta costantemente, raggiungendo uno stato di equilibrio che impedisce progressivamente la liberazione e l'accumulo dei composti estratti della matrice.

Ulmaceae

La famiglia delle Ulmaceae è rappresentata da specie legnose, alberi o arbusti, con fiori poco appariscenti diffusi prevalentemente nelle zone temperate dell'emisfero boreale (Europa, Asia e Nordamerica). In Italia è presente in tutto il centro-nord e raramente a sud. Gli alberi e gli arbusti più diffusi della famiglia appartengono a 3 generi: *Ulmus*, *Zelkova* e *Celtis*. Il genere *Ulmus* è tipico delle regioni nordiche e temperate, il genere *Zelkova* è tipico delle regioni temperate mentre il genere *Celtis*, di nostro interesse, è diffuso nelle zone temperate e subtropicali. Le foglie delle Ulmaceae sono decidue, alterne o opposte, caratterizzate da una asimmetria alla base che, a seconda della specie, è più o meno marcata (*Ulmus*), da foglie maggiormente lanceolate e un po' asimmetriche alla base (*Celtis*), o da foglie lanceolate, simmetriche con margine profondamente dentato (*Zelkova*). Alla base del picciolo vi sono delle stipule caduche. I fiori sono tipicamente minuti, ridotti e di norma riuniti in infiorescenze poco vistose oppure solitari. Possono essere ermafroditi e attinomorfi (*Ulmus*), ermafroditi o unisessuali (*Celtis*) o

unicamente unisessuali (*Zelkova*). L'impollinazione è anemofila. Il frutto, secco e indeiscente o carnoso, è rappresentato da una samara, una drupa o una noce rispettivamente nei generi *Ulmus*, *Celtis* e *Zelkova*. I granuli del genere *Ulmus* sono radio simmetrici e pentazonoporati, così come quelli del genere *Celtis*.⁽²¹⁾

Il genere *Celtis* comprende circa 70 specie di alberi o arbusti diffusi principalmente nelle regioni temperate e tropicali dell'Emisfero Nord. Tra le specie di *Celtis* si ricordano:

- *Celtis aetnensis*
- *Celtis africana*
- *Celtis asperrima*
- *Celtis australis*
- *Celtis caucasica*
- *Celtis integrifolia*
- *Celtis philippinensis*
- *Celtis sinensis*
- *Celtis spinosa*

Celtis australis

Grande albero spontaneo, molto longevo, riesce a vivere anche 2-3 secoli. E' una specie xerofila e frugale che predilige i terreni sassosi e calcarei. Vive in boschi misti di latifoglie eliofile come le roverelle ed i lecci. Può raggiungere i 25 metri di altezza. Il tronco è diritto, abbastanza breve, caratterizzato da possenti nervature, con rami primari di notevoli dimensioni, mentre quelli secondari tendono ad essere penduli. La chioma è piuttosto densa, espansa, quasi perfettamente tondeggiante.

E' comunemente chiamato bagolaro, originario del Bacino Mediterraneo, è diffuso dalla Spagna meridionale fino al Caucaso e all'Asia occidentale.

Presente su tutto il territorio nazionale, in Sicilia, nella zona di Lentini se ne possono ammirare numerosi esemplari. Sembra che il suo nome comune, derivi dalla parola bagola, termine dialettale del nord italia che significa "manico" o "bacca" , per la sua riconosciuta bontà nell' utilizzo del suo legno per manici di fruste. Questa pianta è conosciuta anche con il nome di

spaccasassi, a causa del suo forte apparato radicale, che la rende in grado di sopravvivere e radicare anche in terreni carsici e sassosi, infatti è una peculiarità dei suoi semi, quella di germinare tra grossi massi e di riuscire, con gli anni, a romperli inserendo le radici nelle fessure.

Le foglie del bagolaro sono alterne, semplici con la lamina di 2-6 x 5-15 cm arrotondata alla base. La forma è lanceolata acuminata ed il margine è seghettato. L'apice è fortemente acuminato e la lamina, che presenta tre evidenti nervature primarie è pubescente.

I fiori ermafroditi e unisessuali (maschili), sono presenti ad aprile/maggio in infiorescenze sui ramuli insieme alle foglie.

Il frutto è una drupa ovale di 8-12 mm dapprima biancastra poi nera a maturità con polpa di sapore dolciastro e seme reticolato e spugnoso.

Noto fin dall'antichità, il bagolaro è oggi utilizzato nelle alberature stradali. Si tratta infatti di una pianta estremamente adatta all'ambiente urbano dal momento che resiste bene all'inquinamento atmosferico delle aree di intenso traffico. Rustica e frugale, si adatta a qualsiasi

tipo di terreno e di esposizione, resistente alla copertura d'asfalto.

Il legno, di color grigio-biancastro, è duro ed elastico; è un buon combustibile e dà carbone di qualità pregiata.

Dalla corteccia si estrae una sostanza gialla tintoria, mentre dai frutti si ricava un olio. Il bagolaro viene anche chiamato “albero dei rosari”, infatti i suoi semi erano utilizzati per costruire il rosario. [Figura 1].



Fig. 1 Frutto e foglia di *Celtis australis*

***Celtis aetnensis* Tornab. Strombl**

Il bagolaro dell'Etna, *Celtis aetnensis* (Tornab.) è una pianta endemica delle pendici sud occidentali dell' Etna e dei Nebrodi, molto diffuse nelle zone di Paternò, Licodia e Bronte.

Cresce tra i 500 ed i 900 metri s.l.m.; questa pianta è conosciuta comunemente Bagolaro (da *bagola* termine dialettale nordico che significa *manico*) per le raffinate caratteristiche del legno che viene utilizzato per la costruzione di mobili, manici per bastoni da passeggio, attrezzi agricoli e lavori al tornio. Il legno di *C.aetnensis* infatti si presenta chiaro, duro, flessibile, tenace, elastico e resistente.

Il Bagolaro, conosciuto in dialetto siciliano anche come “Minicucco”, è una specie protetta del parco dell'Etna. Vive in ambienti aridi, su terreni calcarei e sassosi, dove lo sviluppato apparato radicale penetra nelle fessure delle rocce favorendone lo sgretolamento: per questo è anche conosciuto volgarmente come “spaccasassi” .

Il tronco si presenta regolare, con corteccia liscia ed omogenea di colore grigiastro che tende a fessurarsi solo

negli esemplari più vecchi e longevi. I rami raggiungono diametri consistenti assumendo andamento laterale e verticale, mentre quelli secondari tendono a ricadere. Alto dai 5 ai 20 m adorna molte piazze, strade e cortili, dato il suo rapido accrescimento.

Le foglie sono caduche, semplici e bifacciali. L'inserzione è alterna ed avviene mediante un corto picciolo su rametti esili, brunastri e pubescenti su cui si evidenziano delle lenticelle biancastre. La lamina fogliare è ellittica o ovale-lanceolata (30-38 x 40-45 mm), cuoriforme alla base e apice appuntito. La nervatura è penninervia mentre il margine presenta una doppia dentatura. La pagina superiore è di colore verde intenso, quella inferiore è più chiara e possiede una fine peluria.

I fiori possono essere ermafroditi o unisessuali, di piccole dimensioni. Si trovano isolati all'apice dei rametti, mentre formano delle piccole infiorescenze alla base. I fiori ermafroditi hanno colore giallo-verdastro e possiedono 5-6 stami e 2 stigmi che si protrudono esternamente. Quelli maschili sono più giallastri in quanto risalta maggiormente il colore delle antere. La fioritura avviene

nei mesi di Aprile e Maggio, contemporaneamente all'emissione delle foglie.

Il frutto è costituito da una drupa verdastra di 8-12 mm che a maturità diventa commestibile, ovvero nei mesi di Settembre-Ottobre.

Il Bagolaro contiene diversi principi attivi quali tannini, fitosterina e mucillagini e per questo le foglie possiedono un buon effetto astringente, rinfrescante e lenitivo soprattutto nei casi di dissenteria e di enterite. Vengono usate anche per mitigare leggere infiammazioni del cavo orale e della gola, tra cui gengiviti e faringiti, mediante sciacqui e gargarismi ripetuti più volte durante il dì (per disturbi dell'apparato intestinale si usa un decotto di 2g di foglie in 100 ml d'acqua per 2-3 volte al dì; per gargarismi si usa un decotto di 5g di foglie in 100 ml d'acqua) [Figura 2].



Fig. 2 Frutto e foglia di *Celtis aetnensis* (Tornab.) Strobl

Celtis africana

Albero a foglie decidue, raggiunge fino i 25 m di altezza, endemico delle foreste comuni africane, riscontrabile anche nei giardini, dove può raggiungere un'altezza massima di 12 m.

Celtis africana è molto comune in Sud Africa, si trova in una vasta gamma di habitat dalle zone costiere fino ai 2100 m. Cresce sia su affioramenti rocciosi alle pendici delle montagne sia sulle dune costiere e lungo le rive dei fiumi.

Il tronco di *Celtis africana* si distingue facilmente per le caratteristiche della sua corteccia liscia, di colore grigio pallido tendente al bianco. Le foglie sono semplici, alterne di forma triangolare, con tre venature in rilievo alla base, presentano margine dentato all'apice. Le foglie neoformatesi sono luminose, pelose e di colorazione verde brillante che a maturità presentano una colorazione uniforme verde scuro.

I fiori compaiono in primavera, sono piccoli, verdastri, simili a stelle e poco appariscenti. Si distinguono fiori maschili e femminili.

I fiori maschili sono sostenuti alla base della foglia nuova, mentre i fiori femminili o bisessuali si trovano nelle ascelle delle foglie.

Il frutto è una drupa di colore giallo-marrone che vira al nero al raggiungimento della maturità, diventando così cibo di molti uccelli, che cibandosi di questi frutti maturi ne determinano la dispersione dei semi [Figura 3].



Fig. 3 Frutto e foglia di Celtis africana

Celtis asperrima

Diffuso nell'area del Mediterraneo orientale, il bagolaro siciliano è una specie endemica della Sicilia. Arbusto o piccolo alberello fino a 3-5 m, caducifoglio, con foglie piccole, semplici, picciolate a margine doppiamente dentato e base leggermente asimmetrica. Il frutto è una drupa verde che a maturità diventa di colore giallo ocra, di

circa 8 mm di diametro e lungamente pedunculata [Figura 4].

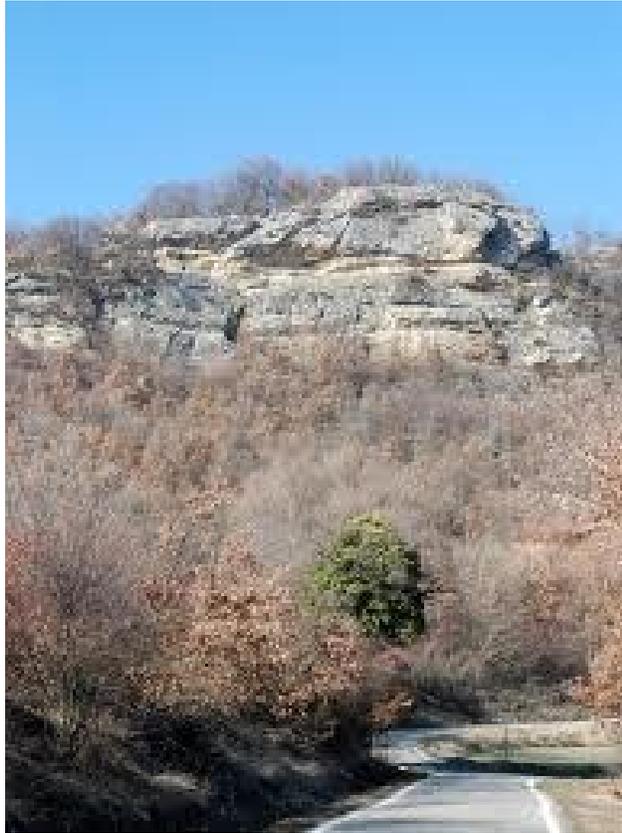


Fig. 4 Albero di *Celtis asperrima*

Celtis caucasica

Albero a foglie decidue raggiunge altezze anche di 20 metri. Ha foglie di media taglia, verdi, dentellate e tondeggianti; la chioma è molto fitta, in autunno prima di cadere le foglie si colorano di giallo-arancio, mostrando un fusto sfoglio viceversa si allargano in alto a formare la chioma.

La fioritura avviene in aprile, mentre la maturazione dei semi ad ottobre. I fiori presentano una colorazione verde, sono ermafroditi e vengono impollinati dalle api.

Il frutto di 4,5 mm di diametro, ha una polpa sottile, secca, dolce dal sapore farinoso e gradevole, ma presenta una leggera astringenza.

La pianta predilige terreni ben drenati, sabbiosi o mediamente argillosi. È tipica delle zone scogliere di pietra a secco, rocce, anfratti e occasionalmente come sottobosco nelle radure [Figura 5].



Fig. 5 Frutto e foglia di *Celtis caucasica*

Celtis integrifolia

Albero di grandi dimensioni, cresce fino a 25 m, molto diffuso in Francia. Il tronco è di 1,5 m di diametro, la corteccia è liscia e scura e presenta a tratti delle macchie; la superficie inferiore delle foglie è ruvida. Si tratta di una specie largamente utilizzata per scopi medicinali. Numerosi nomi comuni si riscontrano per questa pianta, tra questi nugzo, zumo, samparanga [Figura 6].



Fig.6 Frutto e foglia di *Celtis integrifolia*.

Celtis philippinensis

Specie endemica dell'Africa tropicale, Asia ed Australia.

E' un albero perenne che raggiunge i 20-30 m di altezza, dalla corteccia liscia e di colore grigio; la ramificazione è fitta, i ramoscelli più giovani sono lunghi 8,5-17,5 cm e larghi 3,5-7,8 cm.

Le foglie pubescenti presentano un picciolo lungo 4-16 mm con stipole lanceolate poco visibili al di sotto del punto di attacco [Figura 7].



Fig. 7 Pianta di *Celtis philippinensis*

Celtis sinensis

Originario della Cina, Corea e Giappone. Presenta fiori bisessuali nella parte superiore, in quella inferiore si riscontrano invece fiori maschili. È un arbusto o albero a foglia caduca, solitamente di 15 m di altezza, raramente raggiunge i 25 m. Corteccia liscia, di colore grigio-argento, le foglie nuove sono inizialmente pelose in particolare lungo la parte inferiore, ma rapidamente diventano quasi glabre.

Le foglie mature, ovate e dal colore verde scuro, sono di 4-10 cm di lunghezza e 2-4,5 cm di larghezza. I margini sono dentati solo nella metà superiore.

Il frutto è a forma di globo succulento di circa 6-8 mm di larghezza con un gambo di 0,4-1 cm di lunghezza. Il frutto assume una colorazione arancio-marrone a maturazione.

Diffuso in aree umide, in particolare lungo le rive dei corsi d'acqua e sui terreni argillosi. [Figura 8].



Fig. 8 Albero di *Celtis sinensis*

***Celtis spinosa* Spreng**

Celtis spinosa Spreng o Tala è una pianta originaria dell'America meridionale, tropicale e subtropicale. Fornita di spine forti, essa è apprezzata per le caratteristiche del suo legno, durezza e pesantezza.

Il tala è un albero di media dimensioni, di solito tra 4 e 7 m di altezza, a seconda della disponibilità di acqua può assumere conformazione di arbusto. Presenta una corteccia chiara che diventa deiscente nell'adulto, ramoscelli a zig-zag con due picchi al pareggio.

Il fogliame ha una colorazione verde chiaro semipersistente, si tratta di foglie semplici, alternate, picciolate, ovate con lamina di 35 x 20 mm, base arrotondata e margine seghettato nella regione apicale.

Fiorisce in primavera, producendo fiori ascellari e solitari non appariscenti fino a 2 mm di diametro con una colorazione giallo-verde.

I fiori maschili sono presenti soprattutto alla base, quelli femminili nella regione distale, soltanto raramente si riscontrano fiori ermafroditi.

Il frutto, commestibile, è una drupa giallo-arancio, di forma sferica e circa 5 mm di diametro. Predilige luoghi asciutti o moderatamente umidi, ben drenati e calcarei.

[Figura 9].



Fig. 9 Frutto di *Celtis spinosa* Spreng

UTILIZZI BIOLOGICI DEL GENERE *CELTIS*

Alcune specie di *Celtis* sono impiegate in medicina tradizionale per la cura di lombagie, disturbi gastrici, dolori addominali, nonché per la loro azione astringente e lenitiva in caso di diarrea, enterite ed infiammazione del cavo orale⁽²²⁾. Tali proprietà sono principalmente attribuibili a principi attivi contenuti nelle foglie, quali tannini, saponine e flavonoidi, ma, recentemente, alcuni studi fitochimici hanno mostrato che i ramoscelli delle specie *Celtis* contengono betulina, acido gallico, acido 3-3'-di-O-metil-ellagico, acido urolitico, alcaloidi e triterpeni sostanze che posseggono attività antiossidante e anti-tumorale⁽²³⁻²⁴⁾.

Negli estratti etanolici delle foglie di *Celtis australis* L. e *Celtis occidentalis* L. è stata valutata una forte attività antiossidante. Gli studi ottenuti da Taha S. *et al* per l'estratto n-butanolo e per 2''-galactosyl vitexin (principale flavonoide isolato), dimostrarono che il glicoside C-flavonoide, presente in entrambe le specie, erano responsabili degli effetti scavenger attraverso vari

meccanismi come inibizione della xanthine oxidase e la produzione dell'anione superossido, nonché della protezione delle membrane contro la perossidazione lipidica. Questo potrebbe essere potenzialmente utile per il trattamento di gravi malattie degenerative indotte dai radicali liberi comprendendo la disfunzione celebrale, infiammazione, disturbi epatici e cancro. ⁽²⁵⁾

ANTIOSSIDANTI

Il termine antiossidante si riferisce ad “una sostanza che, quando presente a basse concentrazioni rispetto a quelle di un substrato ossidabile, è in grado di eliminare o prevenire in modo significativo l’ossidazione di quel substrato”⁽²⁶⁾.

Gli antiossidanti sono composti in grado di proteggere sostanze chimiche e materiale biologico dai danni provocati dall’ossidazione indotta da radicali. Il complesso sistema antiossidante che l’organismo umano ha sviluppato per proteggere le cellule dalle specie reattive dell’ossigeno coinvolge componenti endogeni ed esogeni che funzionano sinergicamente per neutralizzare i radicali liberi. Tra i componenti endogeni vengono annoverati alcuni enzimi in grado di catalizzare reazioni di inattivazione di radicali liberi, alcune proteine in grado di chelare ioni essenziali per la reazione di ossidazione (Fe^{2+} e Cu^{+}), mentre tra gli esogeni si possono includere gli antiossidanti assunti con la dieta quali l’acido ascorbico, la vitamina E, i carotenoidi, i polifenoli e altri composti a basso peso molecolare. Gli antiossidanti possono essere classificati in funzione del loro

meccanismo d'azione. Essi infatti possono bloccare la fase di iniziazione, inibendo enzimi pro-ossidanti che producono radicali o chelando ioni di metalli di transizione che catalizzano la formazione di radicali, oppure possono agire nella fase di propagazione della reazione a catena neutralizzando i radicali che si formano in questo stadio.

Gli antiossidanti che prevengono la formazione dei radicali, e che quindi riducono i danni in modo indiretto, vengono classificati come antiossidanti preventivi mentre quelli che agiscono direttamente come *scavenger* di radicali nella fase di propagazione vengono invece classificati come chain-breaking e sono caratterizzati dalla capacità di trasferire un atomo di H o un singolo elettrone. Alcuni antiossidanti sono inoltre in grado di aumentare i livelli delle difese antiossidanti endogene in vivo aumentando, per esempio, la trascrizione dei geni che codificano la produzione di enzimi antiossidanti (come la SOD, la catalasi o la glutatione- perossidasi). Questa classificazione non è però netta ed assoluta in quanto

spesso diversi meccanismi d'azione possono coesistere in una singola molecola.⁽²⁷⁾

Il sistema antiossidante che l'organismo umano ha sviluppato è perfezionato dalla possibilità che diversi composti antiossidanti interagiscano fra loro producendo un effetto sinergico. Ne è un esempio il sistema vitamina E / vitamina C: l'acido ascorbico mostra infatti la capacità di rigenerare l' α -tocoferolo dal suo radicale (tocoferile) potenziando così l'attività antiossidante del tocoferolo.⁽²⁸⁾

Esistono metodi indiretti di misurazione dell'attività antiossidante, che testano la capacità di una molecola, di ridurre un radicale stabile artificiale o un metallo di transizione. Queste analisi sono il “*DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) Radical Scavenging Method*” e la “*FRAP (ferric-reducing antioxidant power) Assay*”.

Saggio DPPH

La prova permette di determinare il potere antiossidante facendo reagire il campione da analizzare con una soluzione di DPPH [2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, PM

394.33, C₁₈H₇₂N₅O₆] ed analizzando all'UV la diminuzione del picco a 517 del radicale.

Composti antiossidanti (AOH) che sono capaci di trasferire un atomo di idrogeno al radicale, causano una decolorazione della soluzione. Si analizza quindi all'UV-Vis la diminuzione del picco a 517 nm del radicale (DPPH) dopo un tempo di incubazione prestabilito. Questa diminuzione (decolorazione) e' proporzionale alla carica antiossidante presente nel campione.

Sánchez et al. (2007) hanno sperimentato quattro diversi test (ABTS.+ test, DPPH test, ORAC test, β -carotene-linoleate test) per determinare l'attività di "free-radical scavenging" di diversi oli vergini di oliva il cui contenuto in polifenoli totali è stato determinato con il metodo del Folin-Ciocalteu. Nonostante tutti e quattro i metodi abbiano mostrato un'ottima correlazione tra il contenuto in polifenoli totali e l'attività antiossidante misurata, il metodo migliore è risultato essere l'ABTS.+ test.

RADICALI LIBERI

I radicali liberi sono specie chimiche (atomi o molecole) che possiedono uno o più elettroni spaiati negli orbitali esterni; tendono a sottrarre, ad altre molecole, elettroni per raggiungere una maggiore stabilità, pertanto sono dotate di grande reattività.

La loro emivita è dell'ordine di millisecondi e reagiscono prevalentemente nel luogo di formazione fatta eccezione per alcuni come l'ossido di azoto che possono diffondere dalla cellula endoteliale alla fibrocellula della muscolatura liscia vasale.

L'ossigeno indispensabile per la vita degli organismi aerobi, in particolari condizioni può diventare un pericoloso killer, tuttavia alcune specie reattive dell'ossigeno così come altre specie radicaliche possono svolgere un'azione fisiologica.

La cellula, tende a mantenere l'omeostasi dello stato redox con un pathway che coinvolge sistemi di salvaguardia sofisticati enzimatici e non; quest'ultimi

possono essere idrofobici e idrofili ed agiscono con diversi meccanismi molecolari.

Alcune molecole, note come “preventing antioxidants” (catalasi, glutazione perossidasi, glutazione redattasi, glucosio-6-fosfato deidrogenasi) limitano la formazione dei radicali decomponendo l’acqua ossigenata e gli idroperossidi organici precursori di specie radicaliche o sequestrando ioni metallici che partecipano a reazioni redox (transferrina, ceruloplasmina, lattoferrina), altre molecole note come “free radical scavengers” eliminano i radicali via via che vengono prodotti con diversi meccanismi: a) inibendo l’iniziazione di una reazione radicalica (superossido dismutasi); b) interrompendo la propagazione (vitamina E, acido ascorbico, glutazione ridotto); c) formando un nuovo radicale meno reattivo e più stabile per risonanza elettronica (bioflavonoidi esogeni).

Nella cellula esiste un equilibrio tra fattori pro-ossidanti (endogeni ed esogeni) e meccanismi di difesa atti a neutralizzarne gli effetti; una modificazione di ciò innesca

una serie di alterazioni metaboliche nel complesso note come "stress ossidativo".

I radicali liberi dell'ossigeno (ROS) sono in grado di danneggiare, con un meccanismo ossidativo, molecole biologiche come DNA, proteine, carboidrati e lipidi; la modificazione sul piano chimico di queste molecole ne altera la loro funzione.

E' noto che, sulle membrane cellulari, i ROS inducono danni alle biomolecole; in particolare provocano perossidazione dei fosfolipidi con conseguente perdita della fluidità e della permeabilità selettiva della membrana, fenomeni entrambi che la contraddistinguono (29).

I ROS inducono danni al DNA ed alle proteine con conseguente proteolisi e/o loro aggregazione random.

I ROS giocano un ruolo chiave nell'eziopatogenesi di alcune patologie quali aterosclerosi, catarattogenesi, neoplasie, fototossicità, invecchiamento cutaneo precoce, danni da riperfusione post-ischemica, patologie neurodegenerative e metaboliche.

I ROS, inoltre, sembrano partecipare alla regolazione della morte apoptotica in diversi modi; le specie radicaliche modulano infatti, l'ambiente redox della cellula; questo sofisticato meccanismo molecolare, cioè l'ambiente redox, è in grado di determinare il destino di una cellula se questa deve proliferare, differenziarsi o morire per apoptosi.

Numerosi ricerche sperimentali hanno chiaramente dimostrato che il consumo di antiossidanti naturali, contenuti nella dieta e/o nei preparati fitoterapici, possono ridurre il rischio di contrarre il cancro, e quelle patologie che sono correlate allo stress ossidativo poiché influenzano positivamente lo stato redox di una cellula e/o l'equilibrio tra produzione e rimozione di ROS⁽³⁰⁾.

SISTEMI DI DIFESA

Glutazione

Il glutazione fu scoperto nel 1888, nelle cellule di lievito, con il nome di filotone, ma venne caratterizzato solo dopo gli anni venti.

Il glutazione (GSH) è un tripeptide costituito da acido glutammico, cisteina e glicina; è una molecola molto solubile in acqua grazie alla presenza di gruppi idrofilici nella sua struttura.

Il gruppo -SH, per la sua acidità relativamente alta, caratterizza il GSH come composto nucleofilo e lo rende partecipe in un numero estremamente ampio di reazioni biologiche. Il gruppo -SH ha la proprietà di reagire formando radicali tiolici, meno reattivi che si inseriscono nella formazione di glutazione ossidato. Inoltre, il GSH protegge la cellula dall'azione dei perossidi inorganici in quanto partecipa alle reazioni catalizzate dalla glutazione perossidasi:



per poi essere ripristinato a GSH ad opera della glutatione reduttasi che utilizza prevalentemente il NADPH come coenzima:



Il GSH è il più potente ed importante fra gli antiossidanti prodotti dall'organismo esso non solo protegge le cellule dagli ossidanti esogeni ma ha anche un ruolo nel meccanismo di ricarica della vitamina E, e dell'acido ascorbico, entrambi ottimi antiossidanti.

Il gruppo sulfidrilico ha la capacità di reagire con specie radicaliche, quali gli idroperossidi, formando dei prodotti meno reattivi, che portano alla formazione del glutatione ossidato (GSSG).

La sintesi di GSH è molto elevata nel rene e nel fegato, lo è di meno nel cervello, negli eritrociti e nel muscolo. Esso viene sintetizzato a livello cellulare attraverso due reazioni enzimatiche

L-glutamato + L-cisteina + ATP + Mg²⁺ → L-

glutamilcisteina + ADP + P L-

glutamilcisteina + ATP + glicina + Mg²⁺ → GSH + ADP + P

La prima reazione è catalizzata dalla γ -glutamilcisteina sintetasi; la seconda dalla glutatione sintetasi, entrambe le reazioni avvengono in presenza di ioni Mg²⁺.

La γ -glutamilcisteina sintetasi è l'enzima che regola la sintesi del GSH; si trova in maggior concentrazione nel rene, dove rappresenta il 2-3% delle proteine citoplasmatiche e la sua attività è di venti volte superiore a quella riscontrabile a livello epatico.

Nei tessuti sono presenti degli enzimi che accelerano le funzioni di GSH come agente riducente, nucleofilo e regolatore enzimatico. Questi sono localizzati prevalentemente nel citoplasma, tuttavia alcuni hanno sede mitocondriale.

Per ripristinare il normale contenuto di GSH, la cellula deve provvedere alla sua sintesi per mezzo del ciclo γ -glutamilico.

Le funzioni svolte dal GSH sono molteplici, agisce anche da coenzima in reazioni quali l'idratazione, l'idrogenazione e l'isomerizzazione. Un tipico esempio di reazione di idratazione cui partecipa è quella catalizzata dal complesso multienzimatico denominato gliossilasi; in questa reazione avviene la trasformazione dell'aldeide piruvica ad acido lattico.

Un'altra reazione che prevede il coinvolgimento del GSH come coenzima è la deidrogenazione dell'aldeide formica ad acido formico, tramite la formaldeide deidrogenasi.

Nel fegato l'enzima GSH-transferasi aumenta la velocità di reazione del GSH con vari substrati e porta alla formazione di prodotti meno tossici e più facilmente escreti per via biliare e renale.

Nei casi di intossicazione acuta si può avere una forte deplezione epatica di GSH, conseguentemente gli elettrofili tossici possono espletare l'azione di attacco su altri nucleofili presenti nella cellula, con possibili lesioni funzionali dell'organo colpito, che potrebbero portare a risvolti drammatici, quali una seria compromissione della vita dell'individuo.

Si deve sottolineare che un ridotto apporto proteico con la dieta, uno stato di stress, l'esposizione a sbalzi termici e l'utilizzo di farmaci ipotensivi sono fattori che inducono ad una deplezione di GSH.

Un altro enzima che utilizza il GSH come coenzima è la glutatione perossidasi, presente in molti tessuti; nel fegato occupa il 70% del citoplasma ed il 30% della matrice mitocondriale. L'enzima GSH-perossidasi accelera l'eliminazione di sostanze ossidanti quali perossido di idrogeno e idroperossidi organici.

L'eccesso di GSSG, dopo un attacco ossidativo, può essere in parte ridotto dal NADPH per mezzo della glutatione reduttasi (GSH-reduttasi) ed in parte può riversarsi all'esterno della cellula.

La GSH-reduttasi, quindi mantiene entro la norma le concentrazioni di GSSG che si formano per fenomeni ossidativi o per altre cause, riducendolo a GSH.

La GSH-reduttasi riduce non solo il GSSG, ma anche i disolfuri misti del GSH con proteine o con composti non proteici; ciò avviene per esempio nell'eritrocita, dove il GSH riduce i disolfuri misti che forma con l'emoglobina,

o nell'occhio dove riduce i disolfuri misti proteici presenti nel cristallino.

La riduzione di GSH a circa il 20-30% della quantità normale, riduce le difese cellulari nei confronti dei composti tossici e porta alla morte cellulare.

Eme ossigenasi

Gli organismi del nostro pianeta si sono sviluppati in un ambiente ricco di ossigeno che è di per sé tossico. Le cellule, pertanto, di ogni organismo sono state costrette a concepire vari meccanismi di protezione. Tra questi si ricorda l'enzima eme-ossigenasi (HO) che catalizza la tappa limitante la velocità della reazione di degradazione dell'eme in biliverdina, monossido di carbonio (CO) e ferro libero ⁽³¹⁻³²⁾. Questa reazione porta all'eliminazione del ponte π -metenico e alla successiva incorporazione di 2 atomi di ossigeno nei gruppi carbonilici dell'anello A e B del tetrapirrolo; in concomitanza si ha anche il release di un atomo di ferro che viene poi sequestrato dalla ferritina. Nei mammiferi la biliverdina prodotta viene

immediatamente convertita in bilirubina dalla biliverdina reduttasi ⁽³³⁾.

Il sistema enzimatico responsabile della degradazione dell'eme venne descritto per la prima volta da Tenhunen nel 1968 ⁽³⁴⁾.

L'enzima HO fu isolato e purificato per la prima volta da omogenati di fegato e milza bovini.

Nel 1986, utilizzando procedure di purificazione più raffinate, furono individuate due isoforme di HO (HO-1, HO-2) che possedevano diversi pesi molecolari, antigenicità, sensibilità al calore e risposta agli induttori ⁽³⁵⁾.

HO-1 è espressa ubiquitariamente nei tessuti dei mammiferi, presenta un peso molecolare di 32 Kda e la sua espressione viene indotta da diversi stimoli termici e/o chimici ⁽³⁶⁻³⁷⁻³⁸⁾ per questi motivi HO-1 è anche considerata una *heat shock protein* (Hsp32).

HO-2, proteina di 36 KDa, è localizzata prevalentemente a livello cerebrale; essa rappresenta la forma costitutiva infatti la sua espressione rimane inalterata anche in seguito a diversi stimoli.

Più recentemente è stata identificata una terza isoforma, l'HO-3 simile strutturalmente all'HO-2, ma che risulta meno efficiente a catalizzare la degradazione dell'eme.

L'attività di HO è influenzata da innumerevoli fattori solo apparentemente non correlati tra loro; alcuni di loro esercitano i loro effetti agendo direttamente sui livelli intracellulari di eme, altri invece agiscono con segnali diversi, correlabili alla modulazione dei livelli intracellulari dei composti non-eme. Questi includono: eme, iperossia, ipossia, shock termico, endotossine, perossido d'idrogeno, citochine, raggi UV, metalli pesanti e ossido nitrico.

E' stato dimostrato che l'enzima HO-1 è capace di proteggere le cellule dallo stress ossidativo ⁽³⁹⁾; inoltre ha proprietà anti-infiammatorie, antiapoptotiche, anti-proliferative ed infine anche la capacità di prevenire alcune malattie (aterosclerosi e sepsi). Tuttavia, il meccanismo con cui l'HO-1 esplica i suoi effetti benefici è ancora poco chiaro.

Meccanismo di reazione

L'attività catalitica di HO richiede la presenza di NADPH-citocromo P450 reduttasi, ossigeno molecolare, NADH e NADPH.

L'attività enzimatica di HO è fortemente influenzata dallo ione metallico centrale legato alla porfirina, suo substrato; affinché le porfirine possano essere substrati di HO è fondamentale la presenza dello ione ferroso (Fe^{2+}).

Le metallo-porfirine contenenti Sn, Co, Zn e Mn si comportano da inibitori competitivi dell'enzima, mentre Mg, Ni e Cu protoporfirine agiscono da moderati induttori dell'attività degradativa di HO⁽⁴⁰⁾.

HO è maggiormente localizzato a livello microsomiale, dove può interagire con le flavoproteine e la NADPH-citocromo P450 reduttasi. Pur non essendo un emoproteina, questo enzima lega reversibilmente l'eme nello stato di transizione con un rapporto stechiometrico 1:1. Nello stato di transizione il complesso HO-eme riceve gli equivalenti riducenti dal NADPH e/o NADH,

per mantenere l'atomo di ferro dell'eme a Fe^{2+} ; questa condizione è essenziale per far avvenire il legame del ferro con l'ossigeno molecolare.

Il primo stop della reazione di degradazione dell'eme è quindi rappresentato dalla formazione del complesso HO-eme- O_2 .

Il primo prodotto di conversione dell'eme è α -idrossi-eme, in questo stadio viene consumato un equivalente riducente. L' α -idrossi-eme viene ulteriormente ridotto in un composto avente λ_{max} di assorbimento pari a 688 nm⁽⁴¹⁻⁴²⁾.

Lo stop finale della reazione porta alla rottura del ponte α -metenico, al concomitante rilascio di una molecola di CO e alla formazione di una molecola di biliverdina.

Il clivaggio dell'anello porfirinico rilascia il ferro che, nella sua forma libera è un noto pro-ossidante, ma che viene rapidamente neutralizzato da alcune proteine leganti il ferro (*iron binding proteins*), come la ferritina, che sembrerebbe trovarsi in concentrazioni sufficienti all'interno delle cellule per prevenire il danno indotto dai radicali prodotti dalle reazioni tipo Fenton. Il CO

generato, alle alte concentrazioni, risulta tossico, ma in concentrazioni fisiologiche esso gioca un ruolo essenziale nei processi di vaso dilatazione e nella modulazione dell'attività della guanilato ciclasi, stimolando conseguentemente la sintesi di un secondo messaggero, il cGMP.

La biliverdina di per sé è un potente anti-ossidante ma la biliverdina reduttasi converte la biliverdina in bilirubina.

Sebbene la bilirubina venga spesso associata ad un'elevata tossicità nell'ittero, in concentrazioni fisiologiche essa agisce come scavengers di radicali.

L'espressione di HO-1 viene principalmente regolata da segnali redox; un incremento dei contenuti intracellulari dei tioli ed altri antiossidanti inibiscono la trascrizione di HO-1, che è invece fortemente stimolata da agenti ossidanti, tra cui, l'eme, le radiazioni UV, i metalli pesanti, le citochine infiammatorie, l'endotossina batterica e ROS ⁽⁴³⁻⁴⁴⁻⁴⁵⁾.

Lo stress ossidativo determina un accumulo di HOmRNA; l'attività trascrizionale è regolata da diversi fattori trascrizionali fra cui, NFkB e AP2. Recentemente è stata

caratterizzata una zona del promoter denominata “*antioxidant responsive element*” (ARE); gli ARE sono sequenze consenso presenti in diversi geni che rispondono allo stress ossidativo incluso la γ -glutamylcisteina sintetasi e la chinone reduttasi.

Recenti studi hanno evidenziato che uno stimolo ossidativo indotto dai ROS è capace di attivare gli ARE.

HO-1 gioca un ruolo importante anche nella prevenzione dei processi infiammatori; è noto, infatti, che la cicloossigenasi (COX) possiede un gruppo prostetico eme che ne regola l'attività; l'up-regulation di HO-1 può ridurre la produzione di prostaglandine e degli altri mediatori dell'infiammazione sottraendo eme alla COX.

Caspasi

Le caspasi (*cysteinyll aspartate-specific proteases*) sono una famiglia di proteasi cisteiniche presenti nelle cellule in forma inattiva, esse richiedono la presenza di ioni Ca^{++} e vengono specificamente espresse quando si mette in atto il programma apoptotico.

L'apoptosi costituisce il carattere morfologico più tipico della morte cellulare "programmata" o per "suicidio".

La morte apoptotica, diversamente dalla necrosi, è una morte che richiede una partecipazione attiva dei sistemi enzimatici cellulari nel mediare la morte ben prima che le membrane cellulari perdano la loro integrità.

Le caspasi sono sintetizzate in forma di proenzima inattivo, da cui si ottiene per proteolisi un tetramero costituito da una coppia di eterodimeri a loro volta formati da una subunità con una funzione catalitica e da un'altra con funzione regolatrice.

L'attività peptidasica richiede la presenza di entrambi i tipi di subunità, che catalizzano esclusivamente reazioni di proteolisi limitata necessarie per l'attivazione di citochine, o coinvolte nella morte cellulare programmata, definita comunemente apoptosi.

Le caspasi sono identificate e catalogate con numeri che in genere riflettono l'ordine con cui sono state scoperte.

Le caspasi 1, 4 e 5 sono prevalentemente coinvolte nei processi di maturazione delle interleuchine e quindi rivestono un ruolo importante nei processi infiammatori

ed immunitari da queste mediate. Le caspasi 2, 3, 6, 7, 8, 9 e 10 sono invece coinvolte nei processi apoptotici.

Le caspasi esistono in forma di precursori inattivi, che vengono attivati da processi di proteolisi parziale che possono essere effettuati dalle stesse caspasi. Si distingue pertanto un gruppo di caspasi prossimali o iniziatrici (2, 8 e 10) in grado di attivare le caspasi distali o esecutrici (3, 6, 7, 9 e 13) che “eseguono la condanna” proteolizzando una serie di importanti proteine bersaglio.

Il processo a cascata delle caspasi presenta anche rapporti bidirezionali che hanno la funzione di amplificare il segnale iniziale.

Le caspasi iniziatrici presentano una struttura più complessa di quelle esecutrici. Poiché la loro attivazione avviene per autoproteolisi, è necessario uno stretto controllo che attivi l'intero processo solo in risposta a determinati segnali.

Le caspasi iniziatrici insieme al dominio catalitico sono dotate di un ulteriore dominio (detto domino effettore di morte o DED da “death effector domain”) che le mette in relazione con particolari recettori. Il collegamento non è

diretto, ma avviene per interposizione di proteine adattatrici che interagiscono da un lato con i domini DED delle caspasi e dall'altro con i “domini di morte” (DD da “death domains”) di proteine recettoriali di membrana, quali il CD95 o il TNF-R1. Il segnale generato dall'interazione tra tali recettori con i rispettivi ligandi porta alla formazione di un complesso sopramolecolare contenente adattatori e procaspasi.

L'avvicinamento di un numero sempre maggiore di procaspasi crea le basi per l'autoattivazione proteolitico delle stesse e per la propagazione del segnale apoptotico dalla superficie all'interno della cellula. Il sistema è anche dotato di sistemi di limitazione ed autocontrollo in grado di ridurre la stimolazione delle caspasi prossimali.

Scopo della tesi

Nelle cellule viventi l'eccessiva produzione di ROS ha conseguenze negative in quanto può portare ad alterazioni delle caratteristiche funzionali e strutturali di un tessuto vivente inducendo le cellule ad andare incontro ad un processo di morte cellulare.

Lo stress ossidativo è dunque il risultato di uno squilibrio tra le difese antiossidanti e le sostanze proossidanti, a favore di quest'ultime.

E' stato dimostrato che nell'eziopatogenesi del cancro sono coinvolti anche dei processi chimici ossidativi dovuti ad un'eccessiva produzione di ROS. Oggi è in crescita l'attenzione scientifica sul coinvolgimento chimico dei ROS nel cancro.

I tumori, o almeno alcuni di essi, avrebbero origine dismetabolica con immissione in circolo di abnormi quantità di radicali liberi, che innescerebbe a livello genetico un insieme di meccanismi irreversibili.

In questi ultimi anni, nei paesi industrializzati il rischio di ammalarsi di alcuni tipi di tumore è diminuito, mentre l'incidenza globale della malattia è in continuo aumento.

Oltre al fumo di tabacco, vengono chiamati in causa altri elementi quali le abitudini alimentari non corrette. Una corretta dieta alimentare con un supporto di preparati fitoterapici, infatti, è fonte di sostanze ad attività preventiva nei confronti di tale patologia.

Migliaia di vitamine e di sostanze di diversa natura chimica come polifenoli, flavonoidi, terpeni, contenute nelle piante, sono in grado di aumentare le difese antiossidanti e di indurre fenomeni di attivazione delle difese immunitarie contro microrganismi e cellule tumorali.

E' stato dimostrato che la maggior parte degli antiossidanti naturali presenti nella dieta possono agire sia come "free radical scavengers", sia come chelanti dei metalli. Queste sostanze naturali, inoltre, dovrebbero indurre le stesse cellule tumorali ad una morte cellulare di tipo apoptotico. E' noto infatti che le cellule neoplastiche non muoiono per apoptosi.

Grazie a queste proprietà, la presenza di antiossidanti naturali nella dieta potrebbe contribuire a contrastare gli effetti tossici dei ROS.

L'obiettivo della tesi è stato lo studio dell'attività antimicrobica e antitumorale degli estratti dei ramoscelli di *Celtis aetnensis*.

In medicina tradizionale alcune specie di *Celtis* sono impiegate per la cura di lombalgie, disturbi gastrici, dolori addominali, nonché per la loro azione astringente e lenitiva in caso di diarrea, enterite ed infiammazione del cavo orale. Tali proprietà sono principalmente attribuibili ai principi attivi contenuti nelle foglie, quali tannini, saponine, flavonoidi e composti terpenici sostanze che posseggono attività antiossidante e anti-tumorale.

In un studio precedentemente condotto dalla Prof.ssa Iauk è stato dimostrato che un estratto cloroformico di *Celtis aetnensis* possedeva un'attività oncosoppressiva su cellule di tumore al colon.

Per comprendere ulteriormente il meccanismo d'azione di *Celtis aetnensis* è come questo sia in grado di proteggere le cellule tumorali, scopo della presente ricerca è stato quello di valutare l'effetto di un estratto cloroformico di ramoscelli di *Celtis aetnensis* sui livelli di GSH, di

espressione di α -glutamincisteina sintetasi, di HO-1 e di caspasi. Questa ricerca, inoltre, è stata condotta al fine di:

- individuare nuovi meccanismi d'azione implicati nel processo di carcinogenicità;
- verificare l'ipotesi che la presenza nella dieta di molecole naturali ad attività antiossidante possa contribuire a prevenire e/o contrastare lo sviluppo di neoplasie.

Materiali e Metodi

Preparazione dell'estratto

Per l'estrazione dei principi attivi, i ramoscelli essiccati (50 g), dopo essere stati triturati, sono stati messi a macerare in MeOH 60% (2 x 500 ml) per circa 24 ore. Il filtrato è stato portato a secco mediante evaporatore rotante. Il residuo secco (1,41 g), successivamente, è stato solubilizzato in acqua (50 ml) ed estratto mediante imbuto separatore con esano (3 x 50 ml). La soluzione acquosa è stata ulteriormente estratta con cloroformio (3 x 50 ml). Successivamente, la soluzione cloroformica è stata portata a secco; il peso residuo ottenuto era di 133,6 mg. A partire dall'estratto secco, sono state valutate l'attività antitumorale e antimicrobica.

Attività antimicrobica

Per l'analisi microbiologica sono stati preparati un decotto e due estratti alcolici, utilizzando le foglie essiccate previamente all'aria e polverizzate. Il decotto è stato preparato facendo bollire 10 g di foglie in 100 ml di acqua deionizzata per 10 minuti. Il prodotto è stato filtrato con carta da filtro e portato a pH 5,7 con HCL. Il decotto è stato quindi liofilizzato per garantire le condizioni ottimali di conservazione.

Sono stati inoltre preparati un estratto etanologico e uno in n-butanolo: 10 g di foglie sono state estratte rispettivamente con i due alcoli (3x100 ml) per 24 h; i due estratti sono stati quindi filtrati e portati a secco sottovuoto in Rotavapor. Prima del saggio di sensibilità tutti gli estratti ottenuti sono stati disciolti in DMSO e successivamente è stata effettuata una diluizione 1:10 fino a raggiungere le seguenti stock solutions con diverse concentrazioni: Decotto 8190 µg/ml; estratto etanologico 8190 µg/ml; estratto n-butanolo 40960 µg/ml. Inoltre, una volta ottenuta la stock solution iniziale, sono state

effettuate delle diluzioni scalari degli estratti ottenendo i seguenti range di concentrazione; Decotto (8190-16 $\mu\text{g/ml}$), estratto etanologico (8190-16 $\mu\text{g/ml}$), estratto n-butanolo (40960-320 $\mu\text{g/ml}$).

Microrganismi in esame

Per il saggio, sono stati utilizzati 9 ceppi standard: *E. coli* ATCC 25212, *E. coli* ATCC 35218, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. pneumoniae* ATCC 49619, *C. albicans* ATCC 90028, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019. La MIC è stata determinata mediante la tecnica delle microdiluizioni in brodo, utilizzando piastre per microtitolazione a 96 pozzetti, in conformità alle procedure standardizzate previste dal CLSI. Le micropiastre contenenti inoculo batterico e diluizioni dell'estratto sono state incubate a 37°C per 18-24h; le micropiastre per i miceti, invece, sono state incubate a 35°C per 24-48h. Per i batteri, la MIC è definita come la più bassa concentrazione di sostanza in grado di inibire la crescita microbica visibile ad occhio nudo entro 24h; per i miceti, invece, è definita come la più bassa concentrazione di droga in grado di determinare il 50% di inibizione della crescita microbica entro le 24h. L'estratto n-butanolico ha mostrato un'attività antimicrobica

migliore rispetto agli altri due (EtOH e H₂O), in quanto è risultato attivo sia sui ceppi batterici Gram-positivi e Gram-negativi che sui miceti. L'estratto etanologico ha mostrato, invece, maggiore attività nei confronti di *E. coli* (MIC 5120 µg/ml), *C. krusei* (MIC 2560 µg/ml) e *C. parapsilosis* (MIC 2560 µg/ml). Il decotto, infine, ha mostrato maggiore attività su *S. pneumoniae* (MIC 5120 µg/ml), *E. faecalis* (MIC 5120 µg/ml) e sui miceti testati (MIC 1280 µg/ml).

Eritromicina e ampicillina sono state usate come standard per l'attività antibatterica.⁽⁴⁶⁾

Attività antitumorale

Per valutare l'attività antitumorale si è cercato di determinare l'effetto dell'estratto cloroformico di ramoscelli di *Celtis aetnensis* sui livelli di GSH, di espressione di γ -glutamylcisteina sintetasi, di HO-1 e di caspasi. Tale studio è stato, inoltre, condotto al fine di individuare nuovi meccanismi d'azione implicati nel processo di carcinogenicità; verificare l'ipotesi che la presenza nella dieta di molecole naturali ad attività antiossidante possa contribuire a prevenire e/o contrastare lo sviluppo di neoplasie. Le cellule Caco2 sono state coltivate e mantenute in subconfluenza, quindi staccate con tripsina EDTA (Gibco BRL). Su ogni campione sono stati effettuati i seguenti test: conta delle cellule; MTT test; dosaggio dei livelli di GSH; espressione di HO-1; espressione di γ -GCS espressione di caspasi. Le Caco2 sono una linea immortalizzata di cellule di adenocarcinoma colon-rettale epiteliale umano che, prima di perdere la loro capacità di differenziarsi, si comportano in maniera molto simile alle cellule epiteliali non

cancerose. La linea cellulare iniziale, originariamente ottenuta da un adenocarcinoma del colon umano, nella coltura subisce un processo di differenziazione spontanea che porta alla formazione di un monostrato di cellule che esprimono caratteristiche morfologiche e funzionali degli enterociti umani. Misurazioni elettriche hanno confermato che questi monostrati cellulari sono polarizzati, evidenziando quindi come la loro differenziazione funzionale sia omogenea; infatti esprimono la maggior parte delle caratteristiche di differenziazione terminale delle cellule differenziate dell'epitelio intestinale pur mantenendo, a differenza delle cellule normali, la capacità di proliferare. Le cellule Caco2 sono state coltivate in MEM (Minimal Essential Medium) contenente Fetal Calf Serum al 10%, penicillina/streptomina all'1% in atmosfera di CO₂ al 5% a 37°C. Quando le cellule hanno raggiunto la semi-confluenza, sono state trattate con estratto cloroformico di *C. aetnensis* (5-50-250 µg/ml) per 72h. Alla fine del trattamento, le cellule sono state staccate mediante tripsina-EDTA (GIBCO Brl ®) e centrifugate a 800 g per 15 min a 4°C. Il pellet cellulare,

lavato con PBS, è stato utilizzato per i dosaggi biochimici. La conta delle cellule è stata eseguita esaminando al microscopio 100 μ l di terreno di coltura contenente le cellule e procedendo al conteggio, avvalendosi della camera di Burker. Le cellule sono state contate appena sedimentate; il conteggio è stato eseguito considerando le cellule in 3-4 quadrati, quindi è stata calcolata la media aritmetica ed il valore ottenuto è stato moltiplicato per 10. È stato così ottenuto il numero di cellule contenute per ml di terreno di coltura. L'utilizzo della camera Burker, ha il vantaggio di essere semplice ed economico. Si tratta di uno spesso vetrino munito di una piccola camera, sul fondo della quale sono incise delle griglie. Generalmente, in una camera di emocitometro si depositano circa 10 μ l di sospensione cellulare e si contano le cellule all'interno dei quattro riquadri d'angolo, con l'aiuto di un microscopio con ingrandimento 20x. La conta effettuata viene poi convertita in numero di cellule per cm di sospensione.

La vitalità cellulare è stata misurata attraverso il saggio colorimetrico ai sali di tetrazolio, che valuta la capacità

delle cellule di ridurre, per mezzo della succinico deidrogenasi mitocondriale, il bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) ⁽⁴⁷⁾.

L'MTT penetra nelle cellule e si concentra nei mitocondri, dove è ridotto in un prodotto colorato ed insolubile, il formazano. Per rendere visibile il colore si solubilizzano i granuli colorati di formazano con DMSO. Dopo l'incubazione delle cellule per 3 h, in 5% CO₂ a 37°C, con 20 µl della soluzione di sale di tetrazolio (5 mg/ml), è stato rimosso il surnatante e sono stati aggiunti 100 µl di DMSO. Per ogni campione, sono state effettuate prove in triplo e su ognuna è stata misurata la densità ottica a $\lambda=570$ nm con uno spettrofotometro per micropiastre (Multiskan EX – Thermolab System). La vitalità cellulare è stata espressa come percentuale di densità ottica rispetto al controllo non trattato. Il dosaggio di GSH è stato effettuato su 200 µl di omogenato cellulare sottoposto a sonicazione per 20 secondi. Per la determinazione è stato utilizzando il metodo di Miao-Lin Hu, da noi parzialmente modificato ⁽⁴⁸⁾. Il test si basa sulla misura spettrofotometrica, a $\lambda=412$ nm, del prodotto di riduzione

del cromoforo acido 5, 5' ditiobis-2-nitro benzoico (DTNB) ad opera del GSH. La quantità di GSH presente nei campioni è stata ricavata utilizzando una retta di taratura, ottenuta con quantità note di GSH. I risultati sono stati espressi come nmoli di RSH/mg proteine. Il contenuto in proteine è stato misurato con il metodo di Bradford.⁽⁴⁹⁾ L'espressione di HO-1 nel lisato cellulare è stata determinata usando un Kit ELISA. La quantità di HO-1 presente nei campioni è stata ricavata utilizzando una retta di taratura, ottenuta con quantità note di HO-1. I risultati sono stati espressi come ng di HO-1/mg proteine. Ogni misurazione è stata effettuata tre volte ⁽⁵⁰⁾. L'espressione proteica è stata valutata mediante Western blotting. A tal fine, aliquote di omogenato sono state trattate con l'opportuna concentrazione di una miscela di inibitori delle proteasi Sigma-Aldrich[®] e sottoposte a sonicazione. La quantità del lisato corrispondente a 30 µg di proteine è stata quindi sottoposta ad elettroforesi su SDS-PAGE (10% acrilamide, a 100 volts costanti) usando come "tampone di corsa elettroforetica" una soluzione di Tris base 5 mM contenente glicina 50 mM e sodio-

dodecilsolfato (SDS) 0,02% (p/v). Dopo la corsa elettroforetica, i gel sono stati trasferiti su membrana di nitrocellulosa (Biorad). Le membrane sono state, quindi, marcate con l'anticorpo primario specifico anti α -glutamincisteina sintetasi o anti-caspasi. I complessi Ag-Ab sono stati evidenziati usando anticorpi secondari anti-mouse, anti-goat legati alla perossidasi, mediante kit ECL-plus (Amersham) e lastre autoradiografiche (Kodak). I risultati sono espressi come Unità Arbitrarie (U.A.), normalizzate con actina.

Risultati

Il saggio MTT ha consentito di valutare la vitalità cellulare e di verificare se l'estratto cloroformico di *Celtis aetnensis* influenza la sopravvivenza delle cellule Caco2. Dovendo determinare la concentrazione dell'estratto cloroformico di *Celtis aetnensis* più efficace, le cellule sono state trattate per 72 h a quattro differenti concentrazioni di estratto (5 µg/ml, 50 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml) (fig. 10).

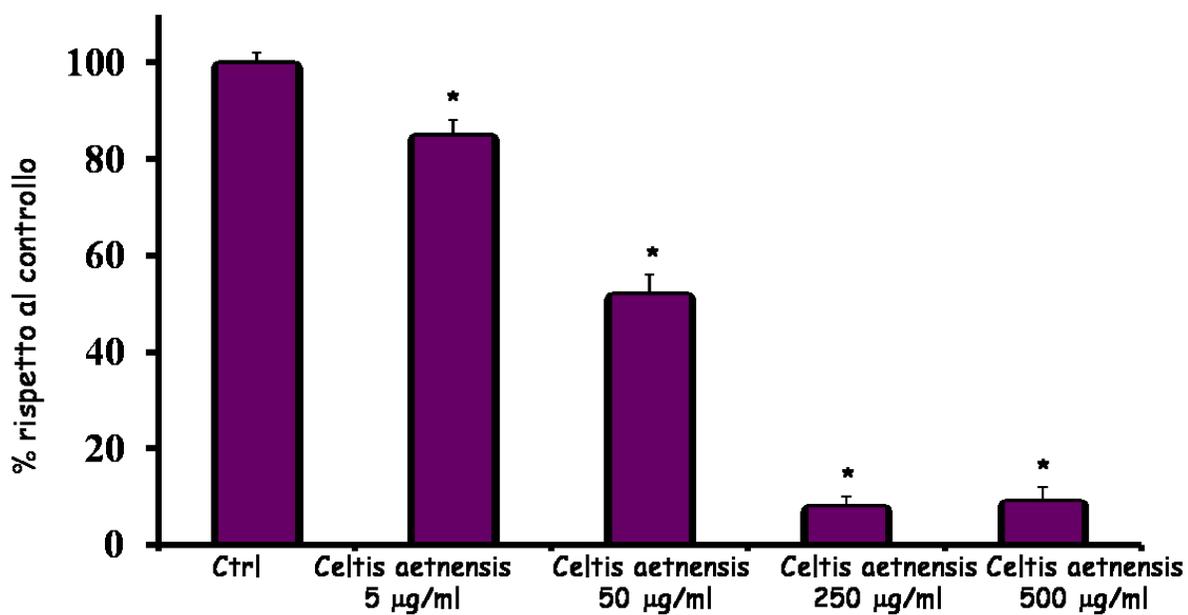


Fig. 10 Determinazione della vitalità cellulare mediante MTT test. Ciascun risultato rappresenta la media \pm D.S. di 4 determinazioni sperimentali. * $p < 0,001$ rispetto al controllo.

E' stato riscontrato che la vitalità cellulare diminuisce significativamente solo alle concentrazioni più elevate dell'estratto cloroformico di *Celtis aetnensis* (50 µg/ml, 250 µg/ml e 500 µg/ml). La vitalità cellulare diminuisce di circa il 15% nelle cellule trattate con una concentrazione di estratto pari 5µg/ml, del 50% in presenza di 50 µg/ml di estratto e del 90% ad una concentrazione di estratto pari sia a 250µg/ml che a 500µg/ml. Sulla base dei risultati ottenuti, gli altri test sono stati eseguiti utilizzando come concentrazione più alta quella di 250µg/ml. Al fine di verificare se la diminuzione di vitalità cellulare, indotta dall'estratto di *Celtis aetnensis*, fosse attribuibile a morte cellulare di tipo necrotico o apoptotico, è stata determinata l'espressione dei livelli di caspasi. Se la morte cellulare è di tipo apoptotico, infatti, si verifica un aumento dell'espressione delle caspasi. I risultati in fig. 11, confermano quanto osservato con l'MTT test; infatti, nelle cellule esposte per 72 h alle concentrazioni di estratto più basse (5 µg/ml), non si è assistito a nessuna espressione di caspasi. L'esposizione alle concentrazioni maggiori (50 e 250

$\mu\text{g/ml}$) invece, ha causato un significativo aumento dell'espressione della caspasi rispetto al controllo (cellule non trattate). Questi risultati confermano che la diminuita vitalità cellulare, osservata nelle cellule trattate con elevate concentrazioni di estratto, possa essere attribuita ad una morte cellulare di tipo apoptotico. Questo dato è molto interessante perché le cellule tumorali non vanno incontro a morte apoptotica, per cui trovare molecole selettive, capaci cioè indurre apoptosi in una cellula neoplastica, apre sicuramente nuovi orizzonti nei trattamenti antineoplastici.

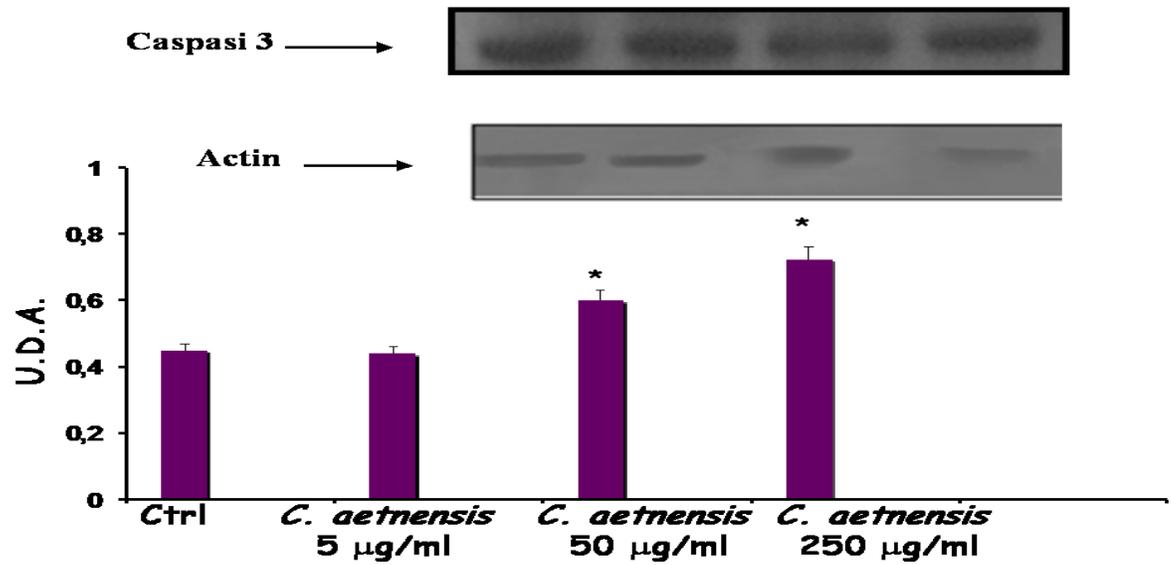


Fig. 11 Espressione di caspasi 3 mediante western blotting. I risultati, espressi in Unità Densitometriche Arbitrarie, sono la media \pm D.S. di 4 determinazioni sperimentali, normalizzati con actina * $p < 0.001$ rispetto al controllo

Da precedenti risultati, è stato evidenziato che il trattamento delle cellule con estratto cloroformico di *Celtis aetnensis* induce un significativo aumento dei livelli di ROS. Questo dato conferma il ruolo dello stress ossidativo nel meccanismo d'azione dell'estratto; in particolare, nelle linee cellulari tumorali Caco2, l'estratto non agisce come antiossidante ma, piuttosto, si comporta come pro-ossidante. Questa duplicità d'azione farebbe presupporre che l'estratto eserciti la sua attività in maniera non diretta, ma che la sua azione sia mediata da altri fattori intracellulari, probabili targets dei ROS. È noto che i principali bersagli molecolari delle specie reattive dell'ossigeno sono le proteine, gli acidi nucleici ed i lipidi che vengono chimicamente danneggiati. I radicali possono però operare attraverso meccanismi più complessi e sofisticati che modulano la crescita cellulare e tumorale attivando meccanismi di trasduzione del segnale che inducono la trascrizione di protooncogeni. È ormai dimostrato che esistono sostanze di origine naturale che contrastano i meccanismi di danno indotti dai radicali ⁽⁵¹⁻
⁵²⁾. Le sostanze definite “antiossidanti”, possono agire sia

in maniera diretta, cioè catturando i radicali liberi, bloccandoli chimicamente ed impedendo che attacchino le molecole biologiche, sia in maniera indiretta, tramite un'azione mediata dallo stato redox cellulare. Una teoria che oggi sta riscontrando valore scientifico suggerisce che gli antiossidanti, non agendo attraverso un meccanismo chimico diretto, ma piuttosto tramite la mediazione delle risposte cellulari, potrebbero avere un effetto pro-ossidante. Al fine di verificare il coinvolgimento del glutathione nell'effetto proossidante indotto dall'estratto di *Celtis aetnensis* nelle cellule tumorali, è stato effettuato il dosaggio dei livelli intracellulari di glutathione. I risultati ottenuti dalla presente ricerca dimostrano che il trattamento delle cellule Caco2 con l'estratto provoca una riduzione dose-dipendente dei livelli intracellulari di GSH. Tale deplezione è del circa 10% e del 70% alle concentrazioni rispettivamente di 50 μ g/ml e 250 μ g/ml (Fig. 12).

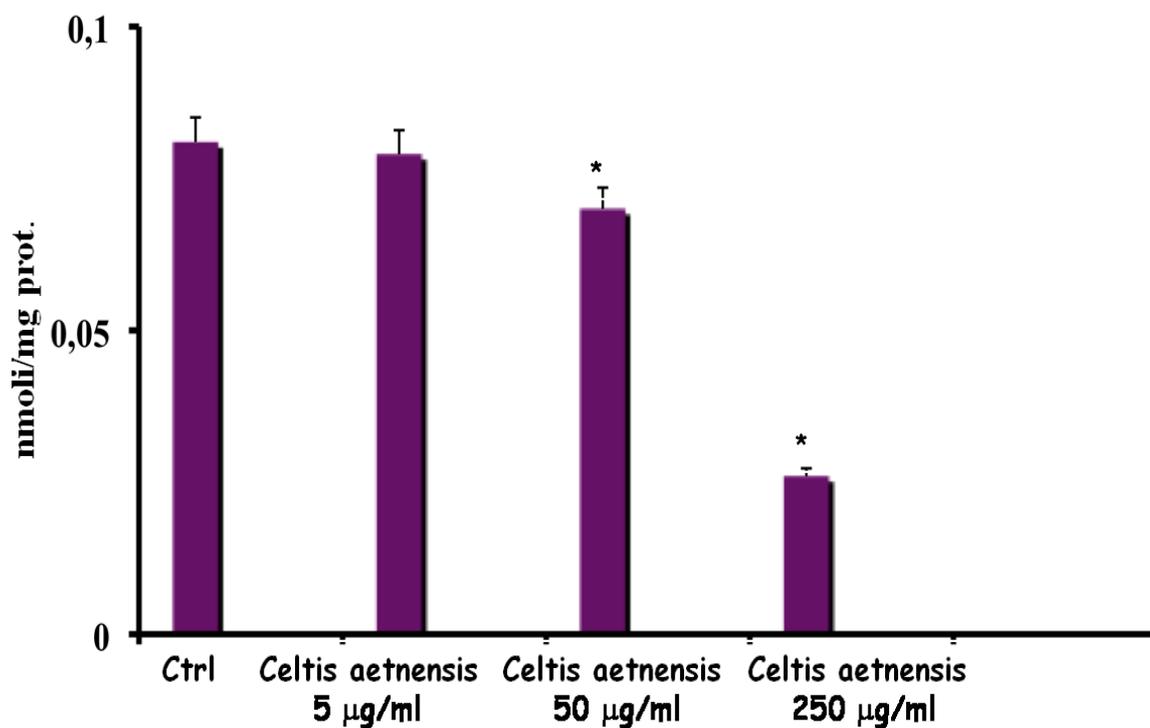


Fig. 12 Livelli intracellulari di GSH. Ciascun risultato rappresenta la media \pm D.S. di 4 determinazioni sperimentali. * $p < 0,001$ rispetto al controllo.

Questi dati confermano l'effetto pro-ossidante esercitato dall'estratto cloroformico di *Celtis aetnensis* nelle cellule tumorali e suggeriscono che la diminuita vitalità cellulare, riscontrata in presenza di tale estratto, possa essere attribuita ad una interferenza della sua componente fenolica e triterpenica, non solo sui sistemi di difesa antiossidanti ma anche sulla complessa rete di segnali implicati nella crescita cellulare. A tal proposito, è importante sottolineare che un ruolo importante nella trasformazione neoplastica è sicuramente giocato anche dai fattori di crescita e dai meccanismi a cascata innescati dall'attivazione dei loro recettori. Molti fattori di crescita stimolano la proliferazione ed il differenziamento delle rispettive cellule bersaglio legandosi a recettori i cui domini C-terminali intracellulari hanno attività tirosina chinasi. L'elevata produzione di ROS è sicuramente un fattore che contribuisce alla carcinogenesi. All'interno di una cellula neoplastica sembrerebbe che il persistente stress ossidativo può essere responsabile dell'attivazione dei pathways dei fattori di crescita e della maggiore resistenza all'apoptosi ⁽⁵³⁾. È stato dimostrato che i ROS

possono agire come secondi messaggeri, stimolando la trasduzione di segnali intracellulari ⁽⁵⁴⁻⁵⁵⁻⁵⁶⁻⁵⁷⁾. Per comprendere ulteriormente il meccanismo d'azione dell'estratto cloroformico, nelle stesse condizioni sperimentali, abbiamo voluto valutare l'espressione di HO-1, uno dei principali meccanismi di difesa cellulare contro lo stress ossidativo. Il ruolo di HO-1 nei tumori ancora non è molto chiaro ⁽⁵⁸⁾. Nella presente ricerca è stato evidenziato che l'estratto di *Celtis aetnensis* a basse concentrazioni (5-50 μ g/ml) riduce l'espressione di HO-1 mentre ad alte concentrazioni (250 μ g/ml) induce un significativo aumento dell'espressione di HO-1 (Fig. 13).

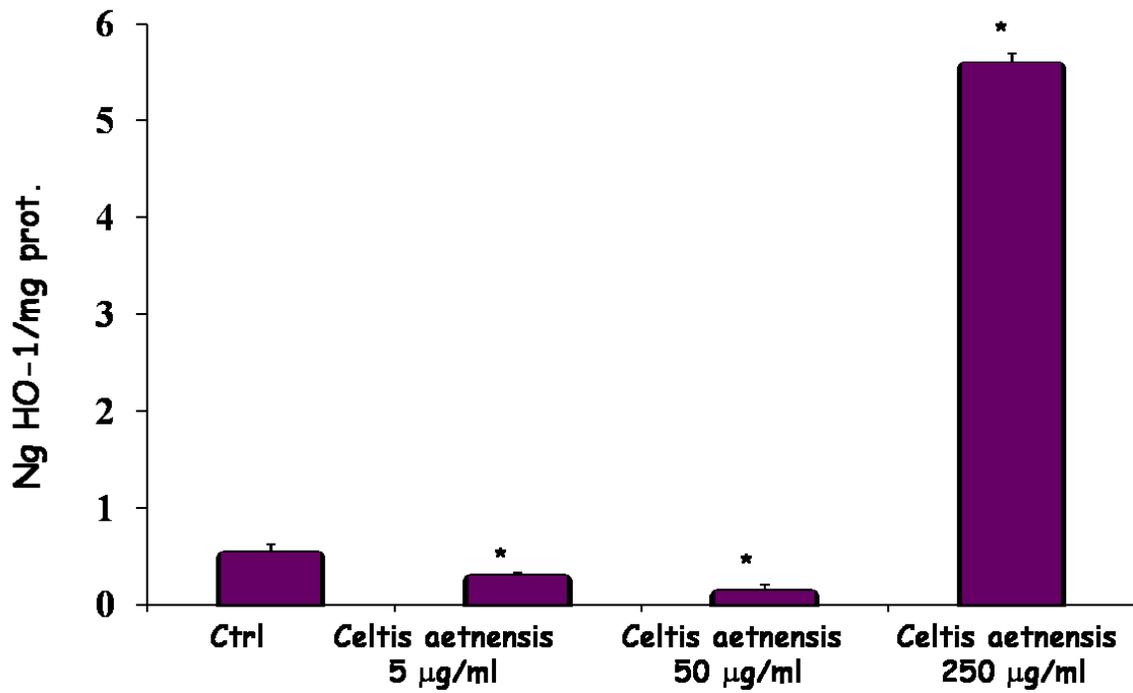


Fig. 13 Espressione di HO-1 mediante Kit Elisa. I risultati, espressi in ng/mg protein, sono la media \pm D.S. di 4 determinazioni sperimentali, normalizzati con actina * $p < 0.001$ rispetto al controllo

Questi risultati confermano la correlazione esistente tra i livelli di GSH e quelli di HO-1, in particolare ad una riduzione dei livelli di GSH corrisponde un aumento dell'espressione di HO-1 ⁽⁵⁹⁾. Il meccanismo dell'effetto citoprotettivo di HO-1 nelle cellule tumorali non è ancora chiaro. Come riportato da studi condotti su carcinoma epatico e al colon, questo effetto protettivo potrebbe essere dovuto all'effetto del CO o all'aumento dei livelli di biliverdina/bilirubina ⁽⁶⁰⁻⁶¹⁾. L'effetto protettivo dell'estratto di *Celtis aetnensis* potrebbe anche essere dovuto alla sua capacità di agire come fattore di trascrizione operante sul promoter della zona denominata ARE. Essi sono presenti in diversi geni che rispondono allo stress ossidativo incluso la γ -glutamylcisteina sintetasi. Dai risultati ottenuti, è possibile poter affermare che l'estratto cloroformico si comporterebbe come un pro-ossidante, probabilmente per una diversa accessibilità/suscettibilità del promotore o, in alternativa, perché queste cellule, in cui HO-1 è già sovraespresso in condizioni basali, non sarebbe in grado di rispondere ad ulteriori stimoli di stress ossidativo. Recentemente è stato

suggerito che il GSH, mediante reazioni di scambio tiolo/disolfuro, possa essere coinvolto nella regolazione redox di questo tipo di segnali ⁽⁶²⁾. In effetti, il GSH è il principale tiolo responsabile del mantenimento dello stato redox intracellulare ed alcuni studi hanno dimostrato che, in alcuni tipi cellulari, è necessario uno specifico livello critico di GSH affinché si verifichi la massima autofosforilazione e l'azione mitogena del recettore per il PDGF, in seguito a stimolazione da parte del suo ligando ⁽⁶³⁾. Per confermare ulteriormente il meccanismo d'azione dell'estratto abbiamo valutato anche l'espressione della γ -GCS. È noto che γ -GCS può essere considerato uno degli enzimi antiossidanti più importanti, poiché è l'enzima limitante la sintesi del glutatione ridotto. La correlazione tra γ -GCS e trasformazione neoplastica è stata evidenziata in diversi modelli sperimentali, in cui la carcinogenesi è stata indotta chimicamente. Tuttavia, i meccanismi alla base dell'elevata espressione di γ -GCS, indotta da trattamenti cancerogeni, non sono affatto chiari ⁽⁶⁴⁾. L'espressione di γ -GCS nelle cellule tumorali può rappresentare un fattore importante nella comparsa di un

fenotipo più aggressivo e resistente. In accordo con questi studi abbiamo osservato che l'espressione di γ -GCS non viene significativamente modificata nelle cellule trattate a tutte le concentrazioni dell'estratto di *Celtis aetnensis* (Fig. 14). Questo fenomeno potrebbe essere correlato con la capacità dell'estratto di agire sulla formazione dei ROS piuttosto che sulla sintesi del glutathione. Dai risultati ottenuti, è possibile confermare che l'estratto cloroformico di *Celtis aetnensis*, inducendo una diminuzione delle difese antiossidanti, rende le cellule tumorali più sensibili al danno ossidativo. Inoltre, un altro importante effetto dell'estratto cloroformico è quello di indurre una morte di tipo apoptotico.

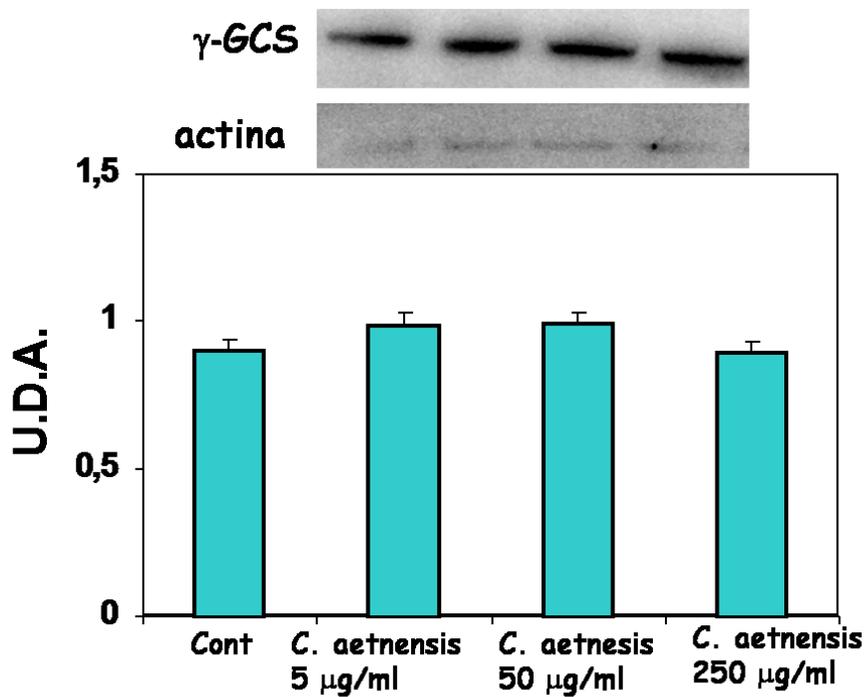


Fig. 14 Espressione di γ -GCS mediante western blotting. I risultati, espressi in Unità Densitometriche Arbitrarie, sono la media \pm D.S. di 4 determinazioni sperimentali, normalizzati con actina * $p < 0.001$ rispetto al controllo

Per quanto riguarda l'attività antimicrobica di *Celtis aetnensis* è stato dimostrato che l'estratto n-butanolico ha mostrato un'attività migliore rispetto agli altri due (EtOH e H₂O), in quanto è risultato attivo sia nei Gram-positivi e Gram-negativi, che sui miceti. L'estratto etanologico ha mostrato, invece maggiore attività verso *E. coli* (MIC 5120), *C. krusei* e *C. parapsilosis* (MIC 2560). Il decotto, infine, ha mostrato maggiore attività sia su *S. pneumoniae* e *E. faecalis* (MIC 5120), che sui miceti testati (MIC 1280).

Le foglie del Bagolaro, vengono utilizzate in medicina tradizionale per la loro azione astringente, rinfrescante e lenitiva che si esplica efficacemente anche nei casi di diarree, enteriti e leggere infezioni intestinali; sono anche utili per mitigare le infiammazione del cavo orale e della gola, tra cui gengiviti e faringiti, mediante l'utilizzo di sciacqui e tecniche di gargarismi ripetuti durante il giorno. Tali proprietà sono determinate dai costituenti attivi presenti nelle foglie quali alcaloidi, flavonoidi, carboidrati, tannini e saponine.

Tabella 1: Attività antimicrobica di *C. aetnensis*

| CEPPO | MIC µg/ml | | |
|-----------------------------------|-----------------------|-------------|----------------|
| | H₂O | EtOH | n-ButOH |
| <i>E. coli</i> ATCC 25212 | 1024 | 512 | 256 |
| <i>E. coli</i> ATCC 35218 | 1024 | 1024 | 512 |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 | 1024 | 1024 | 512 |
| <i>S. aureus</i> ATCC 29213 | 2048 | 1024 | 128 |
| <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 | 512 | 1024 | 512 |
| <i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619 | 512 | 1024 | 512 |
| <i>C. albicans</i> ATCC 90028 | 128 | 1024 | 512 |
| <i>C. krusei</i> ATCC 6258 | 128 | 256 | 128 |
| <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 | 128 | 256 | 256 |

Conclusioni

Nelle cellule viventi l'eccessiva produzione di ROS ha conseguenze negative in quanto può portare ad alterazioni delle caratteristiche funzionali e strutturali di un tessuto vivente inducendo le cellule ad andare incontro ad un processo di morte cellulare. Lo stress ossidativo è dunque il risultato di uno squilibrio tra le difese antiossidanti e le sostanze proossidanti, a favore di quest'ultime. E' stato dimostrato che nell'eziopatogenesi del cancro sono coinvolti anche processi chimici ossidativi, dovuti ad un'eccessiva produzione di ROS ⁽⁶⁵⁾. Oggi è in notevole crescita l'attenzione scientifica sul coinvolgimento chimico dei ROS nel cancro. I tumori, o almeno alcuni di essi, avrebbero origine dismetabolica, con immissione in circolo di abnormi quantità di radicali liberi, che innescherebbe a livello genetico un insieme di meccanismi irreversibili. In questi ultimi anni, nei paesi industrializzati il rischio di ammalarsi di alcuni tipi di tumore è diminuito, mentre l'incidenza globale della malattia è in continuo aumento. Oltre al fumo di tabacco,

vengono chiamati in causa altri elementi, quali le abitudini alimentari non corrette. Una corretta dieta alimentare con un supporto di preparati fitoterapici, infatti, è fonte di sostanze ad attività preventiva nei confronti di tale patologia ⁽⁶⁶⁾. Migliaia di vitamine e di sostanze di diversa natura chimica come polifenoli, flavonoidi, terpeni, contenute nelle piante, sono in grado di aumentare le difese antiossidanti e di indurre fenomeni di attivazione delle difese immunitarie contro microrganismi e cellule tumorali. E' stato dimostrato che la maggior parte degli antiossidanti naturali presenti nella dieta possono agire sia come "*free radical scavengers*", sia come chelanti dei metalli. Queste sostanze naturali, inoltre, dovrebbero indurre le stesse cellule tumorali ad una morte cellulare di tipo apoptotico ⁽⁶⁷⁾. È noto infatti che le cellule neoplastiche non muoiano per apoptosi. Grazie a queste proprietà, la presenza di antiossidanti naturali nella dieta potrebbe contribuire a contrastare gli effetti tossici dei ROS. In medicina tradizionale, alcune specie di *Celtis* sono impiegate per la cura di lombalgie, disturbi gastrici, dolori addominali, nonché per la loro

azione astringente e lenitiva in caso di diarrea, enterite ed infiammazione del cavo orale. Tali proprietà sono principalmente attribuibili ai principi attivi contenuti nelle foglie, quali tannini, saponine, flavonoidi e composti terpenici, sostanze che posseggono attività antiossidante e antitumorale⁽⁶⁸⁻⁶⁹⁾.

Le foglie del bagolaro vengono utilizzate in medicina tradizionale per la loro azione astringente, rinfrescante e lenitiva, che si esplica efficacemente anche nei casi di diarree, enteriti e leggere infezioni intestinali; sono anche utili per mitigare le infiammazioni del cavo orale e della gola, tra cui gengiviti e faringiti, mediante lavaggi e gargarismi ripetuti durante il giorno. Tali proprietà sono determinate dai costituenti attivi presenti nelle foglie, quali alcaloidi, flavonoidi, carboidrati, tannini e saponine. Oggi destano notevole interesse gli effetti protettivi e antiossidanti degli estratti naturali. Studi epidemiologici hanno evidenziato una diretta correlazione tra gli antiossidanti naturali e la bassa incidenza di neoplasie ed una stretta correlazione tra l'apporto di antiossidanti con la dieta e/o con preparati fitoterapici e l'incidenza di

diverse condizioni patologiche di grande diffusione, come alcune forme tumorali e malattie cerebro-vascolari. Nella patogenesi di queste malattie, ha svolto un ruolo preminente lo stress ossidativo, in particolare la perossidazione lipidica, cioè la degradazione ossidativa dei lipidi insaturi, degli steroli delle membrane biologiche e delle lipoproteine.

I risultati conseguiti nella presente ricerca, suggeriscono un'attività oncosoppressiva dell'estratto di *Celtis aetnensis* che può essere attribuita sia alla capacità antiossidante che proossidante dei composti in esso presenti. Infatti, gli aumentati livelli intracellulari di ROS, la significativa riduzione di GSH e la modificazione dei livelli di espressione di HO-1 e di γ -glutamylcisteina sintetasi, riscontrati nelle colture di cellule Caco2 trattate con l'estratto cloroformico, suggeriscono che nelle cellule tumorali l'estratto esercita la sua attività antiproliferativa, interferendo con il complesso sistema di segnalazione intracellulare, spostando l'equilibrio tra fattori anti-apoptotici e pro-apoptotici a favore di questi ultimi. Tutto questo è confermato ulteriormente dalla capacità

dell'estratto di *Celtis aetnensis* di aumentare l'espressione della caspasi. Tali risultati, pertanto, suggeriscono un possibile impiego coadiuvante nella terapia classica antineoplastica. Inoltre, l'estratto n-butanolico potrebbe essere utilizzato in formulazioni per uso topico, in quanto ha mostrato una significativa attività antimicrobica ed antifungina.

BIBLIOGRAFIA

1. Withering W. An account of the foxglove, and some of its medical uses with practical remarks on dropsy, and other diseases. M. Swinnney, Birmingham, 1785.
2. Unione Europea. Direttiva 2004/24/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 31/3/2004 concernente la modifica, per quanto riguarda i medicinali vegetali tradizionali, della Direttiva 2001/83/CE recante un codice comunitario relativo ai medicinali per uso umano. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea L 136/85, 30 aprile 2004.
3. De Smet PAGM. Herbal remedies. N Engl J Med 2002;347: 2046-56.
4. D'Antuono L. F., Galletti G. C., Bocchini P., 2000. Variability of essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. populations from a North Mediterranean area (Liguria region, Northern Italy). Annals of botany, 86:471-478.

5. Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E., 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161:839-851.

6. Roberts M., F., and Wink M., 1998. *Alkaloids: biochemistry ecology and medicinal application*. Plenum, New York, 1486 pp, Chapter Introduction, 1-7.

7. Figueiredo C. A., Barroso J. Pedro L. G., Scheffer J. J.C., 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*. 23(12): 213-226.

8. Catizone P., Marotti, M., Toderi G., Tètènyi P. 1986. *Coltivazione delle piante medicinali e aromatiche*. Patron editore, 199-209.

9. Tepe B, Daferera D, Sokmen M, Polissiou M, Sokmen A: 2004. In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eigi* M. Zohary et P.H. Davis. *Journal of Agriculture Food Chemistry* , 52:1132-1137.

10. Sylvestre M., Pichette A., Longtin A., Nagau F., Legault J., 2006. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. *Journal of Ethnopharmacology* , 103:99-102.

11. Faid M., Bakhy K., Anchad M., Tantaoui-Elaraki A., 1995. Alomond paste: Physicochemical and microbiological characterizations and preservation with sorbic acid and cinnamon. *Journal of Food Production*, 58:547-550.

12. Shaw D., Annett J. M., Doherty B., Leslie J. C., 2007. Anxiolytic effects of lavender oil inhalation on open-field behaviour in rats. *Phytomedicine*, 14 (9):613-620.

13. Ben Arfa, S. C., Preziosi-Belloy L., Gontard N., Chalier P.; 2005. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical Structure. *Letters in Applied Microbiology*, 43:49-154.

14. Mourey A., N. Canillac 2002. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control* 13:289–292.

15. Bishop C. D., 1995. Antiviral activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel (tea tree) against tobacco mosaic virus. *Journal of Essential Oil Research* 7:641-644

16. Ultee A., Kets E. P. W., Alberda M., Hoekstra F. A., and Smith E. J., 2000. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology*, 174:233-238.

17. Pessoa L. M., Morais S. M., Bevilaqua C. M. L. and Luciano J. H. S., 2002. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 109, (16):59-63.

18. Karpouhtsis I., Pardali E., Feggou E., Kokkini S., Scouras Z. G., Mavragani- Tsipidou P., 1998. Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 46:1111-1115.

19. Mahmoud S. S., Croteau R. B., 2001. Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint

by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. Proceedings of the National Academy of the Sciences U S A, 31,98 (16):8925-8927.

20. Marongiu, B., Porcedda, S., Piras, A. and Falconieri, D., (2012). Traditional and Modern Methods for the Preparation of Essential Oils. In: *Essential Oils as Natural Food Additives*. Editor Luca Valgimigli. Nova Science Publisher, Inc. ISBN 978-1-62100-241-3.

21. ARPAC – Laboratorio Biomonitoraggio Aria – Dipartimento Provinciale di Napoli.

22. But P.P., Kimura T., Guo J.X., Sung C. K.. International collation of traditional and folk medicine: Part 2. World scientific, Singapore. (1997), 22-23.

23. K. Dae Keun, L. Jong Pil, K. Jin Wook, P. Hee Wook, E. Jae Soon, Arch. Pharm. Res. (2005), 28, 39-43.

24. Hwange B.Y, Chai H.B., Kardono L.B.S., Riswan S., Farnsworth N.R., Cordell G.A., Pezzuto J.M., Kinghorn A.D., Phytochemistry (2003), 62, 197-201.

25. Samaniego Sánchez C., Troncoso González A. M., García-Parrilla M.C, Quesada Granados J. J., López García de la Serrana H., López Martínez M. C. (2007). Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Analytical Chim. Acta* 593: 103-107.

26. Laguerre L., Lecomte J., Villeneuve P. Evaluation of the ability of antioxidant to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research* 46 (2007) 244-282.

27. Hong-Yu Zhang, Da.Peng Yang, guang-Yan Tang *Multipotent antioxidants: from screening to design* Drug Discovery Today 2006 (11) 749-754.

28. Ji Li Li *Antioxidant and Oxidative Stress in Exercise* Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 1999 (222) 283-290.

29. Spiteller G., Peroxyl radicals: inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products. *Free Radic. Biol. Med.* (2006), 1,362-87.

30. Veeraraghavan J., Natarajan M., Herman T.S., Aravindan N. Curcumin-altered p53-response genes regulate radiosensitivity in p53-mutant Ewing's sarcoma cells. *Anticancer Res.* (2010), *30*, 4007-15.
31. Yoshida T, Kikuchi G. Purification and properties of heme oxygenase from pig spleen microsomes. *J Biol Chem.* 1978 Jun 25;253(12):4224-9.
32. Goodman AI, Choudhury M, da Silva JL, Jiang S, Abraham NG. Quantitative measurement of heme oxygenase-1 in the human renal adenocarcinoma. *J Cell Biochem.* 1996;63(3):342-8.
33. Yoshinaga T, Sassa S, Kappas A. The oxidative degradation of heme c by the microsomal heme oxygenase system. *J Biol Chem.* 1982 Jul 10;257(13):7803-7.
34. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin. *J Lab Clin Med.* 1970 Mar;75(3):410-21.
35. Kappas A, Drummond GS. Control of heme metabolism with synthetic metalloporphyrins. *J Clin Invest.* 1986 Feb;77(2):335-9.

36. Maines MD, Ibrahim NG, Kappas A. Solubilization and partial purification of heme oxygenase from rat liver. *J Biol Chem.* 1977 Aug 25;252(16):5900-3.
37. Yoshida T, Kikuchi G. Sequence of the reaction of heme catabolism catalyzed by the microsomal heme oxygenase system. *FEBS Lett.* 1974 Nov 15;48(2):256-6.
38. Yoshinaga T, Sassa S, Kappas A. Purification and properties of bovine spleen heme oxygenase. Amino acid composition and sites of action of inhibitors of heme oxidation. *J Biol Chem.* 1982 Jul 10;257(13):7778-85.
39. Acquaviva, R., Campisi, A., Murabito, P., Raciti, G., Avola, R., Mangiameli, S., Musumeci, I., Barcellona, M.L., Vanella, A., Li Volti G. Propofol attenuates peroxynitrite mediated DNA damage and apoptosis in cultured astrocytes: an alternative protective mechanism *Anaesthesiology* . (2004), *101*, 1363-1371.
40. Maines MD, Veltman JC. Phenylhydrazine-mediated induction of haem oxygenase activity in rat liver and kidney and development of

- hyperbilirubinaemia. Inhibition by zinc-protoporphyrin. *Biochem J.* 1984 Jan 15;217(2):409-17.
41. Kikuchi G, Yoshida T. Function and induction of the microsomal heme oxygenase. *Mol Cell Biochem.* 1983;53-54(1-2):163-83.
42. Camhi SL, Alam J, Wiegand GW, Chin BY, Choi AM. Transcriptional activation of the HO-1 gene by lipopolysaccharide is mediated by 5' distal enhancers: role of reactive oxygen intermediates and AP-1. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998 Feb;18(2):226-34.
43. Cantoni L, Rossi C, Rizzardini M, Gadina M, Ghezzi P. Interleukin-1 and tumour necrosis factor induce hepatic haem oxygenase. Feedback regulation by glucocorticoids. *Biochem J.* 1991 Nov 1;279:891-4.
44. Rizzardini M, Terao M, Falciani F, Cantoni L. Cytokine induction of haem oxygenase mRNA in mouse liver. Interleukin 1 transcriptionally activates the haem oxygenase gene. *Biochem J.* 1993 Mar 1;290 (Pt 2):343-7.

45. Taha S. El-Alfy, Hamida M. A. El-Gohary, Nadia M. Sokkar, Mohammed Hosny, and Dalia A. Al-Mahdy. A New Flavonoid C-Glycoside from *Celtis australis* L. and *Celtis occidentalis* L. Leaves and Potential Antioxidant and Cytotoxic Activities. *Sci Pharm.* 2011 December; 79(4): 963–975.

46. R. Badoni, D. K. Semwal, and U. Rawat. Fatty Acid Composition and Antimicrobial Activity of *Celtis australis* L. Fruits. *J. Sci. Res.* 2 (2), 397-402 (2010).

47. Acquaviva R., Campisi A., Murabito P., Raciti G., Avola R., Mangiameli S., Musumeci I., Barcellona M.L., Vanella A., Li Volti G. Propofol attenuates peroxynitrite mediated DNA damage and apoptosis in cultured astrocytes: an alternative protective mechanism *Anaesthesiology.* (2004), 101, 1363-1371.

48. Di Giacomo C., Acquaviva R., Sorrenti V., Vanella A., Grasso S., Barcellona M.L., Galvano F., Vanella L. and Renis M., Oxidative and antioxidant status in plasma of runners: effect of oral supplementation with natural antioxidants. *J. Med. Food.* (2009), 12, 145-150.

49. Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing

the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* (1976), 72, 248-254.

50. Li Volti G., Galvano F., Frigiola A., Guccione S., Di Giacomo C., Forte S., Tringali G., Caruso M., Adekoya O.A., Gazzolo D.: Potential immunoregulatory role of heme oxygenase-1 in human milk: a combined biochemical and molecular modeling approach. *J. Nutr. Biochem.* (2010), 21, 865-71.

51. Russo A., Acquaviva R., Campisi A., Sorrenti V., Di Giacomo C., Virgata G., Barcellona M.L, Vanella A.. II Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and Dna cleavage protectors. *Cell Biol. And Toxicology.* (2000), 16, 91-98.

52. Acquaviva R., Iauk L., Sorrenti V., Lanteri R., Santangelo R., Licata A., Licata F., Vanella A., Malaguarnera M., Ragusa S., Di Giacomo C., Oxidative profile in patients with colon cancer: effects of *Ruta chalepensis* L. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* (2011), 15, 181-191.

53. Brown N.S., Bicknell R., Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. *Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer.* *Breast Cancer Res.* (2001), 3, 323-327.

54. Bae Y.S., Kang S.W., Seo M.S., Baines I.C., Tekle E., Chock P.B., Rhee S.G. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* (1997), *272*, 217-221.

55. Hardwick J. S. and Sefton B. M. The Activated Form of the Lck Tyrosine Protein Kinase in Cells Exposed to Hydrogen Peroxide Is Phosphorylated at Both Tyr-394 and Tyr-505. *The Journal of Biological Chemistry*. (1997), *272*, 25429-25432.

56. Sundersan M., Yu Z.-X., Ferrans V. J., Irani K. and Finkel T. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*. (1995), *270*, 296–299.

57. Devary Y., Gottlieb R. A., Smeal T. & Karin M. The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of Src tyrosine kinases. *Cell*. (1992), *71*, 1081–1091.

58. Jozkowicz A., Was H., Dulak J. Heme Oxygenase-1 in Tumors: Is It a False Friend?: *Antioxid Redox Signal*. (2007), *9(12)*, 2099–2118.

59. Di Giacomo C, Acquaviva R, Piva A, Sorrenti V, Vanella L, Piva G, Casadei G, La Fauci L, Ritieni A, Bognanno M, Di Renzo L, Barcellona ML, Morlacchini M, Galvano F. Protective effect of cyanidin 3-O-beta-D-glucoside on ochratoxin A-mediated damage in the rat. *Br J Nutr.* 2007 Nov;98(5):937-43.

60. Nakasa K., Kitayama M., Fukuda H., Kimura K., Yanagawa T., Ishii T., Nakashima K., Yamada K.. Oxidative stress-related proteins A170 and heme oxygenase-1 are differently induced in the rat cerebellum under kainate-mediated excitotoxicity. *Neurosci Lett* (2000), 282, 57–60.

61. Busserolles J., Megias J., Terencio M.C., Alcaraz M.J.. Heme oxygenase-1 inhibits apoptosis in Caco-2 cells via activation of Akt pathway. *Int J Biochem Cell Biol.* (2006), 38,1510–1517.

62. Iwata S., Hori T., Sato N., Ueda-Taniguchi Y., Yamabe T. Thiol-mediated redox regulation of lymphocyte proliferation. Possible involvement of adult T cell leukemia-derived factor and glutathione in transferrin receptor expression. *J Immunol.* (1994), 152, 5633-5642.

63. Rigacci S., Iantomasi T., Marraccini P., Berti A., Vincenzini M.T. e Ramponi G.. Evidence for glutathione

involvement in platelet-derived growth-factor-mediated signal transduction. *Biochem. J.* (1997), *324*, 791–796.

64. Rvinen K.R., Soini Y., Kahlos K., Kinnula V.L., Overexpression of γ -Glutamylcysteine Synthetase in human malignant mesothelioma. *Human Pathol.* (2002), *33*, 748-755.

65. Ohshima, H., Tatemichi, M., Sawa, T., Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* (2003), *417*, 3-11.

66. Reddy, L., Odhav, B., Bhoola, K.-D., Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacol. Ther.* (2003), *99*, 1–13.

67. Tretiakova I., Blaesius D., Maxia L., Wesselborg S., Schulze-Osthoff K., Cinatl Jr J., Michaelis M., Werz O.. Myrtucommulone from *Myrtus communis* induces apoptosis in cancer cells via the mitochondrial pathway involving caspase-9. *Apoptosis.* (2008), *31*, 119-131.

68. K. Dae Keun, L. Jong Pil, K. Jin Wook, P. Hee Wook, E. Jae Soon, *Arch. Pharm. Res.* (2005), *28*, 39-43.

69. Hwange B.Y, Chai H.B., Kardono L.B.S., Riswan S., Farnsworth N.R., Cordell G.A., Pezzuto J.M., Kinghorn A.D., *Phytochemistry* (2003), *62*, 197-201.