

# ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Workshop

## **“Sostanze naturali: attività farmacologica, meccanismo d’azione, aspetti applicativi e normativi”**

Istituto Superiore di Sanità  
Roma, 26 giugno 2008

**Atti**

A cura di  
Andrea Geraci (a), Francesca Mondello (b) e Annarita Stringaro (c)

*(a) Dipartimento del Farmaco*

*(b) Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate*

*(c) Dipartimento di Tecnologie e Salute*

ISSN 1123-3117

**Rapporti ISTISAN**

**08/41**

Istituto Superiore di Sanità

**Workshop. “Sostanze naturali: attività farmacologica, meccanismo d’azione, aspetti applicativi e normativi”.**  
**Istituto Superiore di Sanità. Roma, 26 giugno 2008. Atti.**

A cura di Andrea Geraci, Francesca Mondello e Annarita Stringaro  
2008, iii, 118 p. Rapporti ISTISAN 08/41

Questo incontro sulle sostanze naturali è stato organizzato dal gruppo di studio Terapie Innovative e Sostanze Naturali (TISNa) dell’Istituto Superiore di Sanità (ISS). L’obiettivo principale è stato quello di sviluppare un momento scientifico finalizzato allo scambio di informazioni nell’ambito delle più recenti ricerche sulle sostanze naturali e sul loro impatto sulla salute pubblica. A questo evento ha contribuito un numero elevato di ricercatori appartenenti a diversi Dipartimenti e Centri dell’ISS, con competenze in diverse aree di ricerca. Particolare attenzione è stata rivolta alla ricerca di base, come l’attività farmacologica e i meccanismi di azione di alcune sostanze di origine vegetale e animale. Sono stati poi affrontati gli aspetti regolatori, clinici ed etici implicati nell’impiego terapeutico nell’uomo delle sostanze naturali.

*Parole chiave:* Prodotti naturali, Sostanze vegetali, Effetti farmacologici, Immunomodulatori, Sostanze antinfiammatorie, Sostanze antitumorali, Sostanze antinfettive, Aspetti etici

Istituto Superiore di Sanità

**Workshop. “Natural substances: pharmacological activities, mechanism of action, regulatory aspects”.** Istituto Superiore di Sanità. Rome, June 26, 2008. Proceedings.

Edited by Andrea Geraci, Francesca Mondello and Annarita Stringaro  
2008, iii, 118 p. Rapporti ISTISAN 08/41

This workshop was organized by the Study Group Innovative Therapies and Natural Substances (TISNa) of the Istituto Superiore di Sanità (ISS). The primary goal of the workshop was to provide a scientific forum to discuss the recent progresses in different research fields on the natural substances and the impact of their large use on public health. Numerous researchers working in different Departments and Centres of ISS contributed to this meeting, with their competences in different research fields. Special attention was turned to the pharmacological activity and the mechanisms of action of some substances of vegetable and animal origin. Then the regulatory, clinical and ethical aspects were faced.

*Key words:* Natural products, Herbal preparation, Pharmacologic effects, Immunomodulators, Antinflammatory agents, Antineoplastic drugs, Antinfective agents, Ethical issues

Si ringraziano: Alessia Caratelli, Veronica Bizzotti, Daniela Casale, Valerio Occhiodoro, Marzia Palmieri del Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate e Ilaria Itró del Dipartimento del Farmaco per l’organizzazione generale del workshop.

Per informazioni su questo documento scrivere a: [andrea.geraci@iss.it](mailto:andrea.geraci@iss.it), [francesca.mondello@iss.it](mailto:francesca.mondello@iss.it), [annarita.stringaro@iss.it](mailto:annarita.stringaro@iss.it)

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: [www.iss.it](http://www.iss.it).

Citare questo documento come segue:

Geraci A, Mondello F, Stringaro A. *Workshop. “Sostanze naturali: attività farmacologica, meccanismo d’azione, aspetti applicativi e normativi”.* Istituto Superiore di Sanità. Roma, 26 giugno 2008. Atti. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2008. (Rapporti ISTISAN 08/41).

---

Presidente dell’Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*  
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*  
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2008

# INDICE

<b>Prefazione</b> .....	iii
<i>Antonio Cassone, Velio Macellari, Stefano Vella</i>	
<b>Introduzione</b> .....	1
<hr/>	
<b>I SESSIONE - Sostanze vegetali</b> .....	3
<b>Droghe vegetali</b> .....	5
<i>Elena Federici, Giuseppina Multari</i>	
<b>Studio di sostanze naturali con attività terapeutica da piante della medicina tradizionale</b> .....	10
<i>Giovanna Palazzino</i>	
<b>Studi quali-quantitativi di piante di uso consolidato</b> .....	17
<i>Francesca Romana Gallo</i>	
<b>La voacamina: alcaloide vegetale con attività citotossica e chemio-sensibilizzante in cellule tumorali <i>in vitro</i></b> .....	20
<i>Stefania Meschini, Maria Condello, Annarica Calcabrini, Manuela Marra, Giuseppe Formisano, Pasquale Lista, Elena Federici, Giuseppe Arancia</i>	
<b><i>Ocimum basilicum</i> e metabolismo lipidico</b> .....	24
<i>Elena Bravo, Giovanna Palazzino, Fiorella Ciaffoni, Bruno Gallinella, Vincenza Papa, Souliman Amrani, Mariarosaria Napolitano</i>	
<b>Studio dell'attività antinfiammatoria della curcumina verso <i>toxoplasma gondii</i> e controllo della toxoplasmosi congenita</b> .....	32
<i>Maria Cristina Angelici, Andrea Matteucci, Serena Celani, Fiorella Malchiodi-Albedi</i>	
<b>Modelli sperimentali nella ricerca di nuovi analgesici e antinfiammatori di origine vegetale</b> .....	40
<i>Mariantonella Colucci, Marica Matriota, Amalia Di Giannuario, Stefano Pieretti</i>	
<hr/>	
<b>II SESSIONE - Olio essenziale di <i>Melaleuca alternifolia</i> (tea tree oil)</b> .....	43
<b>Studi preclinici sull'attività antifungina dell'olio essenziale di <i>Melaleuca alternifolia</i> (tea tree oil) e del suo principale componente terpinen-4-olo</b> .....	45
<i>Francesca Mondello, Flavia De Bernardis, Antonietta Girolamo, Giuseppe Salvatore, Antonio Cassone</i>	
<b>Studio del meccanismo di azione del tea tree oil su ceppi di <i>Candida</i> spp.</b> .....	49
<i>Marisa Colone, Nicolina Mastrangelo, Laura Toccaceli, Francesca Mondello, Antonietta Girolamo, Giuseppe Arancia, Antonio Cassone, Annarita Stringaro</i>	

<b>Attività <i>in vitro</i> dell'olio essenziale di <i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel (tea tree oil) in fase liquida e gassosa nei confronti di <i>Legionella pneumophila</i></b> .....	53
<i>Maria Luisa Ricci, Antonietta Girolamo, Maria Scaturro, Stefano Fontana, Federica Pinci, Francesca Mondello</i>	
<b>Effetti del tea tree oil e del suo componente attivo terpinen-4-olo su cellule di melanoma umano</b> .....	56
<i>Annarica Calcabrini, Annarita Stringaro, Laura Toccaceli, Marisa Colone, Stefania Meschini, Manuela Marra, Marco Diociaiuti, Cristiano Giordani, Francesca Mondello, Giuseppe Arancia, Agnese Molinari</i>	
<hr/>	
<b>III SESSIONE - Sostanze di origine animale</b> .....	63
<b>Attività antimicrobica della lattoferrina</b> .....	65
<i>Fabiana Superti</i>	
<b>Effetti immunomodulatori della lattoferrina sulle cellule della risposta innata</b> .....	71
<i>Patrizia Puddu, Maria Carollo, Daniela Latorre, Piera Valenti, Filippo Belardelli, Sandra Gessani</i>	
<b>Attività immunomodulatoria e metabolismo della vitamina D3 in cellule dendritiche umane</b> .....	74
<i>Maria Cristina Gauzzi, Cristina Purificato, Isabella Sanseverino, Filippo Belardelli, Sandra Gessani</i>	
<hr/>	
<b>IV SESSIONE - Aspetti applicativi e normativi</b> .....	79
<b>Ricerca di sostanze naturali per interventi preventivi e terapeutici in acquacoltura</b> .....	81
<i>Emilio Guandalini, Cristiana Boros</i>	
<b>Prodotti di natura vegetale in Italia e nella Comunità europea: aspetti normativi</b> .....	91
<i>Maria Francesca Cometa</i>	
<b>Alcuni aspetti di etica nella sperimentazione e nell'utilizzo di terapie naturali e alternative</b> .....	109
<i>Carlo Petrini</i>	
<b>Uso clinico delle sostanze naturali: alcune considerazioni</b> .....	115
<i>Andrea Geraci</i>	

## PREFAZIONE

Negli ultimi anni l'interesse per le attività biologiche delle sostanze di origine naturale è in progressiva crescita e questo non può non attrarre l'attenzione degli enti di ricerca e dei loro rispettivi programmi. Infatti, è sotto gli occhi di tutti un aumento da parte della popolazione dell'utilizzo di integratori alimentari e di varie sostanze a base di prodotti di origine naturale che spesso non sono né standardizzati, né studiati per tutte le loro possibili conseguenze e azioni sia benefiche che avverse. Si deve ricordare in questo contesto che molti farmaci, straordinariamente attivi sui vari apparati organici, sono stati estratti da piante o comunque da altre sostanze naturali ma, di converso, i più potenti composti ad azione allergica e comunque tossici sono spesso presenti in dette sostanze. Questo invoca la necessità di uno studio accurato, su basi sperimentali e con rigoroso metodo scientifico, delle sostanze naturali, con la prospettiva di integrare e anche sostituire farmaci di sintesi caratterizzati dai ben noti effetti collaterali e di elevato costo economico. Non solo queste ragioni, ma anche la progressiva penuria di farmaci antimicrobici, con l'associata e crescente farmacoresistenza e lo scarso coinvolgimento delle grandi industrie nei farmaci orfani, stanno facendo da volano a nuovi trattamenti basati sulla facilità della prescrizione e sulla moderazione dei costi, oltre che su un'idea di rapporto ottimale con la natura. Tutto questo per essere scientificamente accettabile richiede la massima attenzione dei ricercatori nel portare gli studi di queste sostanze nella traccia rigorosa dell'impegno sperimentale.

I ricercatori dell'Istituto Superiore di Sanità sono qualificati per stare in prima linea in questo nuovo approccio per le loro competenze e per la capacità di adottare il metodo scientifico a beneficio della salute pubblica, senza chiudere gli occhi di fronte alle novità e alla giusta "fantasia" negli approcci alla ricerca, ma con spirito costruttivo e con rigore metodologico. Perciò plaudiamo a questa iniziativa dei ricercatori dell'ISS nel cercare e condividere uno spazio di ricerca e riflessione dedicato totalmente alle sostanze naturali, con l'idea di trovare in esse innovazioni terapeutiche e preventive atte a migliorare la nostra risposta al bisogno di salute, oltre a soddisfare le personali curiosità scientifiche che rimangono alla base del nostro mestiere.

Antonio Cassone  
*Direttore del Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate*

Velio Macellari  
*Direttore del Dipartimento di Tecnologie e Salute*

Stefano Vella  
*Direttore del Dipartimento del Farmaco*



## INTRODUZIONE

Questo volume raccoglie tutti i contributi orali presentati il 26 giugno 2008 in occasione del workshop dal titolo “Sostanze naturali: attività farmacologica, meccanismo di azione, aspetti applicativi e normativi”, tenutosi presso l’Istituto Superiore di Sanità. Questo primo incontro è stato organizzato dal Gruppo di Studio “Terapie Innovative e Sostanze Naturali” (TISNa) che si è costituito spontaneamente nel marzo 2008 e al quale hanno aderito ricercatori afferenti a tutti i Dipartimenti e alla maggior parte dei Centri dell’ISS.

Il Gruppo di Studio TISNa è nato dall’esigenza di incentivare lo scambio di informazioni relative alle ricerche in corso sulle sostanze naturali, tenendo conto delle diverse competenze presenti all’interno del nostro Istituto e avendo come obiettivo principale, quello di stimolare la nascita di future collaborazioni e l’elaborazione di comuni progetti di ricerca fra i gruppi dell’ISS. Il Gruppo TISNa, inoltre, si propone di interagire con le altre strutture di ricerca presenti nel nostro Paese, interessate all’impiego delle sostanze naturali, nonché con le istituzioni sanitarie regionali come le Aziende Sanitarie Locali (ASL) e le strutture ospedaliere, che già utilizzano la fitoterapia come terapia complementare a quella tradizionale.

La nascita di un gruppo di studio di tal genere è stato un evento quasi obbligato, tenendo conto che oramai il mondo scientifico sta considerando i prodotti naturali quale potenziale approccio terapeutico alternativo e/o sinergico per il trattamento di alcune patologie croniche e acute; si è alla ricerca soprattutto di nuove sostanze e/o molecole sicure ed efficaci contro il dolore, l’infiammazione o quelle con attività antimicrobica, antitumorale o immunomodulante. Ricordiamo che molti dei farmaci in commercio sono derivati di sostanze naturali, come ad esempio molti antibiotici, alcuni antitumorali, vari cardiotonici ecc. Anche in diversi Dipartimenti del nostro Istituto, si utilizzano da diverso tempo nell’ambito dell’attività di ricerca, le sostanze naturali, sia di origine vegetale che animale. I risultati attuali e futuri possono avere un importante impatto sulla salute pubblica, offrendo indicazioni utili per l’ottimizzazione dell’impiego terapeutico di alcuni “farmaci naturali”. In particolare nell’ambito delle sostanze vegetali, le ricerche in corso potranno fornire, partendo dalla valutazione delle attività biologiche del fitocomplesso e dall’identificazione dei principali componenti attivi, basi utili per la sperimentazione di nuove sostanze usate sia singolarmente che in combinazione con farmaci già impiegati nella pratica clinica.

L’incontro del 26 giugno scorso ha quindi rappresentato per il nostro Istituto l’occasione per approfondire alcuni aspetti dell’argomento “sostanze naturali”. Le relazioni presentate hanno affrontato sia le problematiche scientifiche (attività farmacologica, meccanismi di azione), sia gli aspetti applicativi (essenzialmente empirici), normativi (in parte ancora carenti) ed etici legati all’impiego delle sostanze naturali.

*I curatori del Rapporto*



**I SESSIONE**

**Sostanze vegetali**



# DROGHE VEGETALI

Elena Federici, Giuseppina Multari  
*Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## Introduzione

Quando parliamo di droga vegetale, ci riferiamo alla pianta medicinale o parte di essa (radici, foglie, semi, corteccia) che si utilizza per scopi terapeutici in quanto contiene, oltre a sostanze di nullo o scarso interesse applicativo, composti chimici capaci di esplicare un'azione farmacologica (principi attivi).

Tale definizione concorda con l'OMS, Organizzazione Mondiale della Sanità, che asserisce che droghe e piante medicinali "sono quelle che comunque introdotte o messe a contatto con un organismo umano o animale, svolgono in esso un'attività farmacologicamente blanda".

Nel mondo delle sostanze naturali sono migliaia le droghe semplici o in miscele che sono impiegate come strumenti complementari o alternativi a terapie convenzionali.

Le "medicine complementari" sono tutte quelle pratiche sanitarie che non fanno parte della tradizione di un dato paese e che quindi non sono integrate nel sistema sanitario dominante.

Le "medicine naturali" in particolare sono tutte le preparazioni a base vegetale, animale e/o minerale.

Le "medicine tradizionali" rappresentano l'insieme delle conoscenze, pratiche, metodi, e credenze di varie popolazioni, basate su osservazioni ed esperienze, trasmesse di generazione in generazione, atte a prevenire ed eliminare squilibri fisici, mentali e sociali per mantenere il benessere dei singoli individui.

Nel 2004 a cura della Regione Lombardia l'OMS ha emesso delle linee guida sull'uso della medicina tradizionale, complementare e alternativa come supporto tecnico ai singoli stati sul consumo e l'uso adeguato di tali medicine (1).

## Storia

Le piante, impiegate come cure alternative o complementari, sono state e sono oggetto di continuo studio per la ricerca di fitocomplessi o singole molecole dotate di una qualche attività terapeutica, infatti, dal loro uso tradizionale, valido ma non sufficiente, attraverso screening fitochimico e biologico, si è cercato e si cerca di ottenere positivi, concreti e sicuri risultati terapeutici.

Le proprietà terapeutiche di molte piante sono tradizionalmente note agli uomini che, fin dai primordi della civiltà, non avendo a disposizione nessun altro rimedio "terapeutico", le hanno utilizzate sulla base d'osservazioni, esperienze e coincidenze come "erbe curative" e come tali ci sono state tramandate.

Nella storia più recente, da Ippocrate, padre della moderna medicina, fino ad arrivare al Medio Evo, si assiste al progredire della fitoterapia grazie anche all'influenza araba che introduce in questo periodo la coltivazione e il commercio delle piante medicinali.

Tra il XVI e il XVIII secolo si ha testimonianza di un'approfondita cultura botanica; in Italia, la Scuola Salernitana che fa largo uso di piante medicinali è valorizzata da Federico II che emette un'evoluta legislazione sanitaria per tutelare la salute pubblica.

In Germania, Santa Ildegarda (1098 - 1179), considerata la prima farmacologa per un trattato di fitoterapia, rivoluziona la visione del mondo del suo tempo e precorre la scienza moderna definendo la guarigione un processo globale che avviene su più livelli e affermando che ciò che può farci guarire è già presente nel nostro corpo, mentre "le energie curative sono presenti nella natura" (2, 3).

In questo periodo sorgono i primi orti botanici e gli erbari e s'inizia lo studio *sistematico* delle piante ad opera di Linneo (1707 - 1778) padre della moderna botanica che classifica oltre 13 mila specie di piante e animali, introducendo la "denominazione binomiale", attraverso la quale ogni specie viene universalmente identificata con due nomi in latino superando così le barriere tra le diverse lingue (4).

Tra il 1700 e il 1800 nasce la fitoterapia moderna che punta sull'impiego dei principi attivi contenuti nelle piante e da cui dipende l'attività terapeutica, l'attenzione per l'erboristeria viene però a scemare nei secoli successivi, infatti, con l'introduzione di tecniche d'isolamento e sintesi chimica di molecole attive, il mondo scientifico s'indirizza verso i prodotti di quest'ultimo procedimento.

Tale cambiamento è favorito da diversi fattori come la scarsità e la difficoltà di reperire nuove fonti vegetali, i lenti procedimenti d'estrazione e non ultimi i costi elevati.

La scienza conferma la presenza nelle erbe di principi attivi che costituiscono oltre che ingredienti primari usati dalla chimica moderna anche validi modelli molecolari per lo sviluppo di nuovi farmaci e/o punto di partenza per nuove soluzioni terapeutiche.

Tuttavia, verso gli ultimi decenni del XX secolo, tale sopito interesse per le piante ritorna in auge, apprezzato da un numero sempre più consistente di consumatori che per la prevenzione delle malattie e la cura del loro corpo scelgono di tornare alla "natura", basti pensare che attualmente circa l'80% della popolazione mondiale preferisce ricorrere alla medicina tradizionale a base di erbe.

## **Studio di nuovi principi vegetali con attività terapeutica**

Il gruppo che nell'ISS si occupa delle sostanze naturali, inserito nel Dipartimento del Farmaco, Unità Operativa di Medicine complementari, naturali e tradizionali, ha come missione principale quella di ottenere, attraverso l'isolamento e l'identificazione strutturale dei metaboliti secondari di piante usate nella medicina tradizionale, sostanze naturali da usare come modelli molecolari per lo sviluppo di nuovi farmaci o nuovi rimedi terapeutici e al contempo di trovare una rispondenza tra i principi attivi isolati e il tradizionale uso medicinale.

Un esempio tra le tante piante studiate è la *Peschiera fuchsiaefolia*, una pianta infestante del Brasile, da cui abbiamo estratto e isolato la voacamina, un alcaloide indolico dimero, che ha dimostrato di avere non solo attività antimalarica contro il *Plasmodium falciparum* e il *Plasmodium yoelii*, ma anche attività antimicrobica contro il *Mycobacterium tuberculosis* e il *Mycobacterium ulcerans* e di aumentare l'effetto citotossico della doxorubicina in cellule tumorali resistent (5-9).

Da una costante e proficua collaborazione con i centri di salute e ospedali missionari in Africa, riceviamo periodicamente informazioni sull'efficacia clinica di alcune piante medicinali africane, che rappresentano spesso la terapia d'elezione per pazienti affetti da varie malattie e in particolare dall'AIDS, attualmente tra le più gravi patologie endemiche di quei luoghi. Una di

queste piante *Heliconia psittacorum*, della famiglia delle Musaceae, spontanea in tutte le zone tropicali e subtropicali, è utilizzata per curare proprio i malati di AIDS.

Il nostro programma di ricerca per la determinazione dell'attività che la medicina tradizionale attribuisce a tale pianta, si basa su una prima fase chimico-estrattiva, per isolare e identificare i principi attivi in essa contenuti e su una successiva fase biologica per testare i prodotti ottenuti singolarmente e/o in associazione, al fine di evidenziare se l'efficacia antivirale è legata ad una singola sostanza, a frazioni più complesse oppure all'effetto sinergico di due o più frazioni.

Da un primo screening di *Heliconia psittacorum*, su un estratto da noi isolato, è stata riscontrata e relazionata da parte di personale medico universitario di vari Istituti l'attività *in vitro* HIV-inibitrice che avvalorerebbe le indicazioni curative tradizionali di tale pianta. Alla luce di questi primi risultati incoraggianti si prosegue la ricerca per una più completa caratterizzazione della specifica frazione o fitocomplesso che dimostri di possedere l'attività attesa.

## Il naturale oggi: benefici e rischi

Non sempre il “naturale” è benefico e innocuo e non sempre il “non convenzionale” è da preferire alla medicina ufficiale, infatti, la natura ci regala alcuni prodotti benefici e sicuri ma altri che bisogna evitare o trattare con cautela; tra le sostanze d'origine naturale troviamo molecole farmacologicamente molto attive, basti pensare ad esempio alla digitale attiva sul cuore e alla famosa cicuta di Socrate.

Da tutto ciò si evince che le cure alternative devono essere intraprese sotto controllo medico o persona competente e non autogestite, solo il corretto utilizzo conduce ad effettivi e sicuri risultati con il vantaggio di minori effetti collaterali rispetto ai farmaci di sintesi.

Il rimedio naturale va trattato con le dovute cautele per ottenere un beneficio senza incorrere in reazioni avverse che sempre più spesso sono segnalate quali:

- intossicazioni da abuso, da prescrizioni scorrette, da prodotti inquinati e/o contaminati;
- reazioni avverse fra prodotti naturali e terapie convenzionali;
- automedicazioni errate;
- allergie e intolleranze.

## Droghe vegetali: prove di classificazione normativa

La confusione creatasi negli ultimi anni e le distorsioni inevitabili, quando i confini tra i vari prodotti sono poco definiti, come tra medicinale vegetale tradizionale, preparato erboristico o integratore con estratti vegetali, hanno determinato, all'interno di tale settore, una quantità di prodotti classificati come integratori alimentari a discapito dei prodotti erboristici.

Oggi, dal punto di vista giuridico, la classificazione di prodotti a base di piante che, pur diversi, hanno spesso caratteristiche simili, si basa sulla diversa finalità d'uso. Possiamo così parlare di:

- prodotti destinati ad un “impiego fitoterapico” che modificano, correggono o ripristinano le funzioni organiche dell'uomo, assoggettati alla normativa che regola i medicinali (DL.vo 24 aprile 2006, n. 219) “attuazione della direttiva 2001/83/CE) relativa al codice comunitario concernente i medicinali per uso umano, nonché della direttiva 2003/94/CE e quindi vendibili esclusivamente in farmacia (10-13);

- prodotti dotati di “effetto di tipo salutistico” che favoriscono il normale funzionamento dell’organismo mediante azioni di tipo fisiologico, assimilati agli integratori alimentari (DL.vo 21 maggio 2004, n. 169) e quindi di libera vendita (14).
- in tale classificazione non figura “il prodotto erboristico” in quanto carente di una specifica legislazione che definisca la sua appropriata destinazione.

## Conclusioni

Sarebbe opportuno che gli Organi competenti stabilissero dei limiti quali-quantitativi ben precisi entro cui classificare un prodotto contenente piante ed estratti d’origine vegetale o come “medicinale vegetale tradizionale” o come “integratore alimentare” o come “prodotto erboristico”.

## Bibliografia

1. World Health Organization. *Guidelines on developing consumer information on proper use of traditional, complementary and alternative medicine*. Geneva: WHO; 2004. Disponibile all’indirizzo: <http://www.who.int/medicines/publications/traditional/guidelines2004/en/>; ultima consultazione 2/1/2009.
2. Hildegard von Bingen. *Physica*: Physica, edd. C. Darenberg e F. A. Reuss, in *Patrologia Latina*, vol. 197 (testo del manoscritto parigino); *Frammento berlinese*, ed. H. Schipperges, *Sudhoffs Archiv* 1956;40:41-77.
3. Kaiser P (Ed.) *Hildegardis Bingensis causae et curae*. Leipzig: Teubner; 1903.
4. Carl Nilsson Linnaeus. *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Ad editionem decimam reformatam hormiensem, Halae Magdeburgicae 1758.
5. Federici E, Palazzino G, Nicoletti M, Galeffi C. Antiplasmodial activity of the alkaloids of *Peschiera fuchsiaefolia*. *Planta Med* 2000;66:93-5.
6. Ramanitrahasimbola D, Rasoanaivo P, Ratsimamanga-Urverg S, Federici E, Palazzino G, Galeffi C. Biological activities of the plant-derived bisindole voacamine with reference to malaria. *Phytother Res* 2001;15:30-3.
7. Meschini S, Marra M, Calcabrini A, Federici E, Galeffi C, Arancia G. Voacamine, a bisindolic alkaloid from *Peschiera fuchsiaefolia*, enhances the cytotoxic effect of doxorubicin on multidrug-resistant tumor cells. *Int J Oncol* 2003;23:1505-13.
8. Meschini S, Marra M, Condello M, Calcabrini A, Federici E, Dupuis ML, Cianfriglia M, Arancia G. Voacamine, an alkaloid extracted from *Peschiera fuchsiaefolia*, inhibits P-glycoprotein action in multidrug-resistant tumor cells. *Int J Oncol* 2005;27:1597-603.
9. Meschini S, Condello M, Marra M, Formisano G, Federici E, Arancia G. Autophagy-mediated chemosensitizing effect of the plant alkaloid voacamine on multidrug resistant cells. *Toxicol in Vitro* 2007;21:197-203.
10. Italia. Decreto Legislativo 24 aprile 2006, n. 219. Attuazione della direttiva 2001/83/CE (e successive direttive di modifica) relativa ad un codice comunitario concernente i medicinali per uso umano, nonché della direttiva 2003/94/CE. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 142, 21 giugno 2006.

11. Unione Europea. Direttiva 2001/83/CE del Consiglio del 6 novembre 2001, recante un codice comunitario relativo ai medicinali per uso umano. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee* L311/67, 28 novembre 2002.
12. Unione Europea. Direttiva 2004/24/CE del Consiglio del 31 marzo 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* L136/85, 30 aprile 2004.
13. Unione Europea. Direttiva 2003/94/CE della commissione dell'8 ottobre 2003 che stabilisce i principi e le linee direttrici delle buone prassi di fabbricazione relative ai medicinali per uso umano e ai medicinali per uso umano in fase di sperimentazione. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L262/22, 14/10/2003.
14. Italia. Decreto Legislativo 21 maggio 2004, n. 169. Attuazione della direttiva 2002/46/CE del Consiglio del 10 giugno 2002, per il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri relative agli integratori alimentari. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 164, 15 luglio 2004.

# STUDIO DI SOSTANZE NATURALI CON ATTIVITÀ TERAPEUTICA DA PIANTE DELLA MEDICINA TRADIZIONALE

Giovanna Palazzino  
*Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## Introduzione

Le Medicine Tradizionali (MT) rappresentano l'insieme delle conoscenze, pratiche, metodi, e credenze di varie popolazioni, basate su osservazioni ed esperienze, trasmesse di generazione in generazione, atte a prevenire ed eliminare squilibri fisici, mentali e sociali per mantenere il benessere dei singoli individui.

Esse sono perciò sia medicine complementari perché sono non integrate, o solo parzialmente, nel sistema sanitario nazionale sia medicine naturali quando si tratta di preparazioni a base vegetale, animale e/o minerale.

In particolare oggi una Direttiva del Parlamento Europeo, 2004/24/CE (1), recepita nel Decreto legislativo 24 aprile 2006 n. 219 (2), definisce "medicinali vegetali tradizionali" tutti quei preparati vegetali che hanno avuto un impiego nella medicina popolare di un dato paese extraeuropeo per almeno 30 anni e in Europa per 15 anni, utilizzati per via orale, inalatoria o esterna rispettivamente in forma di decotti o infusi, di polveri o di cataplasmi e per essi stabilisce una procedura di registrazione semplificata come medicinali su base bibliografica che ne dimostri l'efficacia e la sicurezza d'uso. Un medicinale vegetale tradizionale, secondo questa direttiva, è destinato ad essere utilizzato senza un controllo medico per necessità di diagnosi o cura o per il controllo di un trattamento e deve essere dimostrato non nocivo nelle condizioni d'uso indicate ove i suoi effetti farmacologici e la sua efficacia risultano verosimili dall'esperienza e dall'impiego di lunga data.

## L'uso tradizionale a sostegno della medicina

Dagli anni novanta l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha sollecitato l'interesse per la Medicina Tradizionale dei paesi in via di sviluppo ed ha stimolato lo studio delle piante medicinali usate in queste zone per dare una valenza scientifica alla pratica empirica: in questo modo può esserne giustificato l'uso almeno per una cura primaria. Ultimamente anche Nelson Mandela ha richiamato l'importanza di valorizzare le medicine locali per ovviare ai costi della medicina allopatrica.

In questi ultimi dieci anni, poi, lo stesso *National Cancer Institute* americano ha sviluppato alcuni programmi per la valutazione biologica di diverse piante (e loro parti) della foresta tropicale su molti tipi di linee cellulari tumorali: queste prove biologiche hanno messo in evidenza come nuove sostanze derivate da piante, tipo alcaloidi, isoflavonoidi, lignani e prodotti macrociclici, siano di interesse contro il cancro e l'HIV (3). Il tassolo, antitumorale, è una di queste nuove sostanze.

La nostra ricerca si inserisce negli obiettivi di queste due organizzazioni così importanti a livello mondiale: lo scopo è isolare e identificare dalle piante della MT, in particolare dei paesi in via di sviluppo, quelle sostanze nuove o anche già note perché possano poi essere saggiate in una serie di prove biologiche. Si deve considerare che un estratto totale di una pianta “medicinale” può contenere dalle 30 alle 40 sostanze diverse dai metaboliti primari perché a basso peso molecolare, che separate potrebbero essere provate singolarmente in un sistema di screening rapido su un notevole numero di targets molecolari, detto *high-throughput screening* automatizzato (4).

Così le sostanze purificate testate che risultano attive possono giustificare l'uso terapeutico locale e diventare esse stesse dei farmaci (come vincristina e vinblastina estratte dal *Catharanthus roseus*) oppure possono anche rappresentare dei validi modelli molecolari per lo sviluppo di nuove terapie.

## **Studio delle sostanze naturali con attività bio-farmacologica da piante della medicina tradizionale**

Nel nostro laboratorio di chimica delle sostanze naturali giungono le piante utilizzate come antifettivi, antimalarici ma anche antitumorali nella MT popolare di alcuni paesi del Sud America e dell'Africa Sudsahariana, grazie alla collaborazione di alcuni ricercatori locali che sono a contatto con i “curatori” dei villaggi e che si interessano anche della raccolta diretta del materiale vegetale. La pianta o parte di pianta (radice, foglie, corteccia, semi) ovvero la droga vegetale viene raccolta e opportunamente identificata sul campo da un ricercatore botanico locale. Essa viene quindi essiccata in ambiente idoneo e poi triturrata.

La droga vegetale triturrata è sottoposta ad estrazione a freddo in un solvente alcolico o acquoso. L'estratto come soluzione risultante contiene i principi attivi o più in generale i metaboliti secondari della pianta o della parte vegetale utilizzata. Questi metaboliti secondari sono quelle sostanze chimiche prodotte dalla pianta come reazione a stress biogeni e abiogeni cui è sottoposta durante il suo ciclo vitale. Un metodo di estrazione idoneo alle loro caratteristiche di polarità e basicità porta i metaboliti secondari in soluzione, separandoli dai costituenti primari dei tessuti vegetali come acidi nucleici, proteine, lipidi e zuccheri complessi tipo cellulosa e amido. La soluzione viene fatta evaporare a bassa pressione e temperatura non superiore ai 40 °C fino a completa scomparsa del solvente in modo da avere un estratto secco.

L'estratto secco ottenuto viene sciolto in un solvente opportuno e sottoposto a separazione dei componenti chimici utilizzando opportuni metodi di separazione cromatografica.

La separazione dei componenti chimici dall'estratto si attua per frazionamenti successivi, fino all'isolamento delle sostanze pure, principalmente con un apparecchio di distribuzione in contro-corrente (CCD, *Counter-Current Distribution*), l'apparecchio di CRAIG, di cui è dotato il Dipartimento del Farmaco dell'ISS (5) (Figura 1).



**Figura 1. Craig-post apparatus. Sistema di separazione liquido-liquido composto da 200 tubi collegati tra loro e contenenti ciascuno 10 mL di fase inferiore (fase stazionaria) e 10 mL di fase superiore (fase mobile)**

L'apparecchio è un sistema di separazione liquido-liquido che sfrutta la diversa solubilità delle sostanze organiche componenti l'estratto vegetale totale in un solvente polare acquoso e in un solvente organico: la ripartizione delle stesse si realizza in ognuno dei tubi in vetro di cui è costituita l'apparecchiatura. Nei tubi in vetro collegati tra loro si realizzano tante mini ripartizioni tra le due fasi immiscibili: dopo miscelazione-scuotimento delle fasi presenti in ciascun tubo, la fase superiore decantata viene trasferita al tubo successivo trasportando sulla nuova fase inferiore contenuta, perché già fissata come stazionaria, le sostanze solubilizzate, funzionando così da fase mobile. Il sistema di separazione CCD è efficiente con l'uso di sistemi bifasici a più solventi in cui le sostanze componenti dell'estratto risultino equamente distribuite tra le due fasi perché hanno una solubilità simile nella fase inferiore e nella fase superiore della miscela solvente preparata. Il sistema di separazione è efficiente anche per grandi quantità di estratto totale di partenza: si possono caricare fino a 15-20 g di estratto iniziale da purificare. La separazione dei componenti sarà più o meno realizzata in funzione del numero degli stessi e della loro diversa polarità e solubilità nelle due fasi del sistema scelto. Il risultato è una scomposizione del materiale vegetale in tante piccole frazioni contenenti ciascuna una miscela di 2-3 sostanze e al fine le sostanze pure.

Le sostanze così purificate sono opportunamente identificate chimicamente con i comuni metodi di analisi spettroscopica come la risonanza magnetica nucleare mono- e bi-dimensionale del protone e del carbonio 13, la spettrometria di massa, ultravioletta e infrarossa e il dicroismo circolare per le sostanze chirali e poi avviate ai test biologici scelti sia in base alle indicazioni di uso tradizionale sia in base anche alle loro strutture chimiche.

## **Piante contenenti alcaloidi**

Lo studio fitochimico ovvero lo studio della "chimica" di una pianta viene condotto in modo diverso in funzione del tipo di sostanze in essa contenute, ovvero se contiene alcaloidi o sostanze non azotate come flavonoidi, terpeni, lignani e altre.

Gli alcaloidi sono composti azotati debolmente alcalini, con una struttura molecolare relativamente complessa. Sfruttando questa caratteristica basica, gli alcaloidi vengono estratti

dal materiale vegetale con un solvente acquoso acido da cui sono recuperati, dopo alcalinizzazione, nella loro forma basica con un'estrazione in diclorometano. Dalla miscela totale sono poi ottenuti puri usando la CCD con una fase stazionaria di diclorometano e una fase mobile di soluzioni tampone a valori di pH decrescente. Con questo sistema sono state studiate diverse specie del genere *Strychnos* (Loganiaceae) che hanno nei loro paesi d'origine un diverso uso popolare.

La *Strychnos myrtooides* dall'Africa è un esempio di medicina complementare tradizionale. Di questo arbusto del Madagascar della famiglia delle Loganiaceae, raccolto nella regione occidentale dell'Ankarafantsika, viene utilizzata la corteccia essiccata del tronco, come decotto da bere insieme alla cloroquina, per migliorare il suo effetto antimalarico. Con il metodo della distribuzione in contro-corrente, CCD, sono stati isolati e identificati i suoi principi attivi: gli alcaloidi indolici principali, strichnobrasilina e malagashanina (6), e altri alcaloidi secocuranici secondari, myrtoidina e malagashanol (7). Ai test biologici, in particolare, si sono rivelati attivi la strichnobrasilina e la malagashanina con un'azione potenziante *in vitro* e *in vivo* della cloroquina su ceppi di *Plasmodio* cloroquina-resistenti perché i due alcaloidi isolati facilitano la penetrazione dell'antimalarico sintetico nel plasmide resistente, giustificando così l'uso coadiuvante della pianta con l'antimalarico di sintesi (8, 9).

Un ulteriore esempio di come dall'uso tradizionale si possa sostenere un trattamento terapeutico è rappresentato dalla *Peschiera fuchsiaeifolia* (D.C.) Miers, una pianta infestante del Brasile della famiglia delle Apocyniaceae, caratterizzata quindi anch'essa dalla presenza di alcaloidi come principi attivi. La corteccia del fusto viene utilizzata nel paese originario anche come antimalarico. Ebbene lo studio fitochimico della corteccia del fusto e delle radici ha portato all'isolamento di 22 alcaloidi indolici (10) tra cui la voacamina, alcaloide dimero ibogamin-corinamico, che ha dimostrato una buona attività anti-Plasmodio sia su ceppi sensibili alla cloroquina (IC<sub>50</sub>=238 ng/mL su D6) che su ceppi resistenti ad essa (IC<sub>50</sub>=290 ng/mL su W2) e anche una buona attività *in vivo* su le fasi trofozoica e schizonte del *Plasmodium falciparum* (11).

## Piante con sostanze non azotate

Le piante non contenenti alcaloidi ma metaboliti secondari non azotati e quindi a carattere neutro non basico vengono sottoposte ad un processo estrattivo e quindi separativo diverso. In questi casi la parte della pianta utilizzata viene estratta con un solvente organico alcolico e l'estratto essiccato viene poi sottoposto ad una separazione CCD con opportune miscele bifasiche di solventi ternarie o quaternarie ove la fase stazionaria è una fase acquosa non tamponata e la fase mobile è una fase organica semplice o composta.

La modularità di polarità della fase mobile a base di etile acetato e n-butanolo in proporzioni variabili ha consentito di ottenere un ottimo risultato nella separazione e purificazione dei principi attivi di alcune piante africane della famiglia delle Hypoxidaceae utilizzate come antitumorali e per il trattamento di malattie della prostata (12). Estratti di rizomi di *Hypoxis* sono stati inoltre brevettati per il trattamento di pazienti HIV-positivi perché promuovono una minore velocità di caduta di concentrazione dei linfociti CD4, i più colpiti da questo virus (13). La purificazione per CCD con gli stessi solventi si è rivelata utile anche nello studio della chimica di altre piante della stessa famiglia, ma che sono utilizzate come rivitalizzanti e tonificanti dell'umore.

L'*Hypoxis obtusa* Burch, ad esempio, è una pianta erbacea proveniente dal Benin, Mozambico, ove viene utilizzata la radice tuberosa in decotto per l'ipertrofia prostatica e come antitumorale. Dall'estratto metanolico di questi tuberi sono stati isolati e identificati alcuni nor-

lignani fenolici del tipo Ph-C5-Ph, particolarmente insaturi nella catena alifatica centrale, in forma di glicosidi e di agluconi: il componente principale è il diglucoside hypoxoside, identificato chimicamente come il (E)-1,5-bis[(3'-idrossi-4'-O-β-D-glucopiranosilossi)fenil]-1-penten-4-ino, ritrovato insieme ai monoglucosidi obtuside A e obtuside B dello stesso aglucone rooperolo (nor-lignano base), e alla shipamanina, monoglucoside dell'aglucone derivato per idrossilazione del triplo legame in C4 della catena alifatica lineare interposta (14). L'attività biologica di queste sostanze purificate ancora una volta giustifica l'uso tradizionale di questa pianta: infatti l'hypoxoside e il suo aglucone rooperolo si sono dimostrati attivi come antitumorali e come pro-farmaci nel trattamento di pazienti affetti da tumore polmonare e come antinfiammatori (15). D'altra parte le dimostrate proprietà analgesiche (16) e antiossidanti dello stesso componente principale hypoxoside rendono ragione dell'utilizzazione in Sud Africa della parte erbacea dell'*Hypoxis* per lenire il dolore da artrite.

Stessi tipi di composti nor-lignani fenolici in forma di glicosidi come il nyasoside (17), il nyaside, il mononyaside A e mononyaside B con il loro rispettivo aglucone, nyasolo, con struttura base Ph-C3(C2)-Ph perché corrispondente al (Z)-1,3-bis(4'-idrossifenil)-1,4-pentadiene (18), oppure il nyasicoside e l'interjectina (19), ancora del tipo Ph-C5-Ph, con aglucone il 1,5-bis(3',4'-diidrossifenil)-1,2-diidrossi-pentan-4-ino, derivato dall'idrossilazione del rooperolo sul doppio legame in C1 della catena alifatica tra i due fenili, sono stati purificati sempre da tuberi di altre specie del genere *Hypoxis* ovvero da *Hypoxis nyasica* Bak del Malawi(17), da *Hypoxis angustifolia* Lam. dello Zimbabwe (18) e da *Hypoxis interjecta* Nel del Sud Africa (19), "*African potatoes*" utilizzate ancora per il trattamento dell'ipertrofia prostatica. Di questi composti isolati il diglucoside nyasoside ha un'attività antitumorale sia su cellule KB (ED50=12 μg/mL) sia su cellule P388 doxorubicina-resistenti (ED50=8 μg/mL) (17) e in ulteriori studi biologici il suo aglucone nyasolo, isolato anche da un'altra pianta, ha dimostrato un'attività potenziante degli antimicotici azolici tipo miconazolo, ketonazolo e clotrimazolo (20).

Per appartenenza alla stessa famiglia delle Hypoxidaceae sono state studiate altre due specie di un altro genere, *Curculigo* e, a conferma della loro appartenenza chemotassonomica, sono stati isolati e identificati ancora dei composti fenolici a struttura nor-lignanica tipici di questa famiglia: il nyasicoside e la curculigina (chimicamente 1,5-bis(3',4'-diidrossifenil)-1-idrossi-2-O-β-D-glucopiranosilossi-pentan-5-one) dalla *Curculigo recurvata* Dryand dello Zaire oggi Congo (21) e dalla *Curculigo pilosa* Schum. et Thonn. del Benin, insieme anche alla pilosidina, un derivato della curculigina chiuso sulle posizioni 1-2 (22). Le tre sostanze isolate si sono dimostrate attive sul sistema cardiovascolare, giustificando l'uso di queste piante nel loro paese d'origine come cardiotonici e tonificanti-rigeneranti perché il nyasicoside ha un'azione antiaritmica (23) e anche vasocostrittrice ipertensiva insieme a curculigina e pilosidina (22, 24).

Gli ultimi studi fitochimici hanno interessato *Jasminum abyssinicum* e *Phymatodes scolopendria*. La prima è una pianta della famiglia delle Oleaceae, sempreverde rampicante con fiori bianchi di odore dolce, raccolta nella provincia South Kivu della Repubblica Democratica del Congo. Nell'ex-Rwanda se ne utilizzano le radici, che vengono masticate per alleviare le tonsilliti e le foglie e i fiori come decotto antielmintico e per il trattamento degli orecchioni. Dall'estratto metanolico della corteccia delle radici di *Jasminum abyssinicum* R.Br. (Hochst. Ex DC.) sono stati isolati per CCD e caratterizzati chimicamente tre nuovi secoiridoidi oligomeri, chiamati craigosidi A, B e C, in onore dell'apparecchio Craig, formati da due a tre unità iridoidiche di oleoside esterificanti un'unità monoterpenica ciclopentanoica, l'iridano, triossidrilato (25).

*Phymatodes scolopendria* (Burm.) Ching (Polypodiaceae) è una felce raccolta in una zona sabbiosa della costa orientale Imboanjo del Madagascar: le sue parti aeree, foglie e rametti, sono usate nella medicina popolare in forma di decotto per il trattamento delle malattie respiratorie

come asma, tosse e infiammatorie in generale. L'estratto totale etanoliche delle parti aeree, essiccate e triturate, e l'estratto parziale derivato in etile acetato hanno mostrato una forte attività broncodilatatrice su trachea isolata di cavia contratta con istamina ( $10^{-6}$  M) con una EC<sub>50</sub> rispettivamente di 970 µg/mL e 580 µg/mL. Il frazionamento bio-guidato proprio dell'estratto etileacetatico ha portato all'isolamento del principale costituente attivo: il composto purificato è identificato dai dati spettroscopici nella struttura della cumarina (26).

## Bibliografia

1. Unione Europea. Direttiva 2004/24/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 31 marzo 2004, che modifica, per quanto riguarda i medicinali vegetali tradizionali, la direttiva 2001/83/CE recante un codice comunitario relativo ai medicinali per uso umano. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea*, L136/85, 30 aprile 2004.
2. Italia. Decreto Legislativo 24 aprile 2006 n. 219. Attuazione della Direttiva 2001/83/CE (e successive direttive di modifica) relativa ad un codice comunitario concernente i medicinali per uso umano, nonché della Direttiva 2003/94/CE. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 142, 21 giugno 2006.
3. McKee TC, Bokesh HR, McCormick JL, Rashid MA, Spielvogel D, Gustafson KR, Alavanjia MM, Cardellina JH II, Boyd MR. Isolation and characterization of new anti-HIV and cytotoxic leads from plants, marine, and microbial organisms. *J Nat Prod* 1997;60:431-8.
4. Grabley S, Thiericke R (Ed.). *Drug Discovery from Nature*. Berlin, Springer desktop editions in chemistry, Springer Ed; 2000.
5. Kresge N, Simoni RD, Hill RL. Lyman Creighton Craig: developer of the Counter-Current Distribution method. *J Biol Chem* 2005;280(7):127-9.
6. Rasoanaivo P, Galeffi C, Palazzino G, Nicoletti M. Revised structure of malagashanine: a new series of Nb,C(21)-secocuran alkaloids in *Strychnos myrtoides*. *Gazz Chim Ital* 1996;126:517-9.
7. Martin MT, Rasoanaivo P, Palazzino G, Galeffi C, Nicoletti M, Trigalo F, Frappier F. Minor Nb,C(21)-secocuran alkaloids of *Strychnos myrtoides*. *Phytochemistry* 1999;51:479-86.
8. Rafatro H, Ramanitrahambola D, Rasoanaivo P, Ratsimamanga-Urverg S, Rakoto-Ratsimamanga A, Frappier F. Reversal activity of the naturally-occurring chemosensitizer malagashanine in *Plasmodium malariae*. *Biochem Pharmacol* 2000;59:1053-61.
9. Rasoanaivo P, Ratsimamanga-Urverg S, Milijaona R, Rafatro H, Galeffi C, Nicoletti M. *In vitro* and *in vivo* chloroquine potentiating action of *Strychnos myrtoides* alkaloids against chloroquine-resistant strain of *Plasmodium malariae*. *Planta Med* 1994;60:13-6.
10. Federici E, Palazzino G, Nicoletti M, Galeffi C. Antiplasmodial activity of the alkaloids of *Peschiera fuchsiaefolia*. *Planta Med* 2000;66:93-5.
11. Ramanitrahambola D, Rasoanaivo P, Ratsimamanga-Urveg S, Federici E, Palazzino G, Galeffi C, Nicoletti M. Biological activities of the plant-derived bisindole voacamine with reference to malaria. *Phytother Res* 2001;15:30-3.
12. Lowe FC. Phytotherapy in the management of benign prostatic hyperplasia. *Urology* 2001;58(6 suppl.1):71-6.
13. Liebenberg RW, Kruger PG, Bouic PJ, De Vos Albrecht CF. Method of treating viral infections. *Virostat*. US005609874A; US Patent 1997.
14. Galeffi C, Federici E, Palazzino G, Nicoletti M. Further norlignans from *Hypoxis obtusa* Burch. *Gazz Chim Ital* 1997;127:501-4.
15. Galeffi C, Nicoletti M, Palazzino G, Federici E. Hypoxidaceae, a monocotyledons family source of norlignan glucosides with different biological activity. In: Mosaddegh M, Naghibi F (Ed.). *Traditional Medicine and Materia Medica* 2002;1(10):121-8.

16. Nicoletti M, Pieretti S, Capasso A, Galeffi C. Analgesic effects induced by hypoxoside, a nor-lignan glucoside from *Hypoxis* spp. *Phytother Res* 1996;10:398-401.
17. Marini-Bettolo GB, Msonthi JD, Galeffi C, Messana I, Nicoletti M. Procedimento per l'estrazione di un nuovo glucoside ad attività antitumorale da *Hypoxis nyasica* e preparati farmaceutici che lo contengono. *Ital. Patent* 1983; Appl. A/8349561.
18. Sibanda S, Ntabeni O, Nicoletti M, Galeffi C. Nyasol and 1,3(5)-diphenyl-1-pentene related glycosides from *Hypoxis angustifolia*. *Biochem System Ecol* 1990;18(7-8):481-3.
19. Marini-Bettolo GB, Galeffi C, Multari G, Palazzino G, Messana I. Research on African medicinal plants. XXVII. Interjectin a derivative of nyasicoside from *Hypoxis interjecta* and *Hypoxis multiceps*. *Tetrahedron* 1991;47(33):6717-24.
20. Iida Y, Oh K-B, Saito M, Matsuoka H, Kurata H. In vitro synergism between nyasol, an active compound isolated from *Anemarrhena asphodeloides*, and azole agents against *Candida albicans*. *Planta Med* 2000;66:435-8.
21. Chifundera K, Palazzino G, Messana I, Liu Ping, Galeffi C, Cannarsa G. Norlignan glucosides from *Curculigo recurvata*. *Phytochemistry* 1994;35:1343-8.
22. Palazzino G, Galeffi C, Federici E, Delle Monache F, Cometa MF, Palmery M. Benzylbenzoate and norlignan glucosides from *Curculigo pilosa*: structural analysis and in vitro vascular activity. *Phytochemistry* 2000;55:411-7.
23. Chang WL, Su MJ, Lee SS. Bioactive norlignan glucosides from *Curculigo capitulata*. *J Nat Prod* 1997;60(2):76-80.
24. Cometa MF, Palazzino G, Galeffi C, Palmery M. Studies on vasoconstrictor activity of *Curculigo pilosa* extracts and of its isolated compounds. *Il Farmaco* 2001;56:353-6.
25. Gallo FR, Palazzino G, Federici E, Iurilli R, Delle Monache F, Chifundera K, Galeffi C. Oligomeric secoiridoids from *Jasminum abyssinicum*. *Phytochemistry* 2006;67(5): 504-10.
26. Ramanitrahasimbola D, Rakotondramanana DA, Rasoanaivo P, Randriantsoa A, Ratsimamanga-Urveg S, Palazzino G, Galeffi C, Nicoletti M. Bronchodilator activity of *Phymatodes scolopendria* (Burm.) Ching and its bioactive constituent. *J Ethnopharmacol* 2005;102(3):400-7.

# STUDI QUALI-QUANTITATIVI DI PIANTE DI USO CONSOLIDATO

Francesca Romana Gallo  
*Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## Introduzione

Le medicine d'origine vegetale hanno una tradizione antica in tutte le culture, compresa quella occidentale. La riproducibilità dell'efficacia e la sicurezza del loro uso, sono oggi basate sulla garanzia della loro qualità e perciò è necessario che venga effettuata la standardizzazione delle materie prime utilizzate, cioè delle droghe vegetali.

Oltre 190 sono le droghe vegetali e loro derivati presenti nella Farmacopea europea (EP, *European Pharmacopeia*) e le loro monografie riportano, tra l'altro, i metodi di identificazione e dosaggio dei costituenti attivi o caratteristici e il loro contenuto minimo in titolo.

Tali metodi e specifiche sono necessari anche per il controllo dei processi intermedi della loro lavorazione e per la standardizzazione dei prodotti finiti che le contengono.

Le linee guida sulla qualità degli *Herbal medicinal products* dell'*European Medicines Agency* (EMA) raccomandano la definizione quali-quantitativa delle sostanze attive in esse contenute o per lo meno delle sostanze caratteristiche della droga vegetale in esame (1).

In Italia l'approvvigionamento all'estero della maggior parte delle droghe vegetali e la progressiva globalizzazione dei mercati, ha messo a disposizione nuove sottospecie e specie sempre dello stesso genere di quelle indicate in EP, che potrebbero essere utilizzate in miscela o anche in alternativa a quelle ufficiali.

Queste nuove specie e sottospecie, tuttavia, non sempre corrispondono sotto il profilo quali-quantitativo dei componenti attivi alle specifiche di EP. Tali nuove varietà possono rappresentare, però, specie alternative o perché più ricche in principi attivi o per garantire un approvvigionamento costante, indipendente da condizioni avverse di natura climatica o socio-politica dei paesi di provenienza.

## Metodi di identificazione quali-quantitativi del titolo in principi attivi di piante di uso consolidato

Nell'ambito di un progetto di ricerca corrente dell'ISS del 2005 del Dipartimento del Farmaco, Unità Operativa di Medicine complementari, naturali e tradizionali, dal titolo: "Determinazione di costituenti attivi in droghe vegetali dello stesso genere ma di specie diversa da quelle indicate in Farmacopea", si è dimostrato che effettuando la determinazione quantitativa del titolo in principi attivi di alcune delle piante presenti in EP 5<sup>a</sup> edizione, quali per esempio la *Valerianae Radix*, con i metodi vigenti della stessa, si ottenevano valori troppo discordanti e poco riproducibili (2).

La determinazione del titolo veniva effettuata tramite *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), come indicava la vigente monografia, ma la ripetibilità e

riproducibilità del metodo non veniva confermata effettuando il saggio su campioni provenienti da fornitori diversi.

Andando nello specifico delle procedure di analisi si è stabilito che il più delle volte erano le sostanze di riferimento impiegate, che non essendo stabili, si alteravano e davano dei risultati non riproducibili.

La valeriana, è presente in EP come radice della *Valeriana officinalis* L. *sl* (*sensu lato* significa che comprende anche un gruppo di sottospecie *V. collina* Wallroth, *V. versifolia* Brügger, *V. procurrens* Wallroth e *V. sambucifolia* Mikan.) e se venduta, con qualifica EP, deve sottostare a particolari requisiti di qualità e purezza descritti nella monografia stessa.

Alla voce DEFINIZIONE, al *Contenuto* viene riportato: deve contenere non meno di 5 mL/kg di olio essenziale per l'intera droga e non meno di 3 mL/kg per la droga tagliata con riferimento alla droga essiccata.

Deve contenere non meno dello 0,17 per cento di acidi sesquiterpenici espresso come *acido valerenico* per l'intera droga, tuttavia in commercio si trovano partite di valeriana con un contenuto anche superiore allo 0,25 per cento in acidi sesquiterpenici. La proposta avanzata dal progetto era quella di analizzare più piante di valeriana anche di specie diverse da quelle EP per poter vedere il titolo medio in principi attivi delle piante in commercio al fine di innalzare lo stesso nella monografia di EP 6<sup>a</sup> edizione del 2008 (3).

Il titolo non è stato modificato ma si sono apportate altre modifiche:

La procedura c) del saggio di IDENTIFICAZIONE ha subito un cambiamento nella preparazione della *soluzione in esame* e si sono effettuate delle sostituzioni delle *sostanze di riferimento* quali quelle del *sudan red G* e della *fluoresceina* con l'*acido valerenico* e l'*acido acetossivalerenico*.

Alla DETERMINAZIONE QUANTITATIVA è stato introdotto l'utilizzo della sostanza naturale di riferimento *valeriana estratto secco standardizzato SCR* al posto del *dantrone* sostanza di sintesi.

L'utilizzo, come sostanze di riferimento, dell'*acido valerenico*, *acido acetossivalerenico* e della *valeriana estratto secco standardizzato* al posto rispettivamente della *fluoresceina*, *sudan red G* e *dantrone* come suggerito in parte dalla USP 28 (*United States Pharmacopeia and National Formulary*) del 2005, fornisce dati quantitativi ripetibili e riproducibili (4).

Nel 2005 nell'ambito di uno studio europeo di *Market Surveillance Study* (EDQM) (5) sul controllo di qualità dell'*EQUISETUM STEM* il nostro reparto è stato incaricato di effettuare alcuni saggi, al fine di verificare se le piante di *Equisetum stem*, allora presenti in commercio, corrispondessero alle specifiche di EP 5<sup>a</sup> edizione.

Per verificare l'autenticità e la qualità dei campioni di pianta tal quale e dei prodotti che la contenevano, questi sono stati messi a confronto con un campione di riferimento di *Equisetum stem*, proveniente dal segretariato di EP.

L'*Equisetum stem*, è presente in EP 5<sup>a</sup> edizione come parti aeree di *Equisetum arvense* L. e, se venduto con qualifica EP, deve sottostare a particolari requisiti di qualità e purezza descritti nella monografia stessa.

Alla voce DEFINIZIONE al *Contenuto* viene riportato: deve contenere non meno dello 0,3 per cento di flavonoidi totali espressi come isoquercitroside. La richiesta di indagine consisteva nel verificare che le specie di Equiseto allora in commercio soddisfacessero ai requisiti di EP.

L'*E. arvense* ha lo stesso range di distribuzione delle altre specie di Equiseto.

Tutte le specie di Equiseto, e specialmente gli ibridi, sono estremamente variabili nella loro morfologia, e tramite i caratteri morfologici può essere particolarmente difficile la loro identificazione.

Dal momento che l'*E. arvense* viene raccolto come pianta spontanea possono accadere errori durante la raccolta. Per questo motivo si possono verificare frequentemente adulterazioni con *E.*

*palustre* e *E. sylvaticum*. Siccome non sono ancora ben chiari i motivi di tossicità sull'uomo di alcune specie non ufficiali di Equiseto, le adulterazioni della droga sono contestabili e i controlli di IDENTIFICAZIONE e PUREZZA sono obbligatori.

Su 10 campioni raccolti dalle aziende per ordine del Ministero della Salute, solo 2 campioni corrispondevano, in tutti gli aspetti alle specifiche di Farmacopea riguardanti i saggi di purezza, identificazione e determinazione in costituenti attivi, in quanto già in partenza i campioni sequestrati dai NAS non corrispondevano alle specifiche di sequestro, ossia la pianta da sequestrare doveva essere l'Equiseto fusto e non il suo preparato come per esempio l'estratto secco o la tintura.

In seguito al lavoro di controllo fatto per conto del Ministero è poi nata l'idea di effettuare una ricerca che indagasse sulla qualità della pianta *E. arvense* reperibile in commercio. 11 campioni di *E. arvense* così dichiarato dalle ditte, sono stati controllati con tecniche cromatografiche quali HPTLC e HPLC e queste tecniche sono state messe a confronto.

Entrambe le tecniche hanno fornito diversi *fingerprint* (impronte identificative) dimostrando per alcuni campioni una diversità nella composizione dei costituenti presenti.

La tecnica di HPTLC a differenza dell'HPLC si è dimostrata una tecnica molto veloce e pratica per questo genere di campioni in quanto, oltre a dare risultati riproducibili, ha la possibilità di analizzare nel minor tempo possibile, con l'utilizzo dello stesso materiale, più campioni di droghe vegetali contemporaneamente risparmiando quindi reagenti e solventi.

## Bibliografia

1. Europa. European Medicines Agency. Guideline on declaration of Herbal Substances and Herbal Preparations in Herbal Medicinal Products/Traditional Herbal Medicinal Products in the SPC. Doc. Ref.: EMEA/HMPC/CHMP/CVMP/287539/2005; London: 2007.
2. Europa. European Pharmacopoeia fifth edition. Council of Europe Strasbourg; 2 vol. 2005.
3. Europa. European Pharmacopoeia sixth edition. Council of Europe Strasbourg; 2 vol. 2008.
4. Stati Uniti d'America. United States Pharmacopoeia and National Formulary USP 28; 2005.
5. Europa. European *Official Medicines Control Laboratory* (OMCL) Network Market Surveillance Study of Equisetum stem – Equiseti herba Ph.Eur. Council of Europe Strasbourg. PA/PH/OMCL (05)21; March 2005.

# LA VOACAMINA: ALCALOIDE VEGETALE CON ATTIVITÀ CITOTOSSICA E CHEMIOSENSIBILIZZANTE IN CELLULE TUMORALI *IN VITRO*

Stefania Meschini (a), Maria Condello (a), Annarica Calcabrini (a), Manuela Marra (a), Giuseppe Formisano (a), Pasquale Lista (c), Elena Federici (b), Giuseppe Arancia (a)  
(a) Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma  
(b) Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma  
(c) Centro di Riferimento Oncologico di Basilicata (CROB), Rionero in Vulture (PZ)

## Introduzione

Le cellule tumorali esposte ad agenti citotossici sviluppano frequentemente, sia *in vitro* sia *in vivo*, il fenotipo farmacoresistente (MDR, *MultiDrug Resistance*). Tale fenotipo è caratterizzato da un ridotto accumulo e da una diversa distribuzione dell'agente citotossico nelle cellule resistenti, nonché da un'alterata espressione delle proteine di membrana, quali P-glicoproteina (P-gp), *Multidrug Resistance Protein* (MRP), *Lung Resistance Protein* (LRP). In particolare, la P-gp, proteina coinvolta nel trasporto e nell'estrusione di xenobiotici dalla cellula, è altamente espressa sulla superficie di cellule tumorali farmacoresistenti. L'uso di prodotti naturali estratti da piante, utilizzabili in associazione con chemioterapici al fine di potenziarne l'effetto citotossico nei confronti delle cellule tumorali e, possibilmente, riducendone gli effetti collaterali indesiderati, costituisce una nuova e promettente strategia terapeutica per il superamento della farmacoresistenza nei tumori umani.

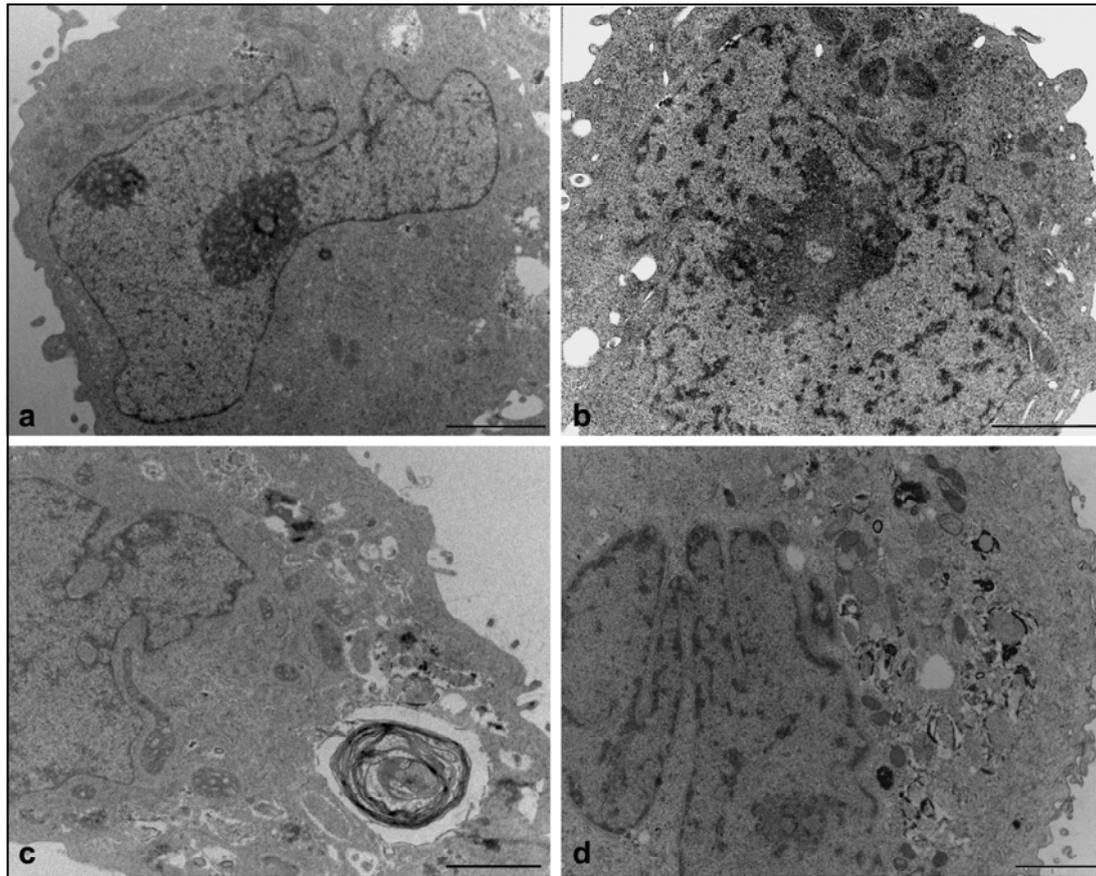
Precedenti studi hanno dimostrato che la voacamina (VOA), alcaloide bisindolico isolato dalla pianta infestante brasiliana *Peschiera fuchsiaeifolia*, presenta attività antimicrobica e antimalarica contro ceppi di *Plasmodium falciparum* cloroquina resistenti. La malaria e il cancro potrebbero sembrare non aver niente in comune, ma entrambe le malattie soffrono per l'insorgenza del fenotipo resistente e, quindi, per il fallimento della terapia. Il *Plasmodium falciparum* presenta nel suo genoma almeno due geni strettamente correlati con la famiglia degli "ABC-transporters" di cui fa parte il gene umano *mdr1*, responsabile della sovraespressione della P-gp nei tumori. In un nostro precedente lavoro (1) abbiamo dimostrato l'effetto chemiosensibilizzante della voacamina in cellule tumorali umane farmacoresistenti trattate con l'alcaloide vegetale in associazione con la doxorubicina (DOX), noto chemioterapico convenzionale. In particolare, in linee cellulari linfoblastoidi (CEM-R) e di osteosarcoma umano (U-2 OS-R), esprimenti elevati livelli di P-gp, il trattamento con concentrazioni subcitotossiche di voacamina induce un aumento della concentrazione e una diversa distribuzione intracellulare del farmaco citotossico. Tale valutazione è favorita dal fatto che la DOX è un farmaco autofluorescente e consente l'osservazione di cellule *in vitro*, senza dover eseguire la fissazione chimica che potrebbe causare una dislocazione impropria del farmaco. Il notevole incremento del contenuto della DOX, osservato nei nuclei delle cellule farmacoresistenti dopo trattamento con VOA, è dovuto all'azione competitiva, nei confronti della Pgp, dell'alcaloide vegetale che causa una diminuzione nella capacità di estrusione della pompa (2). È noto che la P-gp è una molecola molto flessibile, la cui reattività può essere valutata mediante l'utilizzo di diversi anticorpi monoclonali che riconoscono sia epitopi costituzionali che funzionali. Gli epitopi funzionali sono esposti sulle membrane cellulari nella

conformazione riconosciuta dai corrispondenti anticorpi, solo dopo trattamento con sostanze che risultano essere substrato della P-gp. L'utilizzo dell'anticorpo monoclonale MAb UIC2 è stato determinante per la comprensione di tale meccanismo. Esso reagisce solo quando l'apparato molecolare della pompa è nella condizione funzionale ed ha permesso di dimostrare, mediante la citofluorimetria a flusso, l'effetto inibitorio della VOA nei confronti dell'attività della P-gp. Altri meccanismi possono essere determinanti nell'alterata risposta cellulare alla chemioterapia; l'incapacità di attivare il processo apoptotico da parte di una cellula alterata rappresenta un ulteriore meccanismo di resistenza. Il nostro interesse si è così rivolto verso la comprensione delle alterazioni ultrastrutturali e molecolari che regolano il meccanismo di morte cellulare indotto dalla VOA (3).

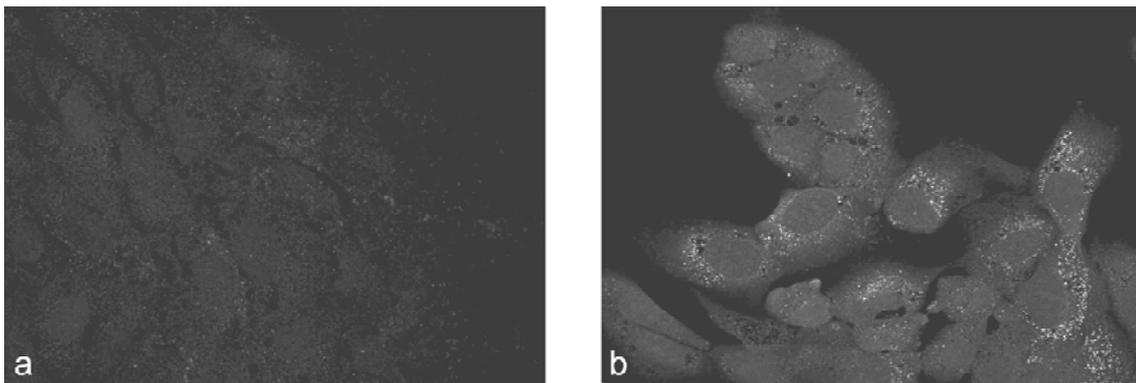
## Risultati e discussione

Studi recenti *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato la presenza di diversi programmi di morte cellulare attivati in seguito a trattamenti citotossici o ad induzione di stress cellulare. L'apoptosi è caratterizzata dall'attivazione di vie di segnale specifiche e una rapida esecuzione del programma di morte. Le cellule che non sono in grado di andare in apoptosi muoiono o per necrosi, che porta alla lisi della cellula per inefficienza metabolica, o per autofagia, processo catabolico di autodigestione. All'inizio del programma autofagico, proteine e organelli che devono essere degradati o trasformati per essere riutilizzati, sono avvolti da strutture vacuolari delimitate da doppia membrana, chiamate autofagosomi. Nel proseguimento del processo, questi ultimi fondono con i lisosomi per formare gli autolisosomi, dove il materiale viene digerito e/o trasformato dagli enzimi lisosomiali. Nel nostro modello sperimentale il trattamento della linea resistente U-2 OS-R, con il solo chemiosensibilizzante o in combinazione con la DOX, non rivelava la presenza di cellule con fenotipo apoptotico. Tale dato è stato confermato dall'analisi citofluorimetrica, mediante il test dell'Annexina V, che non evidenziava l'attivazione del programma apoptotico anche in condizioni di trattamento in cui si rivelava il 50% di morte cellulare (3). È noto che sostanze usate come chemioterapici possono indurre morte autofagica e non apoptotica. Abbiamo quindi studiato a livello ultrastrutturale, mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM), le cellule U-2 OS-R e le corrispondenti sensibili U-2 OS-WT dopo trattamento con VOA. Effettivamente sia le cellule sensibili (Figura 1c) sia quelle resistenti (Figura 1d), dopo trattamento con VOA (5µg/mL per 24h) mostravano citoplasma ricco di vacuoli con materiale altamente elettrondenso, strutture mielinoformi e organelli citoplasmatici alterati rispetto alle cellule di controllo (Figure 1a ed 1b).

Per verificare la presenza e quantificare le vescicole acide dopo trattamento con VOA, abbiamo utilizzato sia l'arancio di acridina (AO), un agente lisosomatropico che attraversa liberamente le membrane biologiche, sia la monodansilcadaverina (MDC), un marker selettivo per gli autofagolisosomi. In entrambi i casi abbiamo rivelato la presenza di una quantità maggiore dei coloranti specifici nelle cellule trattate con VOA. È noto che gli autofagosomi sono caratterizzati per la presenza sulla loro superficie di una proteina di membrana, la LC-3 (*microtubule-associated protein 1 light-chain 3*). Per essere sicuri che i vacuoli che noi osservavamo fossero autofagosomi, abbiamo effettuato la marcatura con un anticorpo monoclonale diretto contro questa proteina. Dopo marcatura e osservazione mediante microscopia confocale abbiamo potuto verificare la reale localizzazione di questo antigene. In Figura 2b si osserva un'aumentata espressione e una precisa localizzazione vacuolare della proteina LC3 totale dopo trattamento della linea U-2 OS-R con VOA (5µg/mL per 24h) rispetto al controllo (Figura 2a). Questi dati confermano la presenza del fenomeno autofagico nel nostro modello cellulare.



**Figura 1. Osservazioni al microscopio elettronico a trasmissione: cellule sensibili U-2 OS-WT (a) e resistenti U-2 OS-R (b) di controllo; U-2 OS-WT (c) e U-2 OS-R (d) trattate con voacamina 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  per 24h (d); barra=2  $\mu\text{m}$**



**Figura 2: Effetto della voacamina sull'espressione della proteina LC3 in cellule di osteosarcoma umano resistenti U-2 OS-R mediante osservazioni in microscopia confocale a scansione laser. (a) cellule di controllo, (b) cellule trattate con voacamina 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  per 24h. Barra=10  $\mu\text{m}$ .**

Il ruolo dell'autofagia nelle cellule tumorali dopo trattamento con chemioterapici è ancora molto dibattuto. In alcune situazioni è stato infatti riportato che l'autofagia protegge le cellule cancerose dai trattamenti terapeutici. Nel caso di tumori refrattari all'apoptosi, l'autofagia può essere considerata una reale alternativa alla morte cellulare per apoptosi. Sulla base dei nostri precedenti lavori (1-3) che dimostravano l'importanza dell'uso di questa sostanza naturale, a concentrazioni non citotossiche, per aumentare l'efficacia del trattamento chemioterapico della DOX e la dimostrazione dell'induzione della morte per autofagia nella linea di osteosarcoma farmacoresistente dopo trattamento con la sola VOA, si può ben sperare per un futuro e promettente utilizzo di tale sostanza in terapia clinica.

## Bibliografia

1. Meschini S, Marra M, Calcabrini A, Federici E, Galeffi C, Arancia G. Voacamine, a bisindolic alkaloid from *Peschiera fuchsiaefolia* enhances the cytotoxic effect of doxorubicin on multidrug resistant tumor cells. *International Journal of Oncology* 2003;23:1505-13.
2. Meschini S, Marra M, Condello M, Calcabrini A, Federici E, Dupuis ML, Cianfriglia M, Arancia G. Voacamine, an alkaloid extracted from *Peschiera fuchsiaefolia*, inhibits P-glycoprotein action in multidrug resistant tumor cells. *International Journal of Oncology* 2005;27:1597-603.
3. Meschini S, Condello M, Marra M, Formisano G, Federici E, Arancia G. Autophagy-mediated chemosensitizing effect of the plant alkaloid voacamine on multidrug resistant cells. *Toxicology in Vitro* 2007;21:197-203.

## **OCIMUM BASILICUM E METABOLISMO LIPIDICO**

Elena Bravo (a), Giovanna Palazzino (b), Fiorella Ciaffoni (a), Bruno Gallinella (b), Vincenza Papa (a), Souliman Amrani (c), Mariarosaria Napolitano (a)

(a) Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(c) Department of Biology, Faculty of Sciences, University Mohamed I, Oujda, Morocco

### **Introduzione**

In questi ultimi anni si è andato affermando un crescente interesse scientifico per le sostanze di origine naturale e l'attenzione si è rivolta verso quelle piante che sono già tradizionalmente utilizzate dalle popolazioni dei Paesi in via di sviluppo nella cura delle malattie. Questo è principalmente vero per le malattie a larga diffusione e in continua crescita. Per esempio, l'arteriosclerosi e le malattie cardiovascolari, che nei Paesi occidentali rappresentano una delle principali cause di morbilità e mortalità, stanno diventando un problema sanitario di notevoli dimensioni anche nei Paesi in via di sviluppo (1), come conseguenza del cambiamento del tenore di vita e delle abitudini alimentari di queste popolazioni. L'iperlipidemia rappresenta uno dei principali fattori di rischio aterogenico. Nei soggetti iperlipidemici un abbassamento dei livelli dei lipidi ematici rallenta lo sviluppo della malattia (2). Tali pazienti vengono perciò sottoposti a terapie a base di farmaci ipolipidemizzanti, quali le statine e i fibrati. Queste terapie, benché molto efficaci, sono però molto costose. Inoltre, la risposta al farmaco varia da paziente a paziente: pertanto c'è un bisogno di terapie e/o supplementazioni dietetiche che abbiano funzione ipolipidemizzante e che possano aumentare il ventaglio dei rimedi disponibili.

Per questo sta crescendo l'attenzione rivolta al miglioramento dello stile di vita, della dieta e della ricerca di prodotti naturali per la prevenzione delle malattie cardiovascolari (3, 4). In particolare sono state dimostrate nell'uomo, e in animali da esperimento, le proprietà ipolipidemiche di alcune piante quali *Ficus carica* (5) e *Phyllanthus niruri* (6).

L'*Ocimum basilicum* (Labiatae) oltre ad essere una pianta aromatica utilizzata in cucina, in molti Paesi è una pianta medicinale (7) di cui sono già riconosciute alcune proprietà terapeutiche (antinfiammatorie, antibatteriche e insetticide); essa, inoltre, contiene molti composti antiossidanti (8-10) e possiede un forte potere antiossidante (11, 12). Nella zona orientale del Marocco la pianta essiccata di *Ocimum basilicum* viene anche utilizzata in erboristeria come agente ipolipidemizzante e distribuita ad un elevato numero di soggetti iperlipidemici.

Tali pratiche di medicina popolare sono molto diffuse, tuttavia, come sovente accade per la medicina tradizionale, mancano sia studi tesi a comprendere le reali proprietà ipolipidemiche e potenzialmente anti-aterogeniche dell'*Ocimum basilicum*, sia quelli volti a valutare l'assenza di effetti nocivi determinati dall'uso dei derivati erboristici.

Lo scopo dei nostri studi è quello di valutare le proprietà ipolipidemiche dell'*Ocimum basilicum* in diversi modelli sperimentali.

L'*Ocimum basilicum* usato per questi studi è stato raccolto nella città di Oujda nel Marocco orientale. L'identificazione tassonomica è stata certificata dal Professor A. Khalil del Dipartimento di Biologia, Facoltà di Scienze (Oujda, Marocco) dove ne è stato depositato un campione certificato (collezione LO 15).

## Effetto dell'estratto acquoso di *Ocimum basilicum* su un modello di ipercolesterolemia acuta

Come primo obiettivo abbiamo voluto verificare le proprietà ipolipidemiche dell'*Ocimum basilicum* in un modello animale di iperlipidemia acuta, indotta nei ratti da Triton WR-1339, mediante l'analisi degli effetti dell'estratto acquoso di *Ocimum basilicum* sul quadro lipidico ematico. I ratti con iperlipidemia acuta indotta da Triton WR-1339 rappresentano un modello animale ampiamente usato per studiare l'effetto ipolipidemico degli estratti di varie piante officinali (13-15). Il Triton WR-1339 agisce *in vivo* bloccando la *clearance* delle lipoproteine ricche in trigliceridi (16) ed è stato osservato che i valori plasmatici massimi di colesterolo totale e trigliceridi vengono raggiunti dopo 20 ore dalla somministrazione di Triton WR-1339 per poi tornare gradualmente a valori normali (17).

Nel nostro studio sono state usate 20 femmine adulte di ratti Wistar del peso di 170-200 g a digiuno. Per la preparazione dell'estratto acquoso le parti aeree della pianta sono state lasciate in infusione per 30 min in acqua distillata a 100 °C. Dopo filtrazione ed essiccazione, l'estratto è stato ripreso in acqua distillata. Quale farmaco ipolipidemico di controllo è stato usato il fenofibrato.

Gli animali sono stati divisi in 4 gruppi. Al primo gruppo – gruppo iperlipidemico (HG) – è stata praticata un'iniezione intraperitoneale di Triton WR-1339 alla dose di 200 mg/kg in fisiologica. Nel secondo gruppo – ratti ipelipidemici trattati con estratto di *Ocimum basilicum* (HG+OB) – l'iniezione di Triton WR-1339 è stata seguita da somministrazione intragastrica di estratto di *Ocimum basilicum* (0,5 g/100 g). Nel terzo gruppo – ratti iperlipidemici trattati con fenofibrato (HG+FF) – l'iniezione di Triton WR-1339 è stata seguita da somministrazione intragastrica di fenofibrato (65 mg/kg). Al quarto gruppo – gruppo di controllo (CT) – è stata somministrata una soluzione fisiologica per gavage. Dopo 7 e 24 ore dal trattamento, agli animali è stato effettuato un prelievo di sangue per l'analisi lipidica. Le frazioni lipoproteiche LDL (*low density lipoprotein*) e HDL (*high density lipoprotein*) sono state isolate dal plasma mediante ultracentrifugazioni differenziali in gradiente. I risultati di colesterolo totale e trigliceridi plasmatici ottenuti nei 4 gruppi di animali sono riportati in Tabella 1. I valori sono la media  $\pm$  SEM dei valori ottenuti dai 5 animali appartenenti a ciascun gruppo. HG+OB e HG+FF sono comparati con HG. Il gruppo iperlipidemico è paragonato con il gruppo di controllo.

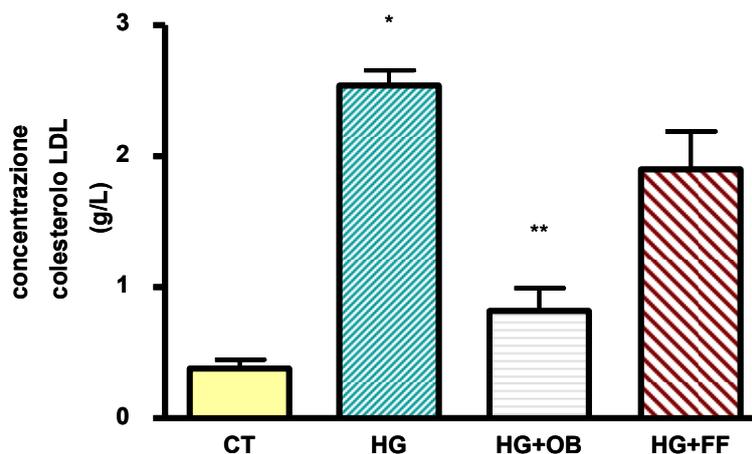
**Tabella 1. Effetto dell'estratto acquoso di *Ocimum basilicum* e del fenofibrato sul colesterolo totale e sui trigliceridi nella iperlipidemia indotta da Triton WR-1339 nei ratti dopo 7 e 24 ore dall'iniezione di Triton WR-1339**

Parametri Lipidici	CT	HG	HG+OB	HG+FF
<b>TC (g/mL)</b>				
7h	0,64 $\pm$ 0,05	1,28 $\pm$ 0,07*(+100%)	0,64 $\pm$ 0,08**(-50%)	1,01 $\pm$ 0,08 (-21%)
24h	0,64 $\pm$ 0,05	2,78 $\pm$ 0,20**(+334%)	1,20 $\pm$ 0,42***(-56%)	2,24 $\pm$ 0,08 (-19%)
<b>TG (g/mL)</b>				
7h	0,76 $\pm$ 0,06	6,24 $\pm$ 0,26*(+721%)	1,08 $\pm$ 0,53*(83%)	0,49 $\pm$ 0,1*(-92%)
24h	0,76 $\pm$ 0,06	4,85 $\pm$ 0,08**(+538%)	1,79 $\pm$ 0,78**(-63%)	0,85 $\pm$ 0,09*(-82%)

CT: gruppo di controllo; HG: gruppo iperlipidemico; HG+OB: gruppo iperlipidemico+estratto di *Ocimum basilicum*; HG+FF: gruppo iperlipidemico+fenofibrato; TC: colesterolo totale; TG: trigliceridi. \*p<0,001; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,05.

La Tabella 1 mostra che l'iperlipidemia indotta da Triton WR-1339 (HG) è marcatamente diminuita sia a 7 che 24 ore dall'induzione nei ratti trattati con l'estratto di *Ocimum basilicum* (HG+OB). Il trattamento con fenofibrato riduce i livelli plasmatici di trigliceride, ma non altera significativamente quelli di colesterolo.

Poiché non ci sono state variazioni nella distribuzione di colesterolo nelle HDL (12), nella Figura 1 è riportata la distribuzione di queste classi lipidiche nella frazione LDL. Anche la distribuzione del colesterolo LDL nei diversi gruppi è modificata dal trattamento con *Ocimum basilicum* (Figura 1). I valori sono la media  $\pm$  SD dei valori ottenuti da 5 animali. Il gruppo iperlipidemico è paragonato con il gruppo di controllo. HG+OB e HG+FF sono comparati con HG.



CT: gruppo di controllo, HG: gruppo iperlipidemico; HG+OB: gruppo iperlipidemico trattato con estratto di *Ocimum basilicum*; HG+FF: gruppo iperlipidemico trattato con fenofibrato

**Figura 1. Effetto dell'estratto acquoso di *Ocimum basilicum* e del fenofibrato sul colesterolo-LDL sulla iperlipidemia nei ratti dopo 24 ore dall'induzione con Triton WR-1339. \* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,05$**

Il Triton WR-1339 induce un incremento del colesterolo a carico delle LDL, mentre il trattamento con l'*Ocimum basilicum* ne causa una riduzione significativa rispetto al gruppo HG. Il colesterolo-HDL rimane pressoché invariato in tutti e 3 i gruppi di animali trattati rispetto al controllo CT. È interessante notare che la diminuzione dei valori di colesterolo-LDL del gruppo trattato con *Ocimum basilicum* è marcatamente maggiore anche rispetto al gruppo trattato con fenofibrato.

In sommario, questo primo lavoro mostra che l'estratto acquoso di *Ocimum basilicum* ha un significativo effetto ipolipidemico, poiché produce una riduzione del colesterolo-LDL e un aumento relativo del contenuto in colesterolo-HDL, il che corrisponde ad un profilo lipidico meno aterogenico. Questo studio, tuttavia, non fornisce indicazione sui meccanismi attraverso i quali l'*Ocimum basilicum* esplica l'azione ipolipidemica, ma si può ipotizzare che un ruolo importante sia svolto da flavonoidi e procianidine in esso presenti in notevoli quantità (10). A questi composti polifenolici, ubiquitariamente presenti nelle piante, sono infatti riconosciute molte attività farmacologiche, incluso l'effetto ipocolesterolemico (18).

## Ruolo dell'*Ocimum basilicum* sul metabolismo del colesterolo nel macrofago

L'ipercolesterolemia è il principale fattore di rischio delle malattie cardiovascolari. Il suo aumento si associa ad un incremento delle LDL, lipoproteine aterogene che possono indurre accumulo lipidico nelle cellule vasali, specie dopo modificazione (19). L'accumulo di colesterolo indotto da LDL modificate, nei macrofagi con conseguente loro trasformazione in foam cell, rappresenta un evento precoce nel processo della formazione della lesione aterosclerotica (20, 21). Allo scopo di valutare il potenziale anti-aterogenico dell'*Ocimum basilicum* a livello cellulare, abbiamo pianificato una serie di esperimenti per valutare l'effetto degli estratti di *Ocimum basilicum* sul processo di accumulo di colesterolo in macrofagi umani.

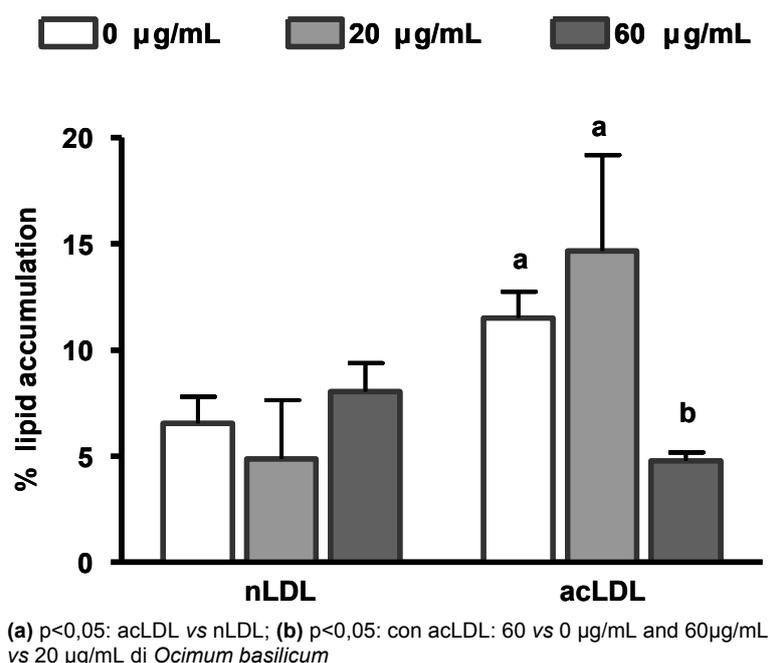
Come modello cellulare per questo studio sono stati utilizzati macrofagi umani derivati per differenziamento spontaneo da monociti (*Human Monocyte Derived Macrophages*, HMDM). I monociti sono stati isolati da preparazioni di sangue umano arricchite di globuli bianchi (*buffy coat*) per centrifugazione su gradiente di densità (22) e purificati mediante il sistema della Miltenyi Biotec di biglie coniugate ad un anticorpo monoclonale antiCD14 che riconosce i monociti. Il differenziamento spontaneo a macrofagi si ottiene dopo 10 giorni di coltura in IMDM contenente fetal bovine serum (FBS) al 15%.

L'estratto etanolic di *Ocimum basilicum*, utilizzato in questi esperimenti, è stato preparato a partire da 50g di parti aeree di *Ocimum basilicum* essiccato, estratti con 250 mL di alcool etilico. Dopo sonicazione, l'estratto è stato filtrato, evaporato, e conservato fino all'uso in atmosfera di azoto al buio a temperatura ambiente. Per gli esperimenti di incubazione con le cellule l'estratto è stato solubilizzato in DMSO.

Come primo obiettivo abbiamo valutato gli effetti del trattamento, per 24 ore, con 0, 20, 40, 60 e 100 µg/mL di estratto etanolic di *Ocimum basilicum* sulla vitalità, morfologia e integrità cellulare, valutati rispettivamente con il test del Tripan Blu, osservazione microscopica e quantità di lattato-deidrogenasi citoplasmatica rilasciata nel mezzo di coltura cellulare. Poiché non abbiamo rilevato alcuna alterazione di questi parametri, successivamente abbiamo valutato se il trattamento con l'estratto etanolic modulasse la capacità del macrofago di accumulare lipidi e trasformarsi in *foam cells*, in seguito ad incubazione con LDL modificate (LDL acetilate, acLDL), che posseggono un forte potere di induzione di accumulo lipidico nel macrofagi (19, 23). Cellule incubate con LDL native (nLDL), sono state usate come controllo. Le LDL sono state isolate e modificate secondo le procedure routinarie del nostro laboratorio (22). L'accumulo di lipidi è stato valutato mediante colorazione specifica per i lipidi (Oil Red-O) in HMDM pretrattati per 24h con 0, 20 o 60 µg/mL di estratto etanolic di *Ocimum basilicum* e, successivamente, incubati con nLDL o acLDL per ulteriori 24h. In base al grado di infarcimento lipidico (24), calcolato su numero e frequenza delle goccioline lipidiche all'interno del macrofago, è stata valutata la percentuale di formazione delle *foam cells* (Figura 2). Dopo 24 ore di pretrattamento con 0, 20 and 60 µg/mL di estratto etanolic di *Ocimum basilicum*, gli HMDM sono stati incubati con 100 µg/mL di LDL native o LDL-acetilate per altre 24 ore. L'accumulo intracellulare di lipidi è stato valutato mediante colorazione specifica dei lipidi con Oil red-O, e valutato in accordo a quanto riportato da Yang *et al* (24). I dati sono riportati come media+SD (deviazione standard) della percentuale di *foam cells* contate (n. 3).

In assenza dell'estratto, la percentuale di induzione delle *foam cells* (macrofagi il cui citoplasma era infarcito per almeno 1/3 da lipidi) da parte delle acLDL è circa raddoppiata rispetto alle nLDL e il trattamento con 20µg/mL *Ocimum basilicum* non altera tale risultato. Tuttavia alla concentrazione di 60 µg/mL, l'estratto etanolic di *Ocimum basilicum* riduce significativamente la proporzione di *foam cells*, portando la percentuale di *foam cells* indotte

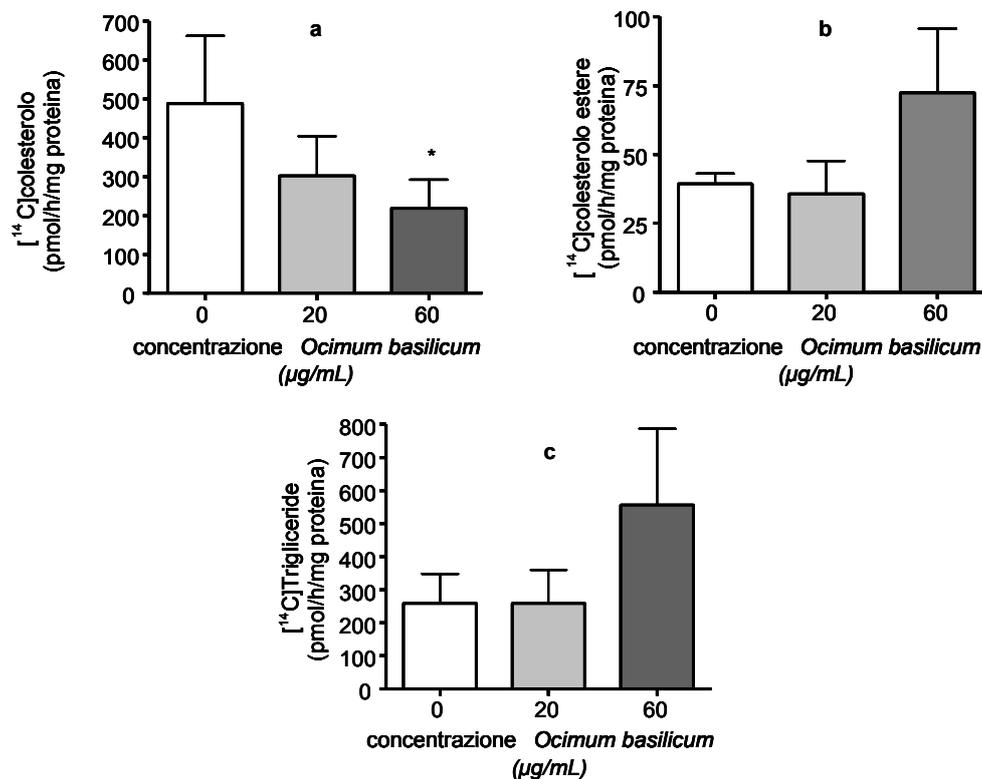
dalle acLDL simile a quella ottenuta con le nLDL. Tali risultati suggeriscono che nell'estratto etanoloico, e quindi, praticamente totale, dell'*Ocimum basilicum* esistono uno o più composti in grado di diminuire l'internalizzazione macrofagica di LDL modificate. Poiché le lipoproteine modificate sono internalizzate nei macrofagi mediante recettori scavengers, i risultati ottenuti potevano attribuirsi ad una diminuzione dell'attività di questi recettori. Esperimenti tesi a dimostrare una modulazione dell'attività scavenger, valutata mediante la determinazione dell'internalizzazione di colesterolo trasportato dalle [<sup>3</sup>H]CE-aggregated-LDL hanno dimostrato che l'attività scavenger dei macrofagi è diminuita di circa 20-30% dopo trattamento con 60 µg/mL di estratto rispetto alle cellule trattate con il solo veicolo (60 µg/mL estratto vs DMSO: p<0,05) (25). Tale effetto non è stato osservato con la concentrazione di 60 µg/mL di estratto etanoloico di *Ocimum basilicum*.



**Figura 2. Effetto dell'estratto etanoloico di *Ocimum basilicum* sull'accumulo dei lipidi negli HMDM**

Inoltre, nel tentativo di chiarire i meccanismi che determinano la diminuita induzione di *foam cells* da parte dell'*Ocimum basilicum* abbiamo valutato se tali estratti posseggano la capacità di diminuire la sintesi macrofagica di lipidi. A tale fine, è stata valutata la neosintesi di colesterolo sia in forma libera che esterificata, e dei trigliceridi per mezzo dell'uso del [<sup>14</sup>C]acetato, che è un precursore comune ad entrambi queste classi lipidiche (26). I risultati di questi esperimenti, relativi alla radioattività recuperata nei prodotti di sintesi sono mostrati nella Figura 3. Gli HMDM pre-trattati per 24 ore con 0 (DMSO), 20, 60 µg/mL di estratto di *Ocimum basilicum* sono stati incubati successivamente con [<sup>14</sup>C]acetato (0,5mM, 2µCi/mL) a 37 °C. Dopo 6 ore di incubazione le cellule sono state lavate e i lipidi cellulari sono stati estratti con esano: isopropanolo (3:2, v:v). La sintesi di [<sup>14</sup>C] colesterolo, [<sup>14</sup>C] colesterolo estere e [<sup>14</sup>C] trigliceride (espresso in pmol/h/mg proteina ) è riportata come media+SD di tre diversi esperimenti.

Il trattamento con 20 µg/mL di estratto etanolo non modifica la neosintesi cellulare di [<sup>14</sup>C]colesterolo, mentre l'incorporazione di [<sup>14</sup>C]acetato nel [<sup>14</sup>C]colesterolo è significativamente ridotta dopo l'incubazione con 60µg/mL di estratto di *Ocimum basilicum*. Tuttavia, alla stessa concentrazione si rileva un incremento, non significativo, nella sintesi di [<sup>14</sup>C]colesterolo estere che può essere attribuito ad una diminuita sintesi di colesterolo associata ad un aumento di incorporazione di [<sup>14</sup>C]acetato negli acidi grassi di neosintesi. Una conferma indiretta di questa interpretazione deriva dall'analisi della neosintesi di [<sup>14</sup>C]trigliceridi, la quale mostra una tendenza all'incremento di produzione dei trigliceridi. In sommario, l'*Ocimum basilicum* ha dimostrato una capacità significativa di ridurre l'accumulo lipidico nei macrofagi, e questo effetto si associa ad una diminuita neosintesi di colesterolo. Tuttavia, la riduzione di biosintesi di colesterolo osservata in questo studio, sembra insufficiente a spiegare la marcata riduzione di accumulo lipidico indotta nei macrofagi.



(a) colesterolo, (b) colesterolo estere, (c) trigliceridi. \*p<0,05: 60µg/mL di *Ocimum basilicum* vs 0µg/mL (n. 3)

Figura 3. Effetto dell'estratto etanolo di *Ocimum basilicum* sulla sintesi di lipidi negli HMDM

## Conclusioni

L'iperlipidemia, il danno ossidativo e la formazione di *foam cells* sono fattori determinanti nello sviluppo del complesso processo dell'arteriosclerosi e delle malattie cardiovascolari (1, 20, 27). I rimedi erboristici proposti e largamente usati nella medicina tradizionale rappresentano un valido punto di partenza per l'individuazione di componenti naturali con

funzioni benefiche sulla salute umana, che stanno sempre più catalizzando l'interesse delle industrie farmacologiche anche di livello multinazionale. Tuttavia, ciascuno di questi rimedi richiede un'indagine scientifica appropriata per valutarne sia la loro efficacia sia la loro innocuità per la salute. In questi studi preliminari, partendo da un'indicazione della medicina popolare del Marocco, abbiamo iniziato a valutare le potenziali capacità anti-aterosclerotiche dell'*Ocimum basilicum*.

L'*Ocimum basilicum* è ricco di molti antiossidanti, quali flavonoidi e procianidine (8-10). Esperimenti effettuati dal nostro e altri gruppi hanno anche dimostrato che l'*Ocimum basilicum* possiede un notevole potere antiossidante (11) e la capacità di aumentare la resistenza delle LDL umane all'ossidazione (25). Queste 2 proprietà già rendono tale pianta molto interessante dal punto di vista delle sue potenziali proprietà anti-aterosclerotiche (28, 29). Inoltre, l'effetto ipolipidemizzante sul modello di iperlipidemia indotto da Triton WR-1339, ha ulteriormente rafforzato il nostro interesse sulle proprietà ipolipidemiche di questa pianta (12). Il lavoro a livello cellulare con i macrofagi, ci ha permesso di constatare che il trattamento con estratti di questa pianta non altera la morfologia e l'integrità cellulare, e ci ha rivelato una capacità significativa di tali estratti di diminuire la percentuale di accumulo lipidico indotto da LDL aterogene. Questi risultati sono di estremo interesse e giustificano l'interesse dell'uso dell'*Ocimum basilicum* come pianta ad attività ipolipidemiche e anti-aterogena, tuttavia non forniscono una chiara indicazione sul possibile meccanismo di azione. Nuovi studi saranno necessari, inoltre, per isolare l'eventuale o gli eventuali composti che in maniera individuale o sinergica sono responsabili degli effetti da noi osservati.

## Bibliografia

1. Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA. A modern view of atherogenesis. *Am J Cardiol* 1993;71:9B-14B.
2. Blankenhorn DH. Blood lipids and human coronary artery atherosclerosis regression: the angiographic evidence. *Curr Opin Lipidol* 1991;2:234-9.
3. Hata Y, Nakajima K. Life-style and serum lipids and lipoproteins. *J Atheroscler Thromb* 2000;7:177-97.
4. Nettleton JA, Steffen LM, Mayer-Davis EJ, Jenny NS, Jiang R, Herrington DM, Jacobs DR Jr. Dietary patterns are associated with biochemical markers of inflammation and endothelial activation in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Am J Clin Nutr* 2006;83:1369-79.
5. Pérez C, Canal JR, Campello JE, Adelaida R and Torres MD. Hypotriglyceridaemic Activity of *Ficus carica* Leaves in Experimental Hypertriglyceridaemic Rats. *Phytother Res* 1999;13:188-191.
6. Khanna AK, Chauder R, Chandan S, Srivastava AK and Kapoor NK. Hypolipidemic activity of *Achyranthus aspera* linn in normal and triton induced hyperlipemic rats. *Indian J Exp Biol* 1992;30:128-30.
7. Margarida Carmo M, Raposo EI, Vendneio T, Trazad S, Seabra R. The essential oil of *Ocimum basilicum* L. from Portugal. *J Essen Oil Res* 1990;2:263-4.
8. Baritoux O, Amiot MJ, Richard H, Nicolas J. Enzymatic browning of basil (*Ocimum basilicum* L.) studies on phenolic compounds and polyphenol oxidase. *Sciences des aliments* 1991;11:49-62.
9. Grayer RJ, Kite GC, Goldstone FJ, Bryan SE, Paton A, Putievsky E. Intraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, *Ocimum basilicum*. *Phytochemistry* 1996;43:1033-9.
10. Jayasinghe C, Gotoh N, Aoki T, Wada S. Phenolics composition and antioxidant activity of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *J Agric Food Chem* 2003;51(15):4442-9.
11. Marinava EM, Ynishlieva NV. Antioxydative activity of extracts from selected species of the family of Lamiaceae in sunflower oil. *Food Chem* 1997;58:245-8.

12. Amrani S, Harnafi H, Bouanani NEH, Aziz M, Chaid HS, Manfredini S, Besco E, Napolitano M, Bravo E. Hypolipidaemic activity of aqueous *Ocimum basilicum* extract in acute hyperlipidaemia induced by Triton WR-1339 in rats and its antioxidant property. *Phytother Res* 2006;20:1040-5.
13. Cignarella A, Nastasi M, Cavalli E, Puglisi L. Novel lipid-lowering properties of *Vaccinium myrtillus*. *L Tromb Res* 1996;84:311-22.
14. Khanna AK, Rizvi F, Chander R. Lipid lowering activity of *Phyllanthus niruri* in hyperlipemic rats. *J Ethnopharm* 2002;82:19-22.
15. Lauk L, Galati EM, Forestieri AM, Kirjavainen S, Trovato A. *Mucuna pruriens* infusion lowers cholesterol and total lipid plasma levels in the rats. *Phytother Res* 1989;3(Suppl. 6):263-4.
16. Otway S, Robinson DS. The effect of the nonionic detergent (Triton) on the removal of triglyceride fatty acids from the blood of the rats. *J Physiol* 1967;190:309-19.
17. Schurr PE, Schultz JR and Parkinson TM. Triton induced hyperlipidaemia in rats as an animal model for screening hypolipideamic drugs. *Lipids* 1972;7:69-74.
18. Del Bas JM, Fernández-Larrea J, Blay , Ardèvol A, Salvadó MJ, Arola L, Bladé C. Grape seed procyanidins improve atherosclerotic risk index and induce liver CYP7A1 and SHP expression in healthy rats. *FASEB J* 2005;19:479-81.
19. Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophages: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1983;52:223-61.
20. Shaffner T, Taylor K, Bartucci EJ, Fischer-Dzoga, K, Beeson JH S, Glagov S, Wissler RW. Arterial foam cells with distinct Immunomorphologic and histochemical features of macrophages. *Am J Pathol* 1980;100:57-80.
21. Ross R. Atherosclerosis: a problem of the biology of arterial wall cells and their interactions with blood components. *Atherosclerosis* 1981;1:293-311.
22. Napolitano M, Bravo E. Activation of protein Kinase C by phorbol esters in human macrophages reduces the metabolism of modified LDL by down-regulation of scavenger receptor activity. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;1488:1-17.
23. Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Ueda O, Sakaguchi H, Higashi T, Suzuki T, Takashima Y, Kawabe Y, Cynshi O, Wada Y, Honda M, Kurihara H, Aburatani H, Doi T, Matsumoto A, Azuma S, Noda T, Toyoda Y, Itakura H, Yazaki Y, Kodama T, et al. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 1997;386:292-6.
24. Yang L, Yang JB, Chen J, Yu GY, Zhou P, Lei L, Wang ZZ, Cy Chang C, Yang XY, Chang TY, Li BL. Enhancement of human ACAT1 gene expression to promote the macrophage-derived foam cell formation by dexamethasone. *Cell Res* 2004;14:315-23.
25. Bravo E, Amrani S, Aziz M, Harnafi H, Napolitano M. *Ocimum basilicum* ethanolic extract decreases cholesterol synthesis and lipid accumulation in human macrophages. *Fitoterapia* 2008;79(7-8):515-23.
26. Brindley DN. Metabolism of triacylglycerols. In: Vance DE, Vance J (Ed.). *Biochemistry of Lipids and Lipoproteins*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1991. pp. 171-201.
27. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989;320:915-22.
28. Esterbauer H, Gebicki J, Pulh H, Jürgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 1992;13:341-90.
29. Pinchuk I, Lichtenberg D. The mechanism of action of antioxidants against lipoprotein peroxidation, evaluation based on kinetic experiments. *Prog Lipid Res* 2002;41:279-314.

## STUDIO DELL'ATTIVITÀ ANTINFIAMMATORIA DELLA CURCUMINA VERSO *TOXOPLASMA GONDII* E CONTROLLO DELLA TOXOPLASMOSI CONGENITA

Maria Cristina Angelici (a), Andrea Matteucci (b), Serena Celani (a), Fiorella Malchiodi-Albedi (b)  
(a) Dipartimento di Malattie Infettive Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma  
(b) Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

### La curcumina

La curcumina è un diferuloilmetano (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>, nome IUPAC (1E,6E)-1,7-bis-(4-idrossi-3-metossifenil)-epta-1,6-dien-3,5-dione) ricavato dal rizoma carnoso della pianta erbacea perenne *Curcuma longa* (*Zingiberaceae*, stessa famiglia del Ginger), volgarmente detta Turmerico, che cresce nei climi tropicali ed è coltivata in India, Indonesia, Cina, Haiti e Giamaica. Essa rappresenta il componente principale del curry, ed è quindi normalmente utilizzata come spezia, ma per centinaia di anni ha costituito, in quei Paesi, un rimedio tradizionale il cui utilizzo in campo medico è documentato in scritti risalenti a oltre 2000 anni fa. Oggi la curcumina è usata in vari Paesi come additivo per la conservazione e come colorante (E100) dei cibi ma anche come integratore alimentare dalle proprietà antiossidanti e antinfiammatorie: viene commercializzata come integratore alimentare per la prevenzione delle malattie neurovegetative, contro la caduta dei capelli e per la cura di distorsioni e infiammazioni muscolari, specialmente a livello sportivo.

Le diverse potenzialità di questo principio attivo sono state studiate e documentate anche a livello scientifico allo scopo di identificarne un'applicabilità in campo terapeutico nella cura delle malattie infettive e non. I meccanismi d'azione della curcumina più descritti sono quelli di tipo antinfiammatorio, quali l'inibizione di COX-2 e 5-LOX (1) delle citochine infiammatorie e delle chinasi (PKA, PKC, CaMKII) (2) ma anche l'inibizione della proliferazione e trasformazione cellulare, la regolazione dell'induzione dell'apoptosi e l'attività antivirale. È descritta un'azione diretta sul fattore di trascrizione NF-κB con il blocco della produzione di TNF-α e AP-1 (3). Interagisce con i segnali della risposta infiammatoria non solo attraverso i recettori Toll-like, ma anche attraverso i recettori del TNF e della IL-1. Quindi è stato proposto che la curcumina blocca sia la produzione che l'azione del TNF-α.

Tali meccanismi d'azione suggeriscono la sua applicazione come principio attivo di tipo preventivo e curativo in campo oncologico (circa 800 lavori ne documentano tale attività *in vitro* e *in vivo*), contro malattie neurodegenerative, il morbo di Crohn, e l'AIDS (4). La curcumina è stata sperimentata anche contro diversi parassiti, Protozoi (*Plasmodium*, *Leishmania*, *Giardia*, *Eimeria*) e Nematodi (*Angiostrongylus cantonensis*), e diverse pubblicazioni ne documentano la capacità parassitocida al pari di quella battericida (5-13). Il dosaggio nell'uomo è stato già valutato tramite trials di fase I che hanno valutato una tolleranza e una non tossicità della curcumina fino al dosaggio massimo di 800mg/die, e trials di fase II che, trattando con questa concentrazione, hanno registrato un'ampia risposta nel trattamento del cancro, la psoriasi e la malattia d'Alzheimer (14-17).

A tutt'oggi sono 688 gli studi indicizzati su PubMed (oltre 400 dei quali pubblicati negli ultimi quattro anni) che confermano le notevoli proprietà anticancerogene, antiossidanti e antinfiammatorie della curcumina. Alcuni di questi studi segnalano anche un'attività di DNA-

damaging di questa sostanza e di induzione dell'apoptosi cellulare che essendo correlata con l'aumento di ROS intracellulare è un'attività pro-ossidante della curcumina. Tale attività la rende attiva contro il bersaglio della cellula cancerogena, ma essendo dose-dipendente viene valutata in genere per la sua somministrazione. L'assorbimento e l'utilizzazione a livello ematico della curcumina è attestato da alcuni lavori di farmacocinetica (18) che ne rivelano i metaboliti (glucoronidi e solfati di curcumina) nel plasma di volontari sani e di malati avanzati di cancro rispettivamente trattati con dosi massicce (10-12 g/die) e con dosi canoniche (3,6 g/die). È stata anche dimostrata una attività sinergica della curcumina con alcuni farmaci (19) e questo fatto è di particolare interesse in una previsione d'uso in associazione con terapie convenzionali. L'*American Food and Drug Administration* classifica la curcumina come sostanza GRAS (*General Recognition And Safety*), ovvero "Generalmente Riconosciuta Sicura" in quanto non teratogena e priva di effetti secondari, almeno all'interno dei dosaggi consentiti.

Dal 2005 a tutt'oggi i trials clinici avviati con curcumina sono 26 ([clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov)) per la cura sia di vari tipi di cancro sia di malattie neurodegenerative (20), ma nessuno è stato finora proposto per la valutazione di efficacia dell'attività antivirale e parassiticida della curcumina.

Sono stati infine prodotti sia alcuni analoghi sintetici della curcumina (21, 22), con modificazioni della struttura finalizzate a migliorarne le proprietà farmacologiche naturali, sia molecole ingegnerizzate della curcumina molto interessanti per il disegno futuro di nuovi farmaci a base di questo principio attivo (23, 24).

## Toxoplasmosi e terapie convenzionali

L'attività antinfiammatoria della curcumina può risultare utile nelle infezioni che coinvolgono la risposta cellulo-mediata dell'ospite come sono quelle di tipo parassitario. Un organismo eucariote infettante, anche se unicellulare, come nel caso dei Protozoi, conduce la sua vita da parassita attraverso varie fasi di un ciclo vitale complesso che comprende diversi stadi e sviluppa raffinati meccanismi di "escape" alla risposta immunitaria dell'ospite per sopravvivere. Nel caso di *Toxoplasma gondii*, il protozoo parassita agente patogeno della toxoplasmosi nell'uomo e negli animali, forme libere e infettanti si alternano a forme cistiche dormienti dello stesso organismo unicellulare per consentire al parassita di superare la fase in cui, internamente all'ospite, viene aggredito dalla cascata citochinica e infiammatoria della risposta tissutale. Tale forma cistica ha una grande valenza patogenetica sia perché è un passaggio del ciclo biologico nel quale il parassita rimane solo in vita latente, e quindi potenzialmente infettante, sia perché il mantenimento dello stadio cistico è dovuto al perdurare dello stato infiammatorio nel tessuto del paziente, con tutte le conseguenze dell'infiammazione cronica in termini di infiltrazione, modificazione e necrosi cellulare. Dato che *T. gondii* è un parassita con tropismo neurale e localizzazione delle cisti principalmente cerebrale (toxoplasmosi cerebrale) e oculare (toxoplasmosi oculare), il danno più grave a carico di questi tessuti nel corso di un'infezione cronica dovuta a questo parassita deriva proprio dagli effetti dell'infiammazione generata dalla risposta immunitaria dell'ospite a livello locale che porta alla formazione di consistenti foci necrotici e perdita della funzionalità dell'organo colpito (ascite, compromissione neurologica, cecità).

Da ciò è evidente quale importanza possa avere la possibilità di controllare tale stadio infiammatorio, oltre che l'infezione vera e propria da parte del parassita nella fase invasiva. Le terapie antinfiammatorie convenzionali non sono, però, applicabili nel caso delle parassitosi, perché, abbassando la barriera immunitaria dell'ospite in maniera drastica e generalizzata determinano un'invasività maggiore del parassita che può portare a infezione diffusa ed *exitus* negativo (toxoplasmosi opportunistica). Tali terapie, inoltre, producono i ben noti effetti secondari,

indesiderabili, specialmente in stato di gravidanza. Poiché è tipico della toxoplasmosi l'evento di trasmissione verticale madre-figlio dell'infezione (toxoplasmosi congenita), nel caso di una prima infezione in corso di gravidanza della madre non immune è di primaria importanza:

- 1) avere a disposizione un farmaco che oltre a combattere la prima infezione della madre serva ad impedire la trasmissione del parassita al feto attraverso la placenta;
- 2) avere la possibilità di impedire l'incistamento del parassita già trasmesso nei tessuti neurali del feto, con il successivo classico sviluppo dei danni a breve (aborto spontaneo, ascite, cretinismo) e a lunga distanza (corioretinite e cecità).

Il principio attivo della medicina tradizionale, la spiramicina, macrolide con effetto parassitostatico su *T. gondii* non è efficace contro la trasmissione in gravidanza perché non passa del tutto la barriera placentare, ma è il farmaco d'elezione per la toxoplasmosi attiva perché è molto efficace contro la forma libera del parassita. Lo schema terapeutico, comunque, nel caso di accertata prima infezione in gravidanza (25), consiste nella somministrazione di spiramicina, (3gr/die per almeno un mese) mantenuta per tutto il resto della gravidanza, meno che nei casi di provata trasmissione dell'infezione al feto tramite diagnosi prenatale (liquido amniotico positivo per la ricerca del parassita). In questi casi viene somministrata una terapia con farmaci in grado di diffondere attraverso la placenta (terapia "in utero") ovvero l'associazione di pirimetamina e sulfadiazina (26), entrambi inibitori del metabolismo dei folati, interferenti con la sintesi del DNA e parassitocidi. La supplementazione con acido folinico (pirimetamina + sulfadiazina per 21 giorni, // 21 giorni spiramicina + acido folinico fino al parto) è obbligatoria in questa terapia a causa della depressione midollare da essa indotta con rischio reale di anemia megaloblastica.

Entrambi i protocolli mostrano difetti gravi, se si pensa che la spiramicina raggiunge solo in piccole dosi il feto, non passa la barriera mesencefalica e, soprattutto non è efficace del tutto contro le cisti delle quali si dimostra la non totale soppressione in corso di trattamento (27). La pirimetamina, invece, supera le barriere ed è efficace contro le cisti, perché diffonde nella parete cistica, ma è teratogena e non può essere usata prima della 18<sup>a</sup> settimana di gestazione. Quindi non copre le infezioni periconcezionali e quelle del primo trimestre che sono quelle a maggior rischio d'aborto (25, 26). La sulfadiazina, infine, è di nota tossicità epatica, per cui in corso di terapia si rendono necessari continui controlli sugli effetti secondari alla madre e al nascituro.

## **Toxoplasmosi e terapie non convenzionali: nostro studio preliminare sull'uso della curcumina**

La già documentata attività battericida e parassiticida ma soprattutto l'attività antinfiammatoria della curcumina, ci ha suggerito una sperimentazione *in vitro* della potenzialità di questa sostanza di origine naturale contro *T. gondii*. In particolare la capacità inibitoria sulla produzione del TNF- $\alpha$ , tramite l'interferenza con il fattore di trascrizione genica NF-kB consentirebbe, con un meccanismo molecolare e non ormonale, di impedire la cascata citochinica deprimendo la risposta infiammatoria. Questa azione potrebbe controllare la formazione delle cisti costringendo il parassita a non incistarsi e quindi ad essere aggredibile con la terapia convenzionale. Il modello, tutto da sperimentare, potrebbe portare a disegnare una terapia con curcumina in associazione con spiramicina, nei casi di prima infezione in gravidanza e quindi con rischio di trasmissione al feto. La fattibilità del disegno è assolutamente confortata dal fatto che questo principio naturale ha già passato tutti i controlli per l'antiteratogenicità ed è dichiarato sicuro.

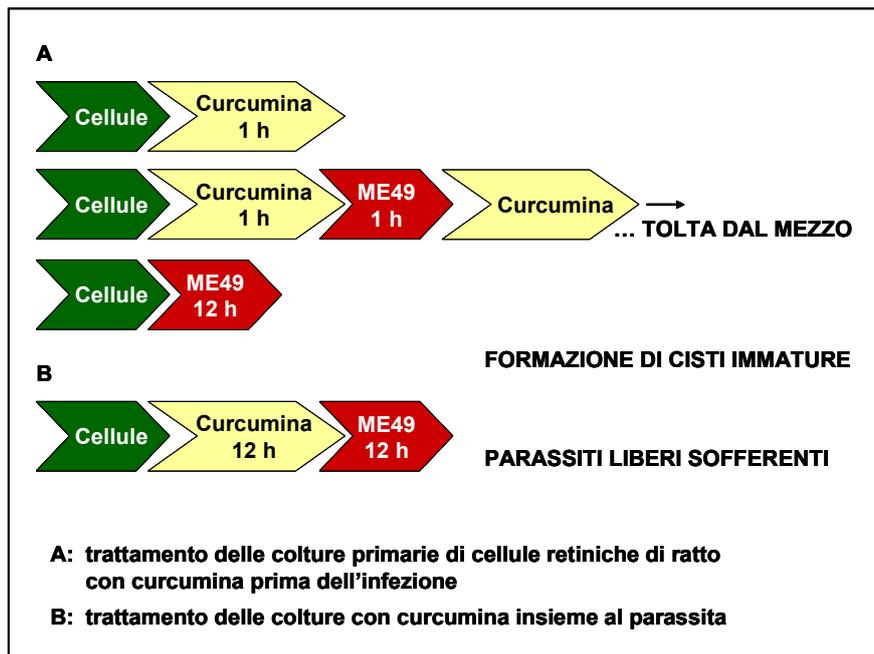
La parte sperimentale di questo nostro studio è stata resa possibile dalla messa a punto di un modello cellulare *in vitro*, del tutto nuovo, costituito da una coltura primaria di cellule di retina espianata da embrioni di ratto e sperimentalmente infettata *in vitro* con un ceppo cistogeno di *T.*

*gondii*, mantenuto in laboratorio. In un precedente studio, è stata dimostrata la capacità di queste cellule retiniche di rimanere vitali (28) e di produrre per un breve periodo dopo la semina, e sotto stimolazione dell'infezione con *T. gondii* citochine quali il TNF- $\alpha$ , che, a loro volta, inducono la trasformazione del parassita in forma cistogena (29). Con questo modello, è stato possibile osservare lo svolgimento del processo infettivo così come si verifica naturalmente nei tessuti dell'ospite e quindi la formazione di cisti mature da parte di questo parassita con una parete cistica evidenziata tramite marcatura immunocitochimica.

Per valutare un'eventuale influenza della curcumina sulla formazione di cisti da parte del parassita, a causa dell'interferenza del principio attivo con la produzione del TNF- $\alpha$  da parte delle cellule retiniche infettate, abbiamo proceduto a trattare le colture con curcumina concentrata 15 $\mu$ M e sciolta in etanolo con dose e tempo di somministrazione già utilizzati su queste cellule in esperimenti simili (30), in due modi distinti (Figura 1):

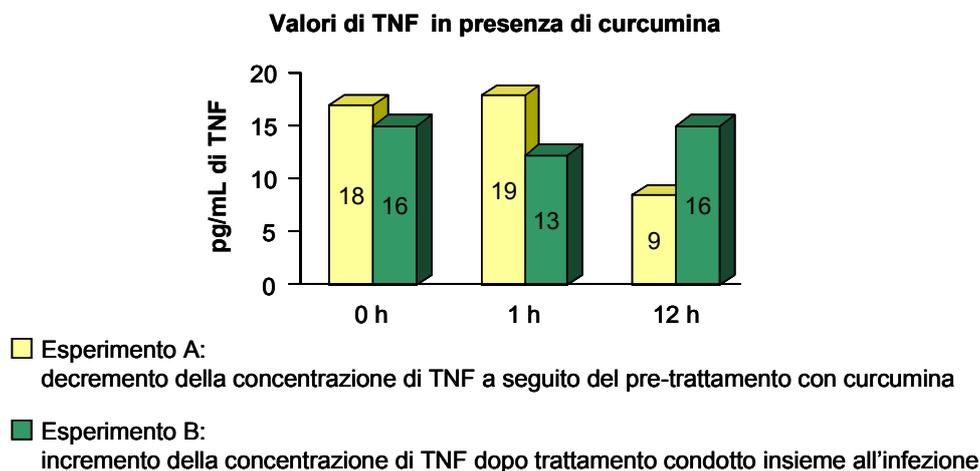
- 1) pre-trattando con curcumina per 1 ora prima dell'infezione e per 1 ora insieme all'infezione con il ceppo cistogeno ME49, per poi sostituire il mezzo di cultura, sottraendo la curcumina, e lasciare crescere il parassita per altre 12 ore;
- 2) trattando le cellule con curcumina e, allo stesso tempo, infettando con il parassita per poi protrarre trattamento e infezione insieme per 12 ore.

Questi esperimenti sono stati condotti previa valutazione sperimentale che il quantitativo di etanolo in cui era sciolta la dose di curcumina utilizzata non fosse tossico da solo per le cellule. In entrambi i casi la rivelazione del risultato è data sia dalla quantizzazione del TNF- $\alpha$  prodotto dalle cellule prima e dopo il trattamento con metodo di rilevamento ELISA che utilizza un monoclonale anti-TNF- $\alpha$  di ratto (R&B), sia dall'osservazione delle cisti stesse al microscopio ottico e a fluorescenza, previa marcatura in immunofluorescenza di una proteina della parete cistica.



**Figura 1. Schema del trattamento con curcumina delle colture cellulari di retina infettate con *Toxoplasma gondii* secondo le due modalità: A) colture incubate per 2 ore con curcumina prima di essere infettate per ulteriori 12 ore con il parassita e senza curcumina. B) colture infettate con *Toxoplasma gondii* e trattate con curcumina insieme per 12 ore**

I risultati di questo semplice e duplice modello (confermati con la sua ripetibilità) hanno dimostrato che, dopo 12 ore di infezione, il pretrattamento delle cellule (caso A nella Figura 2) conduce, in termini di pg/mL, ad un modesto incremento seguito da una drastica riduzione della produzione della citochina anche in presenza del parassita, mentre il trattamento contemporaneo all'infezione (caso B nella Figura 2) porta ad un modesto decremento e successivo incremento della produzione della citochina.



**Figura 2. Variazione di produzione della citochina TNF- $\alpha$  nelle colture di retina infettate con *Toxoplasma gondii* e trattate con curcumina secondo protocolli sopra descritti A e B**

L'osservazione dei parassiti e delle eventuali cisti, nei due casi A e B (dati non riportati) ci ha fatto registrare nel caso A una mancanza pressoché totale di cisti e, anzi, la presenza di un elevato numero di parassiti poco vitali e citologicamente trasformati (per la presenza di una protrusione del rostro, parte anteriore del parassita, probabilmente dovuta ad un disequilibrio ionico intracellulare) e nel caso B una presenza di cisti non mature (pseudocisti). La differenza tra i due casi è spiegabile in questo modo: nel primo caso, i parassiti infettanti non sono riusciti a formare cisti in un ambiente in cui la risposta infiammatoria non ha raggiunto, in presenza di curcumina, un livello sufficiente per indurre la conversione del parassita nello stadio cistico, e inoltre hanno subito un danno citoplasmatico diretto dovuto all'attività parassitostatica della curcumina; nel secondo caso i parassiti hanno trovato una certa concentrazione di TNF- $\alpha$  nel terreno, già prodotto dalle cellule non trattate, che li ha indotti a formare cisti, mai arrivate a maturazione (pseudo cisti) perché la produzione della citochina pur essendo continua è controllata dalla presenza di curcumina.

Queste osservazioni suggeriscono un'attività sia parassiticida che anticistogena da parte della curcumina nei confronti del parassita studiato e lasciano supporre che il pretrattamento della cultura conduca ad un impedimento dello sviluppo dell'infezione stessa. In questo modo si è sfruttata la qualità sia antinfiammatoria che citostatica mostrata dalla curcumina in molte altre applicazioni e settori della medicina, per controllare l'infezione da *Toxoplasma gondii*.

La migliore attività del principio attivo nell'esperimento A piuttosto che nell'esperimento B suggerisce la possibilità teorica di utilizzarlo come principio preventivo della toxoplasmosi in donne suscettibili in corso di gravidanza o anche semplicemente in epoca feconda con progetto di maternità, per poi proseguire all'assunzione in associazione con la spiramicina, nei casi d'infezione attiva. Questo protocollo terapeutico consentirebbe di prevenire la formazione delle

cisti da parte della sostanza naturale, senza abbassare lo stato immunitario della paziente e consentire, nello stesso tempo, l'impedimento della replicazione dei parassiti liberi, prima che raggiungano la barriera placentare.

Questo corrisponde all'ipotesi di vedere la curcumina come un integratore coadiuvante della terapia classica con spiramicina, se assunta sin dall'inizio dell'infezione.

## Disegno sperimentale futuro

Pur sottolineando il fatto che le colture primarie *in vitro* di cellule di retina di ratto, rappresentano un modello particolarmente interessante in quanto utilizza cellule non trasformate, non stabilizzate e produttrici di segnali di comunicazione intercellulare, che, quindi, per un breve arco di tempo, mostrano la valenza di un modello *in vivo*, è ovvio che i nostri risultati devono essere valutati con la sperimentazione nel modello *in vivo*.

È necessario allestire un sistema di trattamento farmacologico del modello murino nel corso d'infezione sperimentale della femmina gravida, con uno studio caso-controllo su individui trattati con la sola terapia classica (gruppo di controllo) e con l'associazione proposta, sia per valutare l'efficienza dell'associazione che per conoscerne gli eventuali effetti secondari dose-dipendenti su gravida e feto di cui ancora non si sa nulla. Volendo stabilire, inoltre, la valenza preventiva della sostanza naturale, sarà necessario anche allestire un altro studio caso-controllo in cui gli esemplari siano trattati e non, prima e dopo lo stato gravidico e l'infezione sperimentalmente indotta.

Comunque questi studi risultano stimolanti nel difficile percorso di scelta dei metodi di controllo di un'infezione che, essendo sia della madre che del figlio, ed essendo dovuta ad un parassita in grado di sfuggire all'azione protettiva della risposta immunitaria della madre, ancora oggi pone molte difficoltà terapeutiche.

## Bibliografia

1. Rao CV. Regulation of COX and LOX by curcumin. *Adv Exp Med Biol* 2007;595:213-26. Review.
2. Cheung KL, Khor TO, Kong AN. Synergistic Effect of Combination of Phenethyl Isothiocyanate and Sulforaphane or Curcumin and Sulforaphane in the Inhibition of Inflammation. *Pharm Res* 2009;26(1):224-31.
3. Sandur SK, Ichikawa H., Pandey MK, Kunnumakkara AB, Sung B., Sethi G., Aggarwal BB. Role of pro-oxidants and antioxidants in the anti-inflammatory and apoptotic effects of curcumin (diferuloylmethane). *Free Radic Biol Med* 2007;43(4):568-80.
4. Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, auto-immune, and neoplastic diseases. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41(1):40-59.
5. Cui L, Miao J, Wang J, Li Q, Cui L. *Plasmodium falciparum*: development of a transgenic line for screening antimalarials using firefly luciferase as the reporter. *Exp Parasitol* 2008;120(1):80-7.
6. Das R, Roy A, Dutta N, Majumder HK. Reactive oxygen species and imbalance of calcium homeostasis contributes to curcumin induced programmed cell death in *Leishmania donovani*. *Apoptosis* 2008;13(7):867-82.
7. Shih PC, Lee HH, Lai SC, Chen KM, Jiang ST, Chen YF, Shioh SJ. Efficacy of curcumin therapy against *Angiostrongylus cantonensis*-induced eosinophilic meningitis. *J Helminthol* 2007;81(1):1-5.

8. Cui L, Miao J, Cui L, Cytotoxic effect of curcumin on malaria parasite *Plasmodium falciparum*: inhibition of histone acetylation and generation of reactive oxygen species. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(2):488-94.
9. Pérez-Arriga L, Mendoza-Magana ML, Cortés-Zarate R, Corona-Rivera A, Bobadilla-Morales L, Troyo-Sanromán R, Ramirez-Herrera MA. Cytotoxic effect of curcumin on *Giardia lamblia* trophozoites. *Acta Trop* 2006;98(2):152-61.
10. Nandakumar DN, Nagaraj VA, Vathsala PG, Rangarajan P, Padmanaban G. Curcumin-artemisinin combination therapy for malaria. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(5):1859-60.
11. Reddy RC, Vatsala PG, Keshamouni VG, Padmanaban G, Rangarajan PN. Curcumin for malaria therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;326(2):472-4.
12. Alves LV, do Canto-Cavalheiro MM, Cysne-Finkelstein L, Leon L. *In vitro* antiproliferative effects of several diaryl derivatives on *Leishmania* spp. *Biol Pharm Bull* 2003;26(4):453-6.
13. Allen PC, Danforth HD, Augustine PC, Dietary modulation of avian coccidiosis. *Int J Parasitol* 1998;28(7):1131-40. Review.
14. Hsu CH, Cheng AL. Clinical studies with curcumin. *Adv Exp Med Biol* 2007;595:471-480 Review.
15. Kelley BJ, Knopman DS. Alternative medicine and Alzheimer disease. *Neurologist* 2008;14(5):299-306.
16. Begum AN, Jones MR, Lim GP, Morihara T, Kim P, Heath DD, Rock CL, Pruitt MA, Yang F, Hudspeth B, Hu S, Faull KF, Teter B, Cole GM, Frautschy SA. Curcumin structure-function, bioavailability, and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;326(1):196-208.
17. Baum L, Lam CW, Cheung SK, Kwok T, Lui V, Tsoh J, Lam L, Leung V, Hui E, Ng C, Woo J, Chiu HF, Goggins WB, Zee BC, Cheng KF, Fong CY, Wong A, Mok H, Chow MS, Ho PC, Ip SP, Ho CS, Yu XW, Lai CY, Chan MH, Szeto S, Chan IH, Mok V, Six-month randomized, placebo-controlled, double-blind, pilot clinical trial of curcumin in patients with Alzheimer disease. *J Clin Psychopharmacol* 2008;28(1):110-3.
18. Vareed SK, Kakarala M, Ruffin MT, Crowell JA, Normolle DP, Djuric Z, Brenner DE. Pharmacokinetics of curcumin conjugate metabolites in healthy human subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008 ;17(6):1411-7.
19. Danilenko M, Studzinski GP. Enhancement by other compounds of the anti-cancer activity of vitamin D(3) and its analogs. *Exp Cell Res* 2004;298(2):339-58. Review.
20. Sharma RA, Euden SA, Platton SL, Cooke D.N, Shafayat A., Hewitt HR, Marczylo TH, Morgan B, Hemingway D, Plummer SM, Pirmohamed M, Gescher AJ, Steward WP. Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. *Clin Cancer Res* 2004;10(20):6847-54.
21. Kasinski AL, Du Y, Thomas SL, Zhao J, Khuri FR, Wang CY, Shoji M, Sun A, Snyder JP, Liotta D, Fu H. Inhibition of I $\kappa$ B kinase-nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway by 3,5-bis(2-fluorobenzylidene)piperidin-4-one (EF24), a novel monoketone analog of curcumin. *Mol Pharmacol* 2008 ;74(3):654-61.
22. Pae HO, Jeong SO, Kim SH, Song YS, Kim SK, Chai KY, Chung HT. Dimethoxycurcumin, a synthetic curcumin analogue with higher metabolic stability, inhibits NO production, inducible NO synthase expression and NF- $\kappa$ B activation in RAW264.7 macrophages activated with LPS. *Mol Nutr Food Res* 2008;52(9):1082-91.
23. Katsuyama Y, Matsuzawa M, Funa N, Horinouchi S. *In vitro* synthesis of curcuminoids by type III polyketide synthase from *Oryza sativa*. *J Biol Chem*. 2007;282(52):37702-9.
24. Katsuyama Y, Matsuzawa M, Funa N, Horinouchi S. Production of curcuminoids by *Escherichia coli* carrying an artificial biosynthesis pathway. *Microbiology* 2008;154(Pt 9):2620-8.
25. Wallon M, Liou C, Garner P, Peyron F. Congenital toxoplasmosis: systematic review of evidence of efficacy of treatment in pregnancy. *BMJ* 1999;318:1511-4 .

26. Montoya JG, Remington JS. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis* 2008;47(4):554-66.
27. Grujić J, Djurković-Djaković O, Nikolić A., Klun I., Bobić B., Effectiveness of spiramycin in murine models of acute and chronic toxoplasmosis. *Int J Antimicrob Agents* 2005;25(3):226-30.
28. Malchiodi-Albedi F, Matteucci A, Bernardo A, Minghetti L. PPAR-gamma, Microglial Cells, and Ocular Inflammation: New Venues for Potential Therapeutic Approaches. *PPAR Res* 2008;2008:295784.
29. Angelici MC, Celani S, Malchiodi Albedi F, Matteucci A. Primary cultures of rat retina as a cell model for studying *Toxoplasma gondii* interconversion. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 2005;52(2):38S.
30. Matteucci A, Frank C, Domenici MR, Balduzzi M, Paradisi S, Carnovale-Scalzo G, Scoria G, Malchiodi-Albedi F. Curcumin treatment protects rat retinal neurons against excitotoxicity: effect on N-methyl-D: -aspartate-induced intracellular Ca(2+) increase. *Exp Brain Res* 2005;167(4):641-8.

# MODELLI SPERIMENTALI NELLA RICERCA DI NUOVI ANALGESICI E ANTINFIAMMATORI DI ORIGINE VEGETALE

Mariantonella Colucci, Marica Matriota, Amalia Di Giannuario, Stefano Pieretti  
*Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## Introduzione

Da diverso tempo uno dei campi di interesse del nostro gruppo di ricerca riguarda la valutazione dei potenziali effetti analgesici e antinfiammatori di nuove entità chimiche di origine vegetale. La strategia sperimentale che adottiamo in tal senso prevede l'utilizzo di modelli sperimentali *ex vivo* e modelli di nocicezione e infiammazione *in vivo*.

## Modelli sperimentali *ex vivo*

L'ileo isolato di cavia è un metodo ampiamente utilizzato negli studi di farmacologia classica. Tale preparato permette di valutare gli effetti di nuovi composti sulle contrazioni della muscolatura liscia intestinale spontanee o indotte chimicamente ed elettricamente, consentendo di rilevare l'attività spasmogena o antispastica dei composti. Gli effetti indotti dai farmaci possono essere eccitatori come quelli causati dall'esposizione dell'organo all'aceticolina, che attivando i recettori colinergici è in grado di promuovere le contrazioni della muscolatura liscia intestinale, o di tipo inibitorio come quello prodotto dalla morfina (agonista dei recettori oppioidi  $\mu$ ) che inibisce le contrazioni dell'ileo stimolato elettricamente. Il modello consente di rilevare sia le proprietà farmacologiche dei nuovi composti, sia i sistemi recettoriali responsabili di tali effetti, risultando un valido metodo per studi di screening funzionale.

## Modelli sperimentali *in vivo*

I modelli sperimentali utilizzati nel nostro gruppo di lavoro permettono di determinare *in vivo* le proprietà oppioido-simili, aspirino-simili o steroideo-simili di nuovi composti con potenziale attività analgesica e/o antinfiammatoria.

I modelli sperimentali di dolore e infiammazione *in vivo* utilizzati, si avvalgono di valutazioni delle risposte comportamentali indotte nel topo o nel ratto da stimoli nocicettivi o da sostanze proinfiammatorie. In particolare la capacità dei nuovi composti di ridurre negli animali: i) le risposte di evitamento indotte da stimoli nocicettivi termici (*hot plate test* o *tail flick test*) o chimici (formalina, nel *formalin test* o acido acetico, nel *writhing test*); ii) l'entità dell'edema della zampa causato dalla somministrazione locale di sostanze flogogene quali lo zimosan o la carragenina, denota l'attività analgesica o antinfiammatoria dei nuovi composti. I nostri studi si avvalgono inoltre di test *in vivo* per mezzo dei quali è possibile verificare ulteriori proprietà farmacologiche o eventuali effetti indesiderati dei nuovi composti. In particolare sulla base dei risultati ottenuti nei test *in vivo* o *in vitro*, sono in genere effettuati ulteriori studi per la

determinazione dei potenziali effetti ipnotici, antidepressivi, antiepilettici, sull'attività locomotoria, sulla coordinazione motoria ai quali si associano studi di tossicità effettuati in accordo con le linee guida promulgate dalla *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD).

## **Valutazione degli effetti centrali indotti dalla somministrazione di CMP1, diterpenoide isolato dalle parti aeree di *Salvia cinnabarina***

In uno studio condotto di recente nel nostro laboratorio in collaborazione con il prof. Romussi dell'Università di Genova e il prof. Mascolo dell'Università di Napoli, abbiamo valutato gli effetti centrali prodotti da un diterpenoide secoisopimarano isolato dalle parti aeree di *Salvia cinnabarina* e denominato CMP1. Il genere *Salvia* include numerose specie diffuse in tutto il mondo e ampiamente utilizzate nella medicina tradizionale per le proprietà antiossidanti, antibatteriche, antinfiammatorie, antipiretiche e allucinogene. Le proprietà farmacologiche dei derivati della *Salvia* sono attribuibili alla presenza in queste piante di composti attivi quali flavonoidi, olii essenziali, diterpeni, triterpeni. In studi *in vitro* e *in vivo* il CMP1 mostra attività spasmolitica nell'ileo di cavia (1), inibisce la motilità intestinale nel topo (2), induce contrazioni nella vescica di ratto (3) e produce un marcato effetto ipotensivo nel ratto (4).

Nel nostro lavoro, abbiamo approfondito gli effetti *in vivo* prodotti dal CMP1, a partire da studi di nocicezione. Nel test della formalina, la somministrazione intraperitoneale (i.p.) di CMP1, alla dose di 10 mg/kg, riduce le risposte nocicettive nella prima fase, ma non nella seconda fase del test della formalina. Il CMP1 somministrato i.p. alla stessa dose, non mostra attività analgesica nei test di dolore indotto da stimoli termici (hot plate o tail flick tests) né effetti antinfiammatori, in quanto risulta incapace di ridurre l'edema indotto dalla somministrazione di zymosan al 1% nel sottocute dorsale della zampa del topo. Il CMP1 (10 mg/kg i.p.) ha invece attività ansiolitica in animali sottoposti al test dell'elevated plus maze. Infatti il CMP1 aumenta significativamente il tempo di permanenza degli animali nelle braccia aperte così come il numero di ingressi nelle braccia aperte del maze. Il CMP1, alla stessa dose, ha effetti sedativi in quanto prolunga la durata del sonno indotto dalla somministrazione i.p. di pentobarbital (50 mg/kg). Il CMP1 non mostra effetti antidepressivi nel test del nuoto forzato. Il CMP1 alla dose di 10 mg/kg i.p. non altera l'attività locomotoria del topo mentre alla dose di 100 mg/kg i.p. determina un'evidente ipomotilità. Uno studio di tossicità, effettuato utilizzando il metodo per la valutazione della tossicità orale acuta (OECD, ATC 423), indica che il CMP1 può essere inserito nella categoria 4 rispetto al *Globally Harmonised Classification System* (GHS), con una stima di LD50 pari a 500 mg/kg per os.

Infine, abbiamo valutato gli effetti prodotti da una serie di derivati sintetizzati a partire da CMP1 sulle contrazioni indotte da acetilcolina esogena sull'ileo isolato di cavia, allo scopo di identificare molecole più potenti di CMP1. I nostri risultati dimostrano che il derivato piperididico e il derivato dietilamidico sono più potenti di CMP1 nella riduzione delle contrazioni ileali indotte da acetilcolina. In studi attualmente in corso nel nostro laboratorio stiamo infine valutando gli effetti prodotti *in vivo* e *in vitro* dai derivati del CMP1 che sembrano essere farmacologicamente più interessanti.

## Bibliografia

1. Romussi G, Ciarallo G, Bisio A, Fontana N, De Simone F, De Tommasi N, Mascolo N, Pinto L. A new diterpenoid with antispasmodic activity from *Salvia cinnabarina*. *Planta Med* 2001;67:153-5.
2. Capasso R, Izzo AA, Romussi G, Capasso F, De Tommasi N, Bisio A, Mascolo N. A secoisopimarane diterpenoid from *Salvia cinnabarina* inhibits rat urinary bladder contractility *in vitro*. *Planta Med* 2004a;70:185-8.
3. Capasso R, Izzo AA, Capasso F, Romussi G, Bisio A, Mascolo N. A diterpenoid from *Salvia cinnabarina* inhibits mouse intestinal motility *in vivo*. *Planta Med* 2004b;70:375-7.
4. Alfieri A, Maione F, Bisio A, Romussi G, Mascolo N, Cicala C. Effect of a diterpenoid from *Salvia Cinnabarina* on arterial blood pressure in rats. *Phytother Res* 2007;21:690-2.

## **II SESSIONE**

**Olio essenziale di *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil)**



# STUDI PRECLINICI SULL'ATTIVITÀ ANTIFUNGINA DELL'OLIO ESSENZIALE DI *MELALEUCA ALTERNIFOLIA* (TEA TREE OIL) E DEL SUO PRINCIPALE COMPONENTE TERPINEN-4-OLO

Francesca Mondello (a), Flavia De Bernardis (a), Antonietta Girolamo (a), Giuseppe Salvatore (b), Antonio Cassone (a)

(a) Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Accademia di Storia dell'Arte Sanitaria, Roma

## Introduzione

Recenti studi scientifici hanno messo in luce le grandi potenzialità terapeutiche del *Tea Tree Oil* (TTO), un olio essenziale ottenuto dalla distillazione a vapore delle foglie della pianta *Melaleuca alternifolia* Cheel originaria dell'Australia. Infatti tale sostanza possiede proprietà antibatteriche, antifungine, antivirali, antinfiammatorie ed Immunomodulanti (1). Ultimamente il TTO viene da molti considerato, sulla base di saggi di attività *in vitro* e *in vivo*, quale potenziale approccio terapeutico alternativo per il trattamento delle micosi, in particolare della candidosi vulvovaginale, infezione spesso ricorrente e refrattaria alla terapia antimicotica convenzionale. Prove dimostrative dell'efficacia *in vivo* non sono state ancora ottenute e chiaramente riportate in studi clinici e pre-clinici controllati.

In un nostro precedente lavoro (2) abbiamo dimostrato per la prima volta la capacità del TTO di accelerare la *clearance* di *Candida albicans* in un modello di vaginite sperimentale nella ratte.

Inoltre, poiché prove dell'efficacia dei singoli componenti del TTO *in vivo* di questa strategia terapeutica non erano ancora state ancora ottenute e chiaramente riportate in studi controllati, abbiamo voluto, sulla base dei nostri promettenti risultati, valutare e comparare: 1) l'attività antifungina *in vitro* dei due principali costituenti del TTO, terpinene-4-olo e 1,8-cineolo, con metodi standardizzati (3), in 49 ceppi clinici di *C. albicans* sensibili e resistenti al fluconazolo (FCZ) e/o all'itraconazolo (ITR); 2) l'attività antifungina *in vivo* del terpinene-4-olo in un modello di vaginite sperimentale con ratte ovariectomizzate e mantenute sotto estrogeni con ceppi di *C. albicans* sensibili o resistenti a FCZ e/o ITR (4).

## Risultati *in vitro*

La composizione del TTO utilizzato in questo studio è stata analizzata mediante gascromatografia (GC-FID) e gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS) (2, 6). I costituenti chimici principali del campione di TTO sono risultati conformi alla norma internazionale Standard ISO 4730 (5), e vengono qui riportati in ordine decrescente: 1) terpinene-4-olo 42,35%, 2)  $\gamma$ -terpinene 20,65%, 3)  $\alpha$ -terpinene 9,76%, 4) terpinolene 3,71%, 5) 1,8-cineolo 3,57%, 6)  $\alpha$ -terpineolo 3,09%, 7) p-cymene 2,82%, 8)  $\alpha$ -pinene 2,42%, 9) limonene 1,75%, 10)  $\beta$ -cadinene 1,05%, 11)  $\alpha$ -thujene 0,94%, 12) aromadendrene 0,94%, 13) myrcene 0,87%, 14)  $\beta$ -pinene 0,73%, 15) sabinene 0,40%, 16)  $\alpha$ -phellandrene 0,34%.

Nella Tabella 1 viene dimostrato come TTO, terpinene-4-olo e 1,8 cineolo siano stati attivi

*in vitro* sia nei confronti di ceppi di *C. albicans* sensibili, sia nei confronti di ceppi resistenti al fluconazolo (FCZ) e all'itraconazolo (ITR), con minime concentrazioni inibenti il 90% dei ceppi testati (MIC<sub>90</sub>) che variano dallo 0,25-0,5% v/v, allo 0,06% v/v e al 4% v/v, rispettivamente. Inoltre le MIC<sub>90</sub> del terpinene-4-olo sono risultate sempre più basse di quelle del TTO, anche per i ceppi di *C. albicans* resistenti. Le attività antifungine (MIC<sub>90</sub>) del terpinene-4-olo (0,06% v/v) e dell'1,8-cineolo (4% v/v) sono risultati *in vitro*, rispettivamente, due volte inferiori e quattro volte più elevate dell'attività del TTO (MIC<sub>90</sub>= 0,25% v/v) per tutti i ceppi di *C. albicans* sensibili. In particolare, i quattordici ceppi di *C. albicans* resistenti a FCZ e/o ITR hanno mostrato MIC<sub>90</sub> per il terpinene-4-olo (0,06% v/v) e per l'1,8-cineolo (4% v/v) rispettivamente tre volte inferiori e tre volte più elevate dell'attività antifungina del TTO (MIC<sub>90</sub> = 0,5% v/v), del tutto sovrapponibili a quelle dei ceppi azolo-sensibili. Nella stessa Tabella viene inoltre evidenziato come la minima attività fungicida (MFC) del terpinene-4-olo *in vitro* sia stata generalmente equivalente all'attività candistica e inferiore alla MFC del TTO.

**Tabella 1. Attività fungistica e fungicida di tea tree oil, di terpinene-4-olo, di 1,8 cineolo nei confronti di ceppi di *C. albicans* sensibili e resistenti agli azolici**

Antimicotico <sup>a</sup>	Microrganismo							
	<i>Candida albicans</i> <sup>b</sup> (35 ceppi testati)				<i>Candida albicans</i> <sup>c</sup> (14 ceppi testati)			
	MIC <sub>50</sub> <sup>d</sup>	MIC <sub>90</sub>	MFC <sub>50</sub> <sup>d</sup>	MFC <sub>90</sub>	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	MFC <sub>50</sub>	MFC <sub>90</sub>
TTO	0,125	0,25	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5
TERP	0,03	0,06	0,03	0,06	0,06	0,06	0,25	0,5
CIN	2,0	4,0	2,0	2,0	4,0	4,0	4,0	4,0
FCZ	0,125	0,25	>64,0	>64,0	64,0 (7) <sup>c</sup>	64,0	>64,0	>64,0
ITR	0,03	0,03	>4,0	>4,0	4,0 (13)	4,0	>4,0 (13)	>4,0

<sup>a</sup> Fluconazolo (FCZ); Itraconazolo (ITR).

<sup>b</sup> Ceppi sensibili a FCZ e ITR.

<sup>c</sup> Ceppi resistenti a FCZ o a ITR; in parentesi numero di ceppi resistenti: 7 a FCZ e 13 a ITR, 6 ad entrambe.

<sup>d</sup> Le MIC e le MFC sono espresse in mg/L (FCZ e ITR) o in % v/v (TTO, TERP, CIN); MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub> minime concentrazioni inibenti il 50% e il 90% dei ceppi testati rispettivamente; MFC<sub>50</sub>, MFC<sub>90</sub> minime concentrazioni fungicide il 50% e il 90% dei ceppi testati rispettivamente.

## Risultati *in vivo*

Gli studi preclinici per valutare l'attività antifungina *in vivo* del TTO e del terpinene-4-olo sono stati condotti utilizzando un modello di vaginite sperimentale con ratte ovariectomizzate e mantenute sotto estrogeni con ceppi di *C. albicans* sensibili o resistenti a FCZ e/o ITR.

Le ratte Wistar, ovariectomizzate, sono state mantenute in pseudoestro mediante estrogeni (benzoato di estradiolo, 0,5 mg sottocute). Gli animali sono stati inoculati in vagina con 10<sup>7</sup> cellule (0,1 mL) di lievito. Il fluido vaginale veniva poi prelevato da ciascun animale ogni due giorni per determinare il numero di unità formanti colonie (CFU) di *C. albicans* e alcune aliquote del fluido vaginale venivano anche esaminate microscopicamente. Il TTO (0,1 mL al 5%, al 2,5%, all'1% v/v in 0,001% v/v Tween 80) e terpinene-4-olo (0,1 mL all'1% v/v in 0,001% v/v Tween 80) erano somministrati in vagina dopo 1, 24, 48 ore dal *challenge* intravaginale con *C. albicans* (10<sup>7</sup> cellule in 0,1 mL). Le ratte che ricevevano FCZ (tre dosi di 100 µg) o Tween 80 servivano come controlli positivi o negativi rispettivamente. Questi esperimenti venivano condotti con un ceppo di *C. albicans* FCZ sensibile e uno FCZ resistente.

Sono stati inoltre eseguiti due esperimenti indipendenti con ciascun ceppo fungino e in ogni esperimento si utilizzavano cinque ratte.

Nella Figura 1 il TTO e il terpinene-4-olo sono risultati molto efficaci nell'eliminazione del fungo dalla vagina delle ratte infettate con un ceppo di *C. albicans* altamente vaginopatico, sensibile a FCZ, e trattate per i primi tre giorni dell'infezione con una dose singola giornaliera di TTO o di terpinene-4-olo. Specificamente, tre dosi *post-challenge* di terpinene-4-olo all'1% v/v, paragonabili all'azione del TTO al 2,5% v/v, hanno risolto l'infezione con *C. albicans* con la stessa efficacia del FCZ (nel ceppo ad esso sensibile) e efficacemente anche nel ceppo resistente a FCZ.

Invece tre dosi *post-challenge* di TTO al 5% v/v e di terpinene-4-olo all'1% v/v sono risultate altamente significative nel risolvere efficacemente l'infezione vaginale con *C. albicans*, resistente a fluconazolo (FCZ), nelle ratte infettate sperimentalmente. Tuttavia TTO 5% v/v risulta più attivo del terpinene-4-olo 1% v/v nel risolvere l'infezione causata da *C. albicans* farmaco-resistenti (Figura 2).

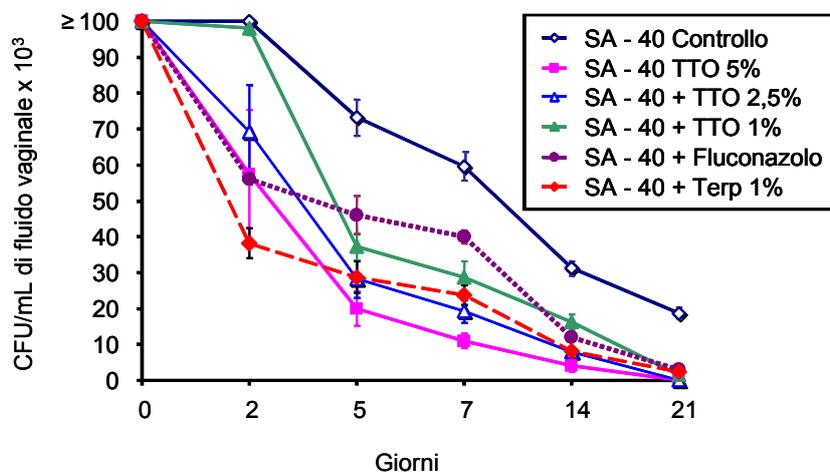


Figura 1. Attività antimicrobica del TTO e del terpinene-4-olo, a varie concentrazioni, in ratte con vaginite sperimentale estrogeno-dipendente indotta da un ceppo di *C. albicans* sensibile al fluconazolo

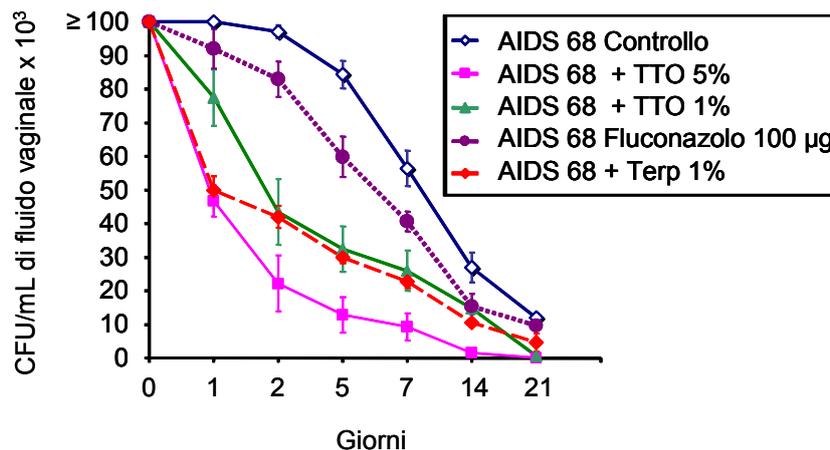


Figura 2. Attività antimicrobica del TTO e del terpinene-4-olo, a varie concentrazioni, in ratte con vaginite sperimentale estrogeno-dipendente indotta da un ceppo di *C. albicans* resistente al fluconazolo

## Conclusioni

Questi dati sperimentali hanno dato un sostanziale supporto a precedenti evidenze empiriche e scientifiche sull'efficacia del trattamento della candidosi vaginale con TTO, soprattutto quando l'infezione è causata da specie di *C. albicans* farmaco-resistenti.

Infatti sono stati confermati gli estesi effetti antifungini *in vitro* del TTO ed è stato determinato anche che il terpinene-4-olo è il prodotto attivo della miscela, poiché inibisce tutti i ceppi di *C. albicans*, inclusi gli isolati clinici resistenti agli azolici. È stata dimostrata, per la prima volta *in vivo*, l'elevata attività antifungina di terpinene-4-olo all'1% v/v in un modello di infezione sperimentale di *C. albicans* nella ratta, modello molto stringente e predittivo della terapia della vaginite da *C.* nelle donne, anche con l'uso di un ceppo FCZ e ITR resistente (6). Le nostre indagini quindi costituiscono un valido supporto sperimentale preclinico per studi di sicurezza d'uso e di efficacia del TTO e del terpinene-4-olo nella vaginite umana, soprattutto quando è causata da specie di *C. albicans* farmaco-resistenti. Inoltre l'uso del terpinene-4-olo, come componente purificato attivo del TTO, potrebbe evitare costosi controlli di qualità impiegati generalmente nella utilizzazione di miscele.

## Bibliografia

1. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil): a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:50-62.
2. Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A, Salvatore G, Cassone A. *In vitro* and *in vivo* activity of tea tree oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic yeasts. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:1223-9.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved Standard M27-A2. NCCLS, Villanova, PA, USA; 2002.
4. De Bernardis F, Lorenzini R, Cassone A. Rat model of *Candida* vaginal infection. In: Oto Zak O, Sande MA (Ed.). *Handbook of Animal Models of Infection*. New York: Academic Press; 1999:735-40.
5. ISO 4730: *Oil of Melaleuca, Terpinen-4-ol type (tea tree oil)*. Geneva: International Organization for Standardization; 1996.
6. Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A, Cassone A, Salvatore G. *In vivo* activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species. *BMC Infect Dis* 2006;6:158.

# STUDIO DEL MECCANISMO DI AZIONE DEL *TEA TREE OIL* SU CEPPI DI *CANDIDA SPP.*

Marisa Colone (a), Nicolina Mastrangelo (a), Laura Toccaceli (a), Francesca Mondello (b), Antonietta Girolamo (b), Giuseppe Arancia (a), Antonio Cassone (b), Annarita Stringaro (a)  
(a) Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma  
(b) Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

## Introduzione

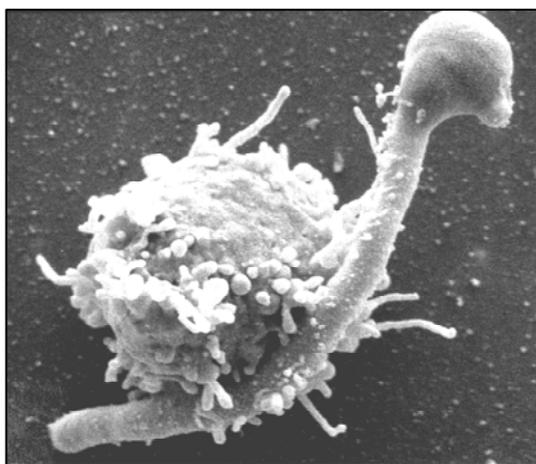
Le infezioni fungine opportunistiche rappresentano un'importante causa di morbilità e mortalità nei pazienti immunocompromessi e rimangono, a tutt'oggi, una sfida aperta per i clinici infettivologi. Il frequente impiego di trattamenti chemioterapici aggressivi, di dispositivi medici intravascolari e, non da ultimo, il sempre crescente numero di pazienti affetti da HIV, rende conto in larga parte del drammatico incremento delle infezioni fungine nell'ultimo decennio e della loro attesa espansione negli anni a venire. Un'alta percentuale dei pazienti infettati dal virus HIV sviluppa infezioni fungine durante il decorso della malattia; di tali infezioni una delle più ricorrenti è la candidiasi orofaringea. L'agente eziologico maggiormente implicato è *Candida albicans*. Nonostante i recenti progressi ottenuti con la terapia antivirale basata sulla combinazione fra inibitori della trascrittasi virale e inibitore della proteasi (*Highly Active Antiretroviral Therapy*, HAART), tali infezioni opportunistiche continuano ad essere un problema rilevante nella patologia AIDS. Tra gli agenti antifungini utilmente impiegati nel trattamento delle infezioni da *Candida* vi sono i polieni (Amfotericina B) e i derivati azolici (fluconazolo, chetoconazolo, voriconazolo, itraconazolo). Come conseguenza dell'AIDS epidemico, durante gli ultimi dieci anni è stato riscontrato un notevole aumento delle infezioni delle mucose causate dalla specie di *Candida* associate con un notevole aumento della resistenza agli azoli. In particolare, il fluconazolo è diventato l'agente anti-micotico di scelta nel trattamento e nella profilassi della candidiasi orofaringea dall'inizio del 1990, con conseguente induzione di resistenza agli azoli, descritta negli anni seguenti, in circa il 41% dei pazienti (1). A livello molecolare sono stati evidenziati diversi meccanismi cellulari coinvolti nell'insorgenza della resistenza agli azoli. Probabilmente, una delle cause maggiormente importanti nella farmacoresistenza di ceppi di *Candida* isolati da pazienti AIDS è l'alterato accumulo ed efflusso dei farmaci dovuto all'attivazione dei geni codificanti alcune proteine trasportatrici. Sono state individuate due importanti classi di proteine trasportatrici coinvolte nella farmacoresistenza di *Candida*: i trasportatori ABC (ATP-binding cassette) e i trasportatori appartenenti alla superfamiglia dei *major facilitators* (MF). Queste proteine hanno la capacità di trasportare contemporaneamente più farmaci, conferendo quindi il fenotipo polifarmacoresistente alle cellule fungine che li sovra-esprimono. È stata infatti dimostrata la presenza di una molecola simil-P-glicoproteina (P-gp) umana, nota molecola di trasporto dei farmaci fortemente coinvolta nella polifarmacoresistenza delle cellule tumorali, in ceppi di *Candida albicans*, la cui espressione è correlata al grado di resistenza agli azolici. Tale risultato è stato ottenuto sia su ceppi farmacoresistenti isolati da pazienti HIV positivi, sia su ceppi isolati da pazienti con vaginite ricorrente, resi resistenti *in vitro* mediante ripetuti passaggi in presenza di concentrazioni crescenti di fluconazolo (2).

## Nuove strategie terapeutiche per il trattamento delle micosi resistenti

L'aumento di incidenza delle infezioni fungine invasive nella popolazione è proprio dovuto all'uso sempre più intensivo di terapie immunosoppressive e antibiotiche ad ampio spettro. Per questo motivo, negli ultimi anni l'interesse per le proprietà terapeutiche delle sostanze di origine naturale è risultato in progressiva crescita. In questo contesto è apparsa evidente la necessità di sviluppare dei modelli *in vitro* e di applicare le indagini biochimiche e ultrastrutturali per ottenere indicazioni utili sul meccanismo di azione e quindi sulla reale attività farmacologica delle sostanze naturali di maggiore impiego empirico. I risultati ottenuti potranno avere un impatto importante sulla salute pubblica offrendo indicazioni utili per l'ottimizzazione dell'impiego terapeutico di alcuni "farmaci naturali". Infatti, per la sperimentazione di nuove sostanze, consistente nell'identificazione dei principi attivi e degli eventuali componenti caratteristici, nella valutazione dell'attività antimicrobica e antitumorale se usate da sole o in combinazione con farmaci già impiegati in terapia, potrà migliorarne l'efficacia e/o diminuire gli effetti collaterali negativi.

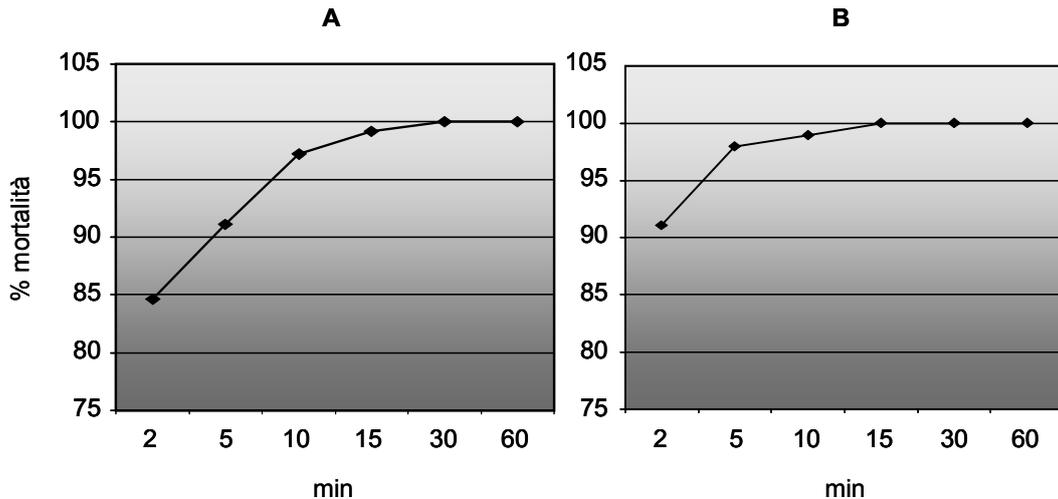
### Risultati sperimentali

Numerosi studi *in vitro* hanno dimostrato che l'olio essenziale distillato dalle foglie di *Melaleuca alternifolia*, noto come *Tea Tree Oil* (TTO) o come olio di *Melaleuca*, possiede proprietà antibatteriche, antifungine, antivirali, antinfiammatorie e antitumorali. Sebbene le attività antimicrobiche siano già state ampiamente indagate, a tutt'oggi il meccanismo di azione del TTO è poco conosciuto (3,4). Nell'ambito della ricerca da noi condotta abbiamo analizzato gli effetti antifungini del trattamento con il TTO sul fungo diploide *Candida albicans* (Figura 1).



**Figura 1. Micrografia ottenuta al microscopio elettronico a scansione (SEM) di un coniugato formato da un cellula di *Candida albicans* e una cellula Natural Killer (NK) (15.000 x)**

Studi di proliferazione cellulare hanno dimostrato che il TTO è in grado di inibire la crescita sia di un ceppo sensibile al fluconazolo di *Candida albicans* (3153) sia di un ceppo resistente (AIDS68), isolato da un paziente HIV+ (Figura 2).



**Figura 2** Attività *in vitro* del TTO su due ceppi di *C. albicans*. Il grafico A mostra l'attività inibitoria sul ceppo 3153, sensibile al fluconazolo, mentre il grafico B si riferisce a quella osservata sul ceppo resistente AIDS68

Le osservazioni condotte mediante microscopia confocale sulle cellule fungine dei due ceppi 3153 e AIDS68, incubate con Hoechst dopo trattamento con 1% di TTO a tempi crescenti (2 min→1h) hanno rivelato che il ceppo 3153 dopo solo 2 min di trattamento con l'olio essenziale presenta delle alterazioni della cromatina; questa, infatti, appare modificata e più addensata. Tali alterazioni non sono visibili nel ceppo resistente AIDS68 trattato per 2 min ma compaiono solo a tempi più lunghi di trattamento (30 e 60 min).

L'analisi del ciclo cellulare, mediante citometria a flusso (FACS), ha rivelato che il trattamento con 1% TTO a tempi crescenti (2 min→48h) causa alterazioni del ciclo cellulare probabilmente associate ad un rallentamento della crescita microbica. A 48h di trattamento, una minore frazione di cellule di entrambi i ceppi è nelle fasi S e G2/M, rispetto al rispettivo campione di controllo. Parallelamente, è stato valutato anche l'effetto del TTO sulle membrane analizzando al FACS l'*uptake* di ioduro di propidio. Le letture sono stati eseguite su cellule vitali di entrambi i ceppi trattate con il TTO (1%), a tempi crescenti (2 min→48h). I risultati ottenuti indicano che l'alterazione della permeabilità di membrana possa essere un fenomeno che si verifica precocemente durante il trattamento, al quale però non segue la morte cellulare ma bensì un rallentamento della crescita associato alle alterazioni morfologiche della cromatina.

## Conclusioni

I dati sperimentali da noi ottenuti dimostrano che il TTO è un agente antimicotico in grado di esercitare la sua azione fungicida mediante un complesso meccanismo di azione, al quale partecipano numerose proteine citoplasmatiche fungine implicate nella trasduzione di segnali che regolano l'omeostasi cellulare. Obiettivo del nostro lavoro futuro sarà proprio quello di identificare queste molecole responsabili dei fenomeni biologici osservati, allo scopo di valutare la reale possibilità di mettere a punto una nuova strategia terapeutica per il trattamento delle micosi resistenti alle attuali terapie farmacologiche.

## Bibliografia

1. Brawer DL, Havan AJ. Oral candidiasis in HIV patients. *Curr Top Med Mycol* 1995;6:113-25.
2. Stringaro A, Molinari A, Calcabrini A, Arancia G, Ceddia GP, Cianfriglia M, Poloni F, Mondello F, Angiolella L, De Bernardis F, Cassone A. Detection of human P-glycoprotein-like molecule in azole-resistant *Candida albicans* from HIV+ patients. *Microbial Drug Resistance* 2002;8:235-44.
3. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev* 2006;19(1):50-62.
4. Calcabrini A, Stringaro A, Toccaceli L, Meschini S, Marra M, Colone M, Salvatore G, Mondello F, Arancia G, Molinari A. Terpinen-4-ol, the main component of *Melaleuca Alternifolia* (Tea tree) oil inhibits *in vitro* growth of human of melanoma cells. *J Invest Dermatol* 2004;122:349-60.

# ATTIVITÀ *IN VITRO* DELL'OLIO ESSENZIALE DI *MELALEUCA ALTERNIFOLIA* CHEEL (*TEA TREE OIL*) IN FASE LIQUIDA E GASSOSA NEI CONFRONTI DI *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*

Maria Luisa Ricci, Antonietta Girolamo, Maria Scaturro, Stefano Fontana, Federica Pinci, Francesca Mondello  
Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

## Introduzione

L'olio essenziale *Melaleuca alternifolia* Cheel o *Tea Tree Oil* (TTO) è stato molto studiato per il suo ampio spettro di azione antimicrobica e per le sue potenziali attività terapeutiche (1). In particolare sono stati effettuati studi volti a valutare l'attività antimicrobica nei riguardi di un elevato numero di specie batteriche, usando modificazioni di metodi standard. Tuttavia sono assenti dati sull'attività del TTO nei confronti di *Legionella pneumophila* (*Lp*), probabilmente a causa delle difficoltà riscontrate nello standardizzare l'attività degli oli essenziali nei confronti di batteri esigenti. *Lp* è ubiquitaria in ambienti di acqua dolce ed è responsabile di due quadri clinici: una grave polmonite detta Malattia del Legionario e una malattia simil-influenzale detta Febbre di Pontiac. L'infezione avviene attraverso l'inalazione di aerosol contaminato da *Lp* e la malattia insorge per l'abilità del batterio di evitare la fusione fagosoma-lisosoma. Ad oggi sono state descritte 52 specie di *Legionella* (*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* disponibile all'indirizzo: <http://www.bacterio.cict.fr/>) distinte in più di 70 sierogruppi. Quasi la metà delle specie e sierogruppi è stata implicata in infezioni nell'uomo e *Lp* è responsabile di circa 90% di tutte le infezioni (2). Gli impianti idrici e i dispositivi medici che producono aerosols sono tra le maggiori sorgenti di infezione da *Lp* nelle strutture sanitarie. Sebbene vari metodi di disinfezione fisici e chimici siano stati oggetto di studio per ridurre la contaminazione di *Lp* negli impianti idrici, il contenimento della carica batterica rimane ancora un'importante sfida. Scopo di questo studio è stato quello di valutare la possibile attività antibatterica *in vitro* dell'olio essenziale di *Melaleuca alternifolia* Cheel (TTO) e del suo principale componente terpinene-4-olo in fase liquida e gassosa nei confronti di *Legionella pneumophila*.

## Materiali e metodi

Sono stati saggiati 22 ceppi di *Legionella pneumophila* di riferimento (sierogruppi 1, 3, 6, 8), clinici e ambientali (sierogruppi 1 e 6). La composizione del TTO utilizzato in questo studio è stata analizzata mediante gas cromatografia (GC-FID) e gas-cromatografia-spettrometria di massa (GC-MS). L'attività del TTO è stata determinata mediante una modificazione del metodo di micro-brodo-diluizione standard (3). Questo è un test qualitativo e quantitativo che permette di ottenere una minima concentrazione inibente (MIC) e una minima concentrazione battericida (MBC), che definiscono l'attività antimicrobica di un olio essenziale. Si basa sulla diluizione scalare di un olio essenziale nel mezzo di coltura *buffered yeast extract broth* (BYEB) in micropiastre a 96 pozzetti, partendo da un'emulsione dell'olio essenziale con un tensioattivo

ionico microbiologicamente inerte (Tween 80). L'inoculo opportunamente standardizzato alla concentrazione di 108 CFU/mL, si distribuisce nei vari pozzetti. Dopo incubazione a 36 °C con atmosfera di CO<sub>2</sub> al 2,5% per 72 ore si esegue la lettura dei risultati (visualmente o per spettrofotometria). Il metodo di diffusione in microatmosfera è un metodo modificato di diffusione in agar (4, 5), che permette di valutare l'attività del TTO e del terpinene-4-olo sotto forma di vapore. Il dischetto di nitrocellulosa viene imbibito con 10 microlitri di TTO o terpinene-4-olo (concentrati) e viene applicato all'interno del coperchio di una piastra di Petri; quindi viene posto su quest'ultimo il terreno a base di agar insemato. L'incubazione avviene a 36 °C con atmosfera di CO<sub>2</sub> al 2,5% per 72 ore. L'attività antimicrobica viene determinata mediante la misurazione del diametro (mm) della zona di inibizione di crescita del microorganismo.

## Risultati e conclusioni

Il metodo della micro-brodo-diluizione ha dimostrato che TTO ha effetto inibente sulla crescita di ceppi di riferimento di *Lp* con una MIC di 0,25% v/v, mentre ha effetto battericida alla concentrazione di 0,5% v/v (Tabella 1). Gli stessi risultati sono stati osservati nel caso di ceppi di origine clinica e ambientale (Tabella 2).

**Tabella 1. Attività antibatterica del TTO\* nei confronti di ceppi di riferimento ATCC di *L. pneumophila* sierogruppi 1 e 6**

Ceppo	MIC**	MIC range	MBC**	MBC range
<i>Lp</i> 1 ATCC 33152	0,25	0,0078-0,5	0,5	0,25-1,0
<i>Lp</i> 6 ATCC 33215	0,25	0,06-0,5	0,5	0,25-2,0

\*diluizioni seriali del TTO da 4% a 0.0078% v/v; \*\*MIC e MBC più frequenti

**Tabella 2. Attività antibatterica del TTO\* nei confronti di ceppi di *L. pneumophila* sierogruppi 1 e 6 di origine umana e ambientale**

Ceppo	n. ceppi	MIC50	MIC90	MIC range	MBC50	MBC90	MBC range
<i>Lp</i> 1**	12	0,25	0,25	0,125-0,25	0,5	0,5	0,50-1,0
<i>Lp</i> 6***	10	0,25	0,25	0,25-0,5	0,5	0,5	0,50-1,0

\*diluizioni seriali del TTO da 4% a 0,0078% v/v; \*\**L. pneumophila* sierogruppo 1 (1 ATCC, 5 ceppi clinici e 6 ambientali); \*\*\**L. pneumophila* sierogruppo 6 (1 ATCC, 5 ceppi clinici e 4 ambientali)

Come mostrato nella Tabella sottostante (Tabella 3), il metodo della diffusione in microatmosfera rivela come i vapori di TTO abbiano effetto totalmente inibente sulla crescita di *Legionella*.

**Tabella 3. Inibizione della crescita di ceppi di riferimento di *L. pneumophila* dovuta a vapori di TTO o di terpinene-4-olo**

Ceppo	Controllo*	TTO*	Terpinene-4-olo*
<i>Lp</i> 1 ATCC 33152	0	90	90
<i>Lp</i> 3 ATCC 33155	0	90	90
<i>Lp</i> 6 ATCC 33215	0	90	90
<i>Lp</i> 8 ATCC 35096	0	90	90

\* Zona di inibizione in mm

Questi dati preliminari dimostrano che tutti i ceppi di *Legionella pneumophila* testati sono sensibili *in vitro* all'olio essenziale di *Melaleuca alternifolia* Cheel (TTO). Inoltre, la tecnica di micro-brodo-diluizione utilizzando BYEB per saggiare l'attività del TTO, consente di ottenere risultati riproducibili con un inoculo di 108 CFU/mL. Non è stata rilevata differenza tra i valori delle MIC e delle MBC nei ceppi di origine ambientale e umana. Il metodo della diffusione in micro-atmosfera ha mostrato che i vapori di TTO e di terpinene-4-olo sono risultati inibenti nei confronti di ceppi di riferimento di Lp.

Pertanto il TTO, da solo o in combinazione con altri disinfettanti, può essere considerato per un'eventuale utilizzazione nel contenimento della contaminazione da *Lp* in spa, piccoli impianti idrici o per la disinfezione di particolari dispositivi medici.

## Bibliografia

1. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil): a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:50-62.
2. Fields BS, Benson RF, Besser RE. Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:506-26.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard- Seventh Edition M7-A7*. Wayne, PA, USA: CLSI; 2006.
4. Maruzzella JC, Sicurella NA. Antibacterial activity of essential oil vapours. *J Amer Pharmaceut Assoc* 1960;49:692-4.
5. López P, Sánchez C, Batlle R, Nerin C. Solid and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *J Agric Food Chem* 2005;53,6939-46.

# EFFETTI DEL *TEA TREE OIL* E DEL SUO COMPONENTE ATTIVO TERPINEN-4-OLO SU CELLULE DI MELANOMA UMANO

Annarica Calcabrini (a), Annarita Stringaro (a), Laura Toccaceli (a), Marisa Colone(a), Stefania Meschini (a), Manuela Marra (a), Marco Diociaiuti (a), Cristiano Giordani (a), Francesca Mondello (b), Giuseppe Arancia (a), Agnese Molinari (a)

(a) Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

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

## Introduzione

La capacità delle cellule tumorali di attivare efficaci meccanismi di difesa nei confronti degli agenti citotossici, sia chimici che fisici, costituisce un serio ostacolo al successo della chemio- e della radioterapia. Questo ha spinto sempre più studiosi che operano nel campo dell'oncologia a ricercare nuove sostanze che da sole o in combinazione con la chemioterapia tradizionale siano in grado di superare il fenomeno della farmacoresistenza e di fornire un miglioramento dell'indice terapeutico.

In molte linee cellulari, la farmacoresistenza è spesso associata ad un ridotto accumulo intracellulare dei farmaci antitumorali dovuto ad un aumentato efflusso contro un gradiente di concentrazione. Tale fenomeno è dovuto alla sovraespressione della P-glicoproteina (P-gp), una pompa di efflusso energia-dipendente, che diminuisce l'accumulo dei farmaci e quindi la loro citotossicità.

Diversi composti in grado di modulare l'attività della P-gp riescono a superare la farmacoresistenza *in vitro*: tra questi i più frequentemente menzionati sono il verapamil, un bloccante del calcio, e la ciclosporina A. Tuttavia l'utilizzo clinico di tali chemosensibilizzanti rimane discutibile in ragione della loro elevata tossicità; pertanto risulta necessaria l'identificazione di composti più attivi ma meno tossici così come la valutazione di regimi terapeutici alternativi.

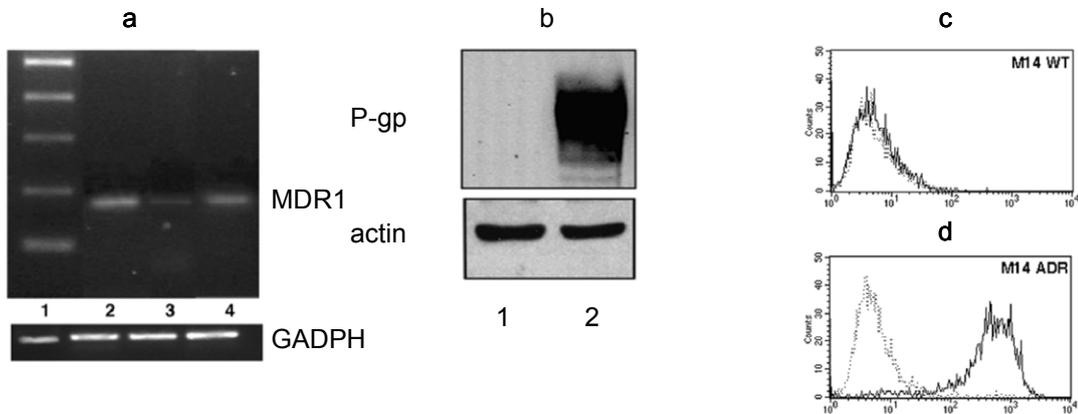
Sulla base di tali considerazioni, è stato condotto uno studio *in vitro* allo scopo di valutare la potenziale attività antitumorale del *Tea Tree Oil* (TTO), olio essenziale distillato dalla *Melaleuca alternifolia*, di cui sono ben note le proprietà antibatterica e antivirale. In particolare, sono state utilizzate una linea cellulare di melanoma umano, M14 WT, e una sua variante, M14 ADR, che mostra resistenza crociata a doxorubicina, vincristina e melfalan, mediata dal trasportatore di farmaci P-gp (1).

## Risultati

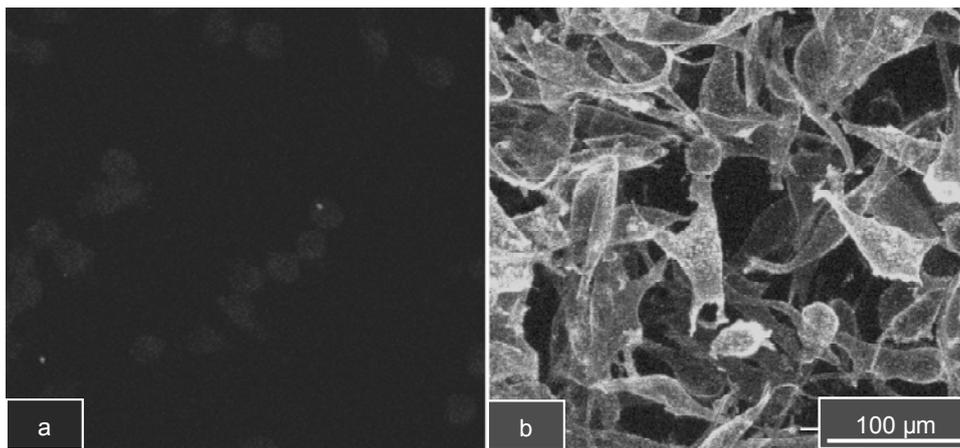
### Espressione del trasportatore di farmaci

Le linee cellulari farmacosensibili e farmacoresistenti sono state dapprima caratterizzate per l'espressione della P-gp. Le cellule resistenti M14 ADR esprimono livelli significativamente superiori a quelli espressi dalle cellule parentali M14 WT, sia a livello di m-RNA, come dimostrato dall'analisi in RT-PCR (Figura 1a), che a livello proteico, come evidenziato dal

western blotting (Figura 1b). La maggior parte della P-gp espressa ex novo appare localizzata sulla membrana plasmatica come rivelato dalla citometria a flusso (Figura 1c e 1d) e dalla microscopia confocale a scansione laser (Figura 2).



**Figura 1. Espressione della P-gp sulle cellule M14 WT e M14 ADR.**  
 (a) RT-PCR: (2) MCF7 DX, (3) M14 WT, (4) M14 ADR;  
 (b) Western blotting: (1) M14 WT, (2) M14 ADR; (c, d) Citometria a flusso

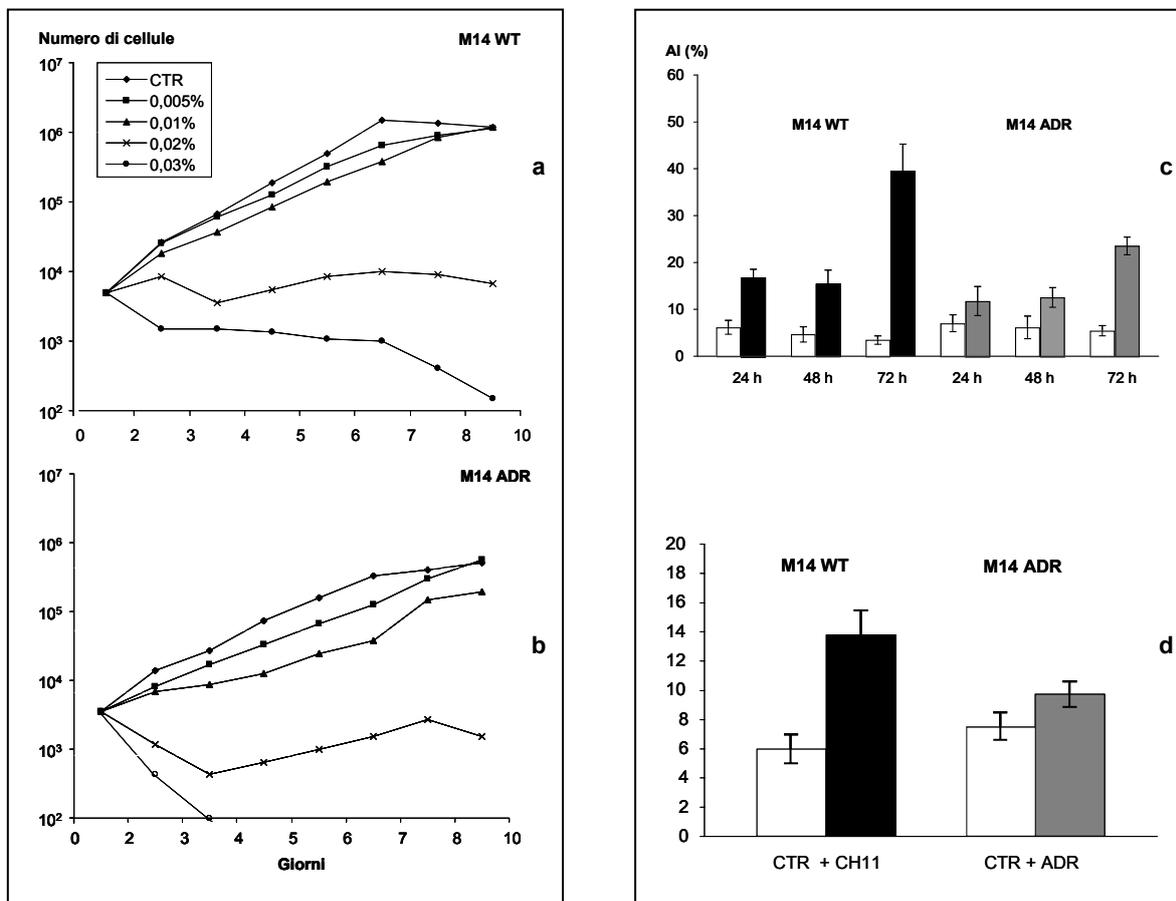


**Figura 2. Espressione della P-gp sulle cellule M14 WT (a) e M14 ADR (b) (LSCM)**

### Effetti del TTO sulla crescita delle cellule di melanoma umano

Le cellule di melanoma M14 WT e M14 ADR sono state quindi cresciute in presenza del TTO a concentrazioni comprese tra 0,005 e 0,03%. Tali concentrazioni sono state scelte in base a dati di letteratura che hanno dimostrato che lo 0,03% di TTO non esercita attività citotossica nei confronti di cellule epiteliali non tumorali. L'analisi delle curve di crescita ottenute dopo trattamento con le differenti concentrazioni di olio mostrano che basse concentrazioni (0,005%) non inducono alterazioni significative nella crescita delle cellule di melanoma sia della linea parentale (Figura 3a) che di quella resistente (Figura 3b). È viceversa interessante notare che il trattamento con 0,01% di TTO non influenza la crescita cellulare delle cellule farmacosensibili M14 WT, mentre induce un decremento significativo della crescita nelle loro varianti resistenti

M14 ADR. Le più alte concentrazioni impiegate (0,02 e 0,03%) si sono rivelate in grado di inibire fortemente la crescita di entrambi le linee cellulari, anche se l'effetto appare più accentuato nella linea cellulare M14 ADR rispetto alla linea M14 WT (Figure 3a e 3b).



**Figura 3. Effetti del TTO sulla crescita delle cellule M14 WT (a) e M14 ADR (b), apoptosi indotta da deprivazione di siero (c), apoptosi Fas-mediata (CH11) (d). AI (Apoptotic Index) (%): percentuale di cellule annessina V-positive/ioduro di propidio negative**

### Induzione di apoptosi da parte del TTO

Interessanti dati di letteratura riportano inoltre che la P-gp, oltre alla ben nota attività di trasporto, può esplicare anche un'efficiente attività antiapoptotica. È stata valutata quindi la risposta delle cellule di melanoma, sensibili e resistenti, a diversi stimoli apoptotici. Analogamente a quanto riportato per cellule tumorali di differente derivazione istologica, anche nelle cellule M14 ADR l'aumentata espressione di P-gp, appare associata ad una maggiore resistenza agli stimoli apoptotici (caspasi-dipendenti) quali la deprivazione di siero o il legame di Fas (Figure 3c e 3d, rispettivamente).

È stata quindi verificata la risposta apoptotica in seguito al trattamento con il TTO nella linea cellulare parentale e nella sua variante resistente (Figura 4). Quest'ultima è risultata molto più sensibile all'apoptosi indotta dal TTO e dal suo maggiore componente attivo, il terpinen-4-olo, come dimostrato dall'analisi in citometria a flusso. L'effetto protettivo esercitato dalla P-gp nei

confronti dell'apoptosi caspasi-dipendente sembra infatti essere superato dalla sostanza naturale (Figura 5a) e dal suo componente attivo terpinen-4-olo (Figura 5b).

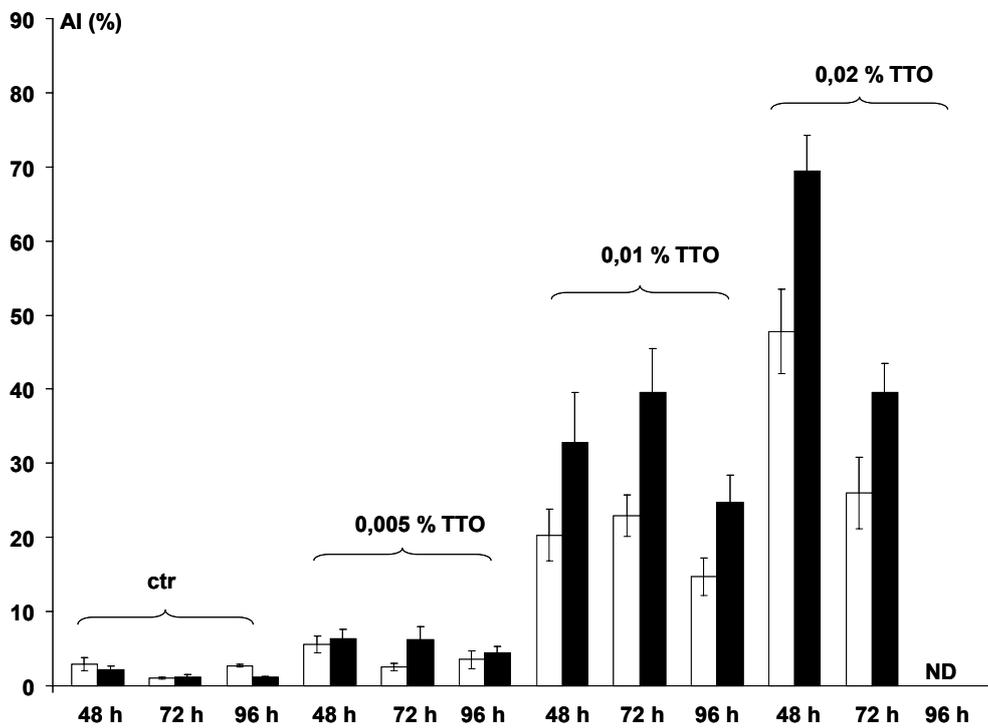


Figura 4. Apoptosi indotta dal TTO

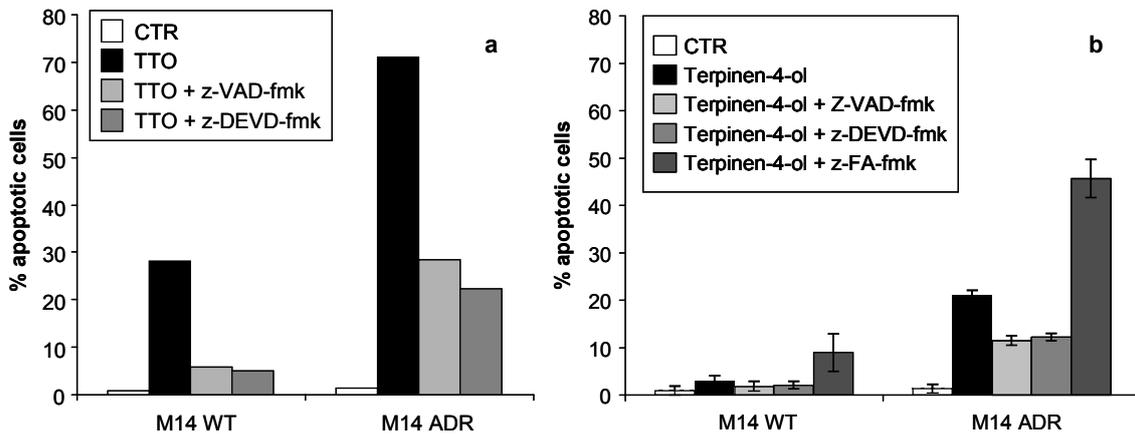
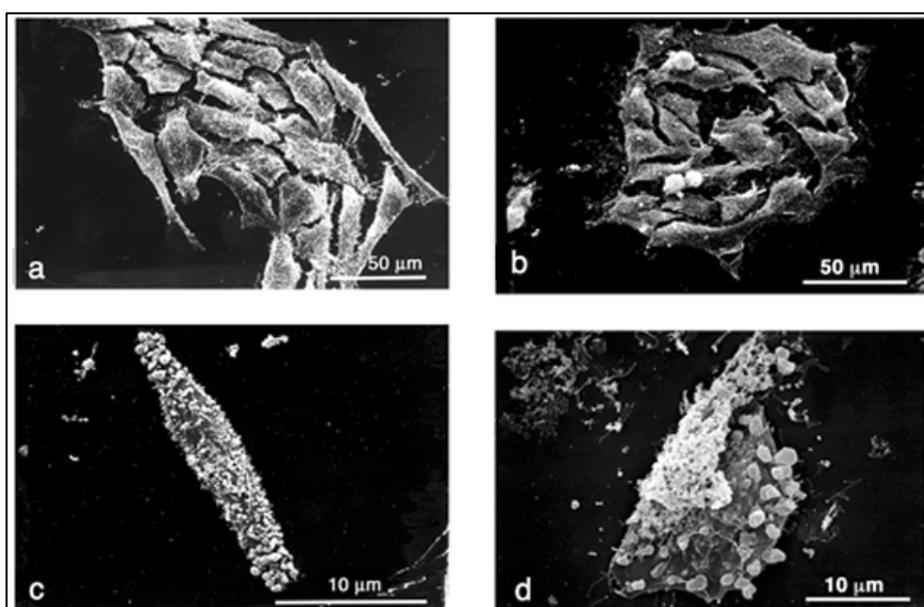


Figura 5. Apoptosi caspasi-dipendente indotta dal TTO (a) e dal terpinen-4-olo (b). Z- DEVD-fmk: inibitore della caspasi; Z-VAD-fmk: inibitore delle caspasi ad ampio spettro

## Studio del meccanismo di azione del TTO mediante microscopia elettronica a scansione e a trasmissione

Allo scopo di approfondire il meccanismo di azione mediante il quale il TTO esercita la sua attività citotossica, sono state eseguite delle osservazioni sia al microscopio elettronico a scansione (SEM) che al microscopio elettronico a trasmissione (TEM).

Le osservazioni al SEM hanno rivelato un effetto concentrazione-dipendente del TTO e del terpinen-4-olo sulla morfologia cellulare. Le cellule M14 WT e le M14 ADR trattate per 48 h con diverse dosi di TTO (0,005%, 0,01% e 0,02%) subiscono dei significativi cambiamenti morfologici in relazione all'incremento della dose impiegata, apparendo sofferenti e con numerose "blebs" sulla superficie cellulare (Figure 6c e 6d), quando confrontate con le cellule di controllo (Figure 6a e 6b). Inoltre, la percentuale maggiore di cellule sofferenti è stata osservata soprattutto nella linea M14 ADR ( Figura 6d).



**Figura 6. Osservazione al microscopio elettronico a scansione (SEM): (a) cellule M14 WT; (b) cellule M14 ADR (c) cellule M14 WT e (d) M14 ADR trattate con 0,02% TTO**

Mediante la tecnica del *freeze fracturing* è stato, inoltre, valutato l'effetto dell'olio essenziale sulla membrana plasmatica delle cellule M14 WT e M14 ADR. Il *freeze fracturing* permette di osservare, nelle cellule opportunamente congelate e sottoposte a criofrattura, i foglietti esoplasmatici e protoplasmatici delle membrane cellulari. Nelle cellule di controllo, sia M14 WT che M14 ADR, le proteine transmembrana (intramembraneous particles, IMP) sono apparse uniformemente distribuite (Figura 7a). Nelle cellule resistenti trattate con TTO alla massima concentrazione si è osservata, viceversa, una significativa riorganizzazione dell'architettura molecolare di membrana, con zone di addensamento delle IMP (Figura 7b, freccia) alternate a domini privi di rugosità (Figura 7b, testa di freccia). Quest'ultimi sono presumibilmente dovuti alla presenza dell'olio che, penetrando nel doppio strato, tende a permanere nella zona idrofobica esistente tra i due foglietti lipidici, interagendo preferenzialmente con le code dei fosfolipidi.



**Figura 7. Freeze-fracturing: faccia protoplasmatica della membrana plasmatica di cellule M14 ADR prima (a) e dopo (b) trattamento con 0,02% TTO**

### Studi d'interazione del TTO con membrane modello

Allo scopo di approfondire le modalità di interazione del TTO con il doppio stato lipidico, sono stati condotti studi su membrane modello. Con la tecnica di Langmuir sono state preparate all'interfaccia acqua-aria membrane planari costituite o da sola dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) o da DPPC/colesterolo/GM1. La presenza di colesterolo e GM1, un particolare tipo di ganglioside, è servita per mimare nelle membrane modello la composizione dei *raft*, cioè di domini molecolari di dimensioni nanometriche, oggi sempre più studiati e considerati fondamentali per il corretto funzionamento di importanti proteine di membrana, quali la P-gp. Mediante l'uso di uno speciale apparato sperimentale (*Langmuir trough*) sono state eseguite misure di compressione dei monostrati a temperatura costante (isoterme di compressione), in presenza e in assenza, nella sottofase acquosa, di concentrazioni crescenti di TTO. Nello stesso apparato sperimentale è stato montato un microscopio ad angolo di Brewster (BAM) per visualizzare le variazioni della morfologia del monostrato. L'applicazione contemporanea di queste tecniche ha permesso di ottenere preziose informazioni sulla termodinamica d'interazione tra il TTO e le membrane modello, con particolare riferimento ai *raft* (2).

Dall'analisi dei dati è stato possibile osservare come la presenza dei *raft* influenzi l'interazione del TTO con i monostrati. In particolare l'effetto dell'olio sembra essere attutito dalla presenza dei *raft*, dimostrando come il TTO altera principalmente l'organizzazione molecolare del DPPC e non altera la struttura ordinata dei *raft*.

### Discussione

Una linea cellulare-resistente (M14 ADR) è stata selezionata dopo numerosi passaggi (circa 100) in presenza di 40  $\mu\text{M}$  DOX. L'esposizione alla DOX induce la sovraespressione del trasportatore MDR e la sua comparsa sulla membrana plasmatica, come già osservato in altre linee cellulari di M14 selezionate mediante concentrazioni intermedie di farmaco.

I risultati ottenuti mediante il metodo di legame dell'annessina V, hanno dimostrato che il trattamento con il TTO induce un incremento del numero delle cellule apoptotiche sia nelle cellule della linea M14 WT sia nella linea cellulare M14 ADR. I valori relativi all'indice di

apoptosi nei campioni trattati è generalmente più grande nella variante resistente rispetto a quella parentale. Anche gli esperimenti con il componente attivo dell'olio, il terpinen-4-olo, dimostrano chiaramente che le cellule resistenti sono più suscettibili a questo componente rispetto alle cellule sensibili.

Tali dati indicano che la P-gp non è in grado di esercitare un ruolo antiapoptotico nei confronti del TTO o del terpinen-4-olo: al contrario, le cellule M14 ADR, P-gp positive, si rivelano più sensibili all'azione pro-apoptotica dell'olio essenziale.

È stato ipotizzato che l'effetto del TTO sulla membrana plasmatica possa essere dovuto all'azione dei terpineni che, essendo di natura lipofilica, si inseriscono all'interno dello strato fosfolipidico delle membrane cellulari, distruggendo la loro normale struttura e funzione. I risultati ottenuti dagli esperimenti di *freeze-fracturing* dimostrano chiaramente che il TTO interagisce con la membrana plasmatica delle cellule resistenti, determinando una riorganizzazione delle IMP e la formazione di zone di accumulo dell'olio nella zona idrofobica del doppio strato lipidico. I dati biofisici, infine, indicano chiaramente che il TTO è capace di penetrare all'interno della fase semifluida composta dal DPPC e non sembra alterare la struttura più ordinata dei *raft*.

## Conclusioni

Il TTO e il terpinen-4-olo sono in grado di interferire con la crescita cellulare delle cellule di melanoma stimolando la morte cellulare programmata. In tal modo l'azione protettiva della P-gp nei confronti degli stimoli apoptotici viene contrastata.

Il TTO e il terpinen-4-olo interagiscono preferenzialmente con i fosfolipidi (DPPC) delle membrane cellulari. A tal riguardo si può ipotizzare che l'attività antiapoptotica della P-gp (ATP-indipendente) possa venire esplicitata dalle molecole localizzate nel mare fluido di DPPC, mentre quella di trasporto (ATP-dipendente) venga soprattutto effettuata dalle molecole di P-gp localizzate nei *raft*. A supporto di tale ipotesi vengono i risultati, non riportati in questo studio, che dimostrano che l'attività di trasporto della P-gp non viene alterata dal TTO o dal terpinen-4-olo. Mentre è stato riportato dalla letteratura che l'integrità strutturale dei *raft* influenza l'attività di trasporto della P-gp. Questi risultati suggeriscono una possibile applicazione del *tea tree oil* come agente innovativo antitumorale.

## Bibliografia

1. Calcabrini A, Stringaro A, Toccaceli L, Meschini S, Marra M, Colone M, Salvatore G, Mondello F, Arancia G, Molinari A. Terpinen-4-ol, the main component of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits the *in vitro* growth of human melanoma cell. *J Invest Dermatol* 2004;122(2):349-60.
2. Giordani C, Molinari A, Toccaceli L, Calcabrini A, Stringaro A, Chistolini P, Arancia G, Diociaiuti M. Interaction of tea tree oil with model and cellular membranes. *J Med Chem* 2006;49(15):4581-8.

### **III SESSIONE**

#### **Sostanze di origine animale**



# ATTIVITÀ ANTIMICROBICA DELLA LATTOFERRINA

Fabiana Superti

*Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## Introduzione

La lattoferrina è una glicoproteina multifunzionale appartenente, insieme all'ovotransferrina e alla sierotransferrina, ad un'importante classe di proteine chelanti il ferro chiamate transferrine. Questa proteina è presente ad elevate concentrazioni nel latte e nel colostro (1), oltre che in diverse altre secrezioni, nel plasma (2) e nei granuli dei leucociti polimorfonucleati che la rilasciano in seguito a vari stimoli (3). La singola catena polipeptidica, con un peso molecolare di circa 80 kDa, è ripiegata in due lobi globulari omologhi, lobo N e lobo C (1), ognuno ulteriormente suddiviso in due domini (N1 e N2, C1 e C2), che possono legare ciascuno, in modo reversibile e con elevata affinità, uno ione ferrico insieme ad un anione, generalmente bicarbonato (4). I due lobi sono connessi da una regione cardine che aggiunge flessibilità alla molecola (5) e mostrano strutture supersecondarie simili: foglietti  $\beta$  irregolari, sormontati su entrambi i lati da "loops" e da eliche che li connettono. Nella lattoferrina umana e nella lattoferrina bovina esistono rispettivamente tre e cinque siti di glicosilazione (6).

La lattoferrina oltre a contribuire direttamente alla difesa dell'ospite dalle infezioni batteriche e virali (7-10), è dotata di attività immunomodulatoria (11), antinfiammatoria (12) e antiossidativa, regola l'assorbimento del ferro e la crescita cellulare (13) e possiede diverse attività enzimatiche (14).

## Attività antibatterica

L'effetto antibatterico della lattoferrina è stato attribuito sia all'abilità della proteina di legare il ferro, in comune con le altre transferrine, sia a meccanismi più diretti, indipendenti dall'attività chelante il ferro (8, 10). Alcune funzioni della lattoferrina, come ad esempio l'attività battericida, sono mediate da un peptide antimicrobico denominato lattoferricina, identificato nel 1991, che viene generato dalla proteina in seguito a clivaggio con pepsina gastrica ed è dotato di maggiore efficacia rispetto alla proteina integra (15).

I principali meccanismi dell'attività antibatterica della lattoferrina sono mostrati in Tabella 1.

## Attività antivirale

L'attività antivirale della lattoferrina è stata descritta per la prima volta nel 1994 (26) e da allora sono stati condotti numerosi studi che hanno dimostrato che lattoferrina umana e soprattutto la lattoferrina bovina sono capaci di prevenire l'infezione da parte di diversi virus. Solo per citare alcuni esempi, l'attività antivirale è stata dimostrata sia nei confronti di numerosi virus rivestiti, quali il citomegalovirus umano (26-28), i virus dell'herpes simplex di tipo 1 e 2

(26, 29 -33), il virus dell'immunodeficienza acquisita umana (HIV) (34, 35), il virus dell'epatite B umana (HBV) (36), il virus dell'epatite C umana (HCV) (37, 38), il virus respiratorio sinciziale (39) e l'hantavirus (40), che nei confronti di virus nudi (9), quali il rotavirus SA11 (41, 42), il poliovirus di tipo 1 (43), l'adenovirus di tipo 2 (44-46), l'enterovirus 71 (47), il papillomavirus (48, 49), il polyomavirus (50) e l'echovirus di tipo 6 (51-53). Sia la lattoferrina bovina che quella umana inibiscono generalmente le fasi precoci dell'infezione virale e possono avere effetto sinergico in associazione con farmaci convenzionali (54). Inoltre, in alcuni casi, l'attività antivirale è stata osservata non solo nella molecola intatta, ma anche nei suoi digesti enzimatici (42, 45, 52, 55, 56). I principali meccanismi dell'attività antivirale della proteina, mostrati in Tabella 2, sono generalmente indipendenti dal grado di saturazione in ferro della proteina.

**Tabella 1. Principali funzioni antibatteriche della lattoferrina**

Funzione	Meccanismo di azione	Dipendenza dal ferro
Attività batteriostatica	Sequestra il ferro e ne impedisce l'utilizzo da parte dei batteri inibendone la crescita (16).	Ferro-dipendente
Attività battericida	Si lega al lipopolisaccaride dei batteri Gram-negativi o all'acido lipoteicoico dei batteri Gram-positivi, tramite la lattoferricina, provocando la lisi della cellula batterica (17).	Ferro-indipendente
Inibizione dell'adesione e dell'internalizzazione batterica	Compete con i batteri per recettori cellulari comuni (18, 19). Idrolizza strutture adesive batteriche (20).	Ferro-indipendente
Modulazione dello sviluppo del biofilm	Inibisce o induce l'aggregazione batterica e la formazione di biofilm (19, 21).	Ferro-dipendente
Modulazione della morte cellulare indotta dall'infezione batterica	Inibisce l'apoptosi (22). Induce l'apoptosi tramite lattoferricina (23).	Ferro-indipendente
Azione sinergica con altri composti antimicrobici	Aumenta l'attività battericida di lisozima e antibiotici (24, 25).	Ferro-indipendente

**Tabella 2. Attività antivirale della lattoferrina**

Tipo di azione	Meccanismo di azione
Azione diretta	Si lega a specifiche proteine strutturali e non strutturali virali impedendone il funzionamento o inibendone l'interazione con le cellule suscettibili. Si lega a recettori o a co-recettori per i virus presenti sulla superficie della cellula inibendone l'attaccamento: questa funzione può essere mediata dal lobo N e dalla lattoferricina.
Azione indiretta	Inibisce la morte cellulare indotta dall'infezione da parte di virus citopatici. È in grado di aumentare la risposta immunitaria sistemica contro l'infezione virale.

L'enorme mole di studi svolti fino ad oggi, oltre a dimostrare l'importanza dell'attività antimicrobica di questa proteina, ha confermato che la lattoferrina è una molecola multifunzionale.

La notevole versatilità di questa proteina è dimostrata dal suo utilizzo nell'igiene orale, nell'allestimento di latti artificiali, dal suo inserimento nella composizione di numerosi integratori alimentari e dietetici, così come negli alimenti per sportivi. È per questo motivo che

molto probabilmente in futuro si potrà assistere ad un importante sviluppo delle applicazioni commerciali della lattoferrina e dei suoi derivati peptidici nei più svariati settori.

Considerando l'attuale tendenza ad abbinare alle valenze curative specifiche di singoli prodotti nuove sostanze con caratteristiche salutistiche e a sempre più ampio spettro d'azione, uno dei maggiori vantaggi dell'uso della lattoferrina in campo terapeutico è rappresentato dal fatto che questa molecola, essendo un prodotto naturale, è maggiormente biocompatibile rispetto ad altri metaboliti secondari o farmaci di sintesi.

## Ringraziamenti

I miei ringraziamenti a Lucilla Seganti per i suoi insegnamenti, a Piera Valenti, a tutti i collaboratori e, in particolare, ai miei colleghi del reparto di Patologia Infettiva Ultrastrutturale che hanno contribuito attivamente ad ampliare la conoscenza sul meccanismo dell'attività antibatterica e antivirale della lattoferrina.

## Bibliografia

1. Levay PF, Viljoen M. Lactoferrin: a general review. *Haematologica* 1995;80:252-67.
2. Van der Strate BW, Beljaars L, Molema G, Harmsen MC, Meijer DK. Antiviral activities of lactoferrin. *Antiviral Res* 2001;52:225-39.
3. Farnaud S, Evans RW. Lactoferrin-a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol Immunol* 2003;40:395-405.
4. Pierce A, Colavizza D, Benaissa M, Maes P, Tartar A, Montreuil J, Spik G. Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin. *J Eur Biochem.* 1991;196:177-84.
5. Vorland LH. Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein. *APMIS* 1999;107:971-81.
6. Spik G, Coddeville B, Mazurier J, Cambillaut C, Montreuil J. Primary and three-dimensional structures of lactotransferrin (lactoferrin) glycans. *Adv Exp Med Biol* 1994;357:21-32.
7. Marchetti M., Superti F. Antiviral activity of lactoferrin. In: Pandalai S.G.. (Ed.). *Recent developments in antiviral research*. Trivandrum: Transworld Research Network; 2001. p.193-203.
8. Orsi N. The antimicrobial activity of lactoferrin: Current status and perspectives. *BioMetals* 2004;17:189-96.
9. Seganti L, Di Biase AM, Marchetti M, Pietrantonio A, Tinari A, F. Superti. Antiviral activity of lactoferrin towards naked viruses. *BioMetals* 2004;17:295-99.
10. Superti F, Berlutti F, Paesano R, Valenti P Structure and activity of lactoferrin. A multifunctional protective agent for human health. In: Fuchs H. (Ed.) *Iron metabolism and disease*. Trivandrum: Transworld Research Network; 2008a. p.1-32.
11. Brock JH. Lactoferrin. In: Aggarwal BB. (Ed.). *Human cytokines. Handbook for basic and clinical research*. Malden, Mass: Blackwell Publishers Inc; 1998. p. 92-123.
12. Trif M, Guillen C, Vaughan DM, Telfer JM, Brewer JM, Roseanu A, Brock JH. Liposomes as possible carriers for lactoferrin in the local treatment of inflammatory diseases. *Exp Biol Med* 2001;226:559-64.
13. Brock JH. The physiology of lactoferrin. *Biochem Cell Biol* 2002;80:1-6.
14. Zimecki M, Mazurier J, Spik G, Kapp JA. Human lactoferrin induces phenotypic and functional changes in murine splenic B cells. *Immunology* 1995;86:122-7.

15. Tomita M, Bellamy W, Takase M, Yamauchi K, Wakabayashi H, Kawase K. Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *J Dairy Sci* 1991;74:4137-42.
16. Bullen JJ, Rogers HJ, Leigh L. Iron-binding proteins in milk and resistance to *Escherichia coli* infections in infants. *J Brit Med* 1972;1:69-75.
17. Arnold RR, Brewer M, Gauthier JJ. Bactericidal activity of human lactoferrin: Sensitivity of a variety of microorganisms. *Infect Immun* 1980;28:893-8.
18. Di Biase AM, Tinari A, Pietrantonio A, Antonimi G, Valenti P, Conte MP, Superti F. Effect of bovine lactoferrin on enteropathogenic *Yersinia* adhesion and invasion in Hep-2 cells. *J Med Microbiol* 2004;53:407-12.
19. Berlutti F, Superti F, Nicoletti M, Morea C, Frioni A, Ammendolia MG, Battistoni A, Valenti P. Bovine lactoferrin inhibits the efficiency of invasion of respiratory A549 cells of different iron-regulated morphological forms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia*. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2008;21:51-9.
20. Ochoa TJ, Noguera-Obenza M, Ebel F, Guzman CA, Gomez HF, Cleary TG. Lactoferrin impairs type III secretory system function in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2003;71:5149-55.
21. Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP, Welsh MJ. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature* 2002;417:552-5.
22. Superti F, Pietrantonio A, Di Biase AM, Longhi C, Valenti P, Tinari A. Inv-mediated apoptosis of epithelial cells infected with enteropathogenic *Yersinia*: a protective effect of lactoferrin. *Res Microbiol* 2005;156:728-37.
23. Longhi C, Conte MP, Ranaldi S, Penta M, Valenti P, Tinari A, Superti F, Seganti L. Apoptotic death of *Listeria monocytogenes*-infected human macrophages induced by lactoferrin B, a bovine lactoferrin-derived peptide. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2005;18:317-25.
24. Ellison RT III, Giehl TJ. Killing of Gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J Clin Invest* 1991;88:1080-91.
25. Caraher EM, Gumulapurapu K, Taggart CC, Murphy P, McClean S, Callaghan M. The effect of recombinant human lactoferrin on growth and the antibiotic susceptibility of the cystic fibrosis pathogen *Burkholderia cepacea* compleen cultured planktonically or as biofilm. *J Antimicrob Chemoter* 2007;60:546-54.
26. Hasegawa K, Motsuchi W, Tanaka S, Dosako S. Inhibition with lactoferrin of *in vitro* infection with human herpes virus. *Jpn J Med Sci Biol* 1994;47:73-85.
27. Harmsen MC, Swart PJ, de Béthune MP, Pawels R, De Clercq E, The TH, Meijer DKF. Antiviral effects of plasma and milk proteins: lactoferrin shows a potent activity against both human immunodeficiency virus and human cytomegalovirus replication *in vitro*. *J Infect Dis* 1995;172:380-8.
28. Andersen JH, Osbakk SA, Vorland LH, Traavik T, Gutteberg TJ. Lactoferrin and cyclic lactoferricin inhibit the entry of human cytomegalovirus into human fibroblasts. *Antiviral Res* 2001;51:141-9.
29. Ammendolia MG, Marchetti M, Superti F. Bovine lactoferrin prevents the entry and intercellular spread of herpes simplex virus type 1 in Green Monkey Kidney cells. *Antiviral Res* 2007;76:252-62.
30. Marchetti M, Longhi C, Conte MP, Pisani S, Valenti P, Seganti L. Lactoferrin inhibits herpes simplex virus type 1 adsorption to Vero cells. *Antiviral Res* 1996;29:221-31.
31. Marchetti M, Pisani S, Antonini G, Valenti P, Seganti L, N. Orsi. Metal complexes of bovine lactoferrin inhibit *in vitro* replication of herpes simplex virus type 1 and 2. *Biometals* 1998;11:89-94.
32. Marchetti M, Trybala E, Superti F, Johansson M, Bergstrom T. Inhibition of herpes simplex virus infection by lactoferrin is dependent on interference with the virus binding to glycosaminoglycans. *Virology* 2004;318:405-13.

33. Marchetti M, Ammendolia MG, Superti F. Glycosaminoglycans are not indispensable for the anti-herpes simplex virus type 2 activity of lactoferrin. *Biochimie* 2009;91(1):155-9.
34. +Swart PJ, Kuipers ME, Smit C, Pauwels R, deBethune NP, de Clercq E, Meijer DK, Huisman JG. Antiviral effects of milk proteins: acylation results in polyanionic compounds with potent activity against human immunodeficiency virus types 1 and 2 *in vitro*. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996;12:769-75.
35. Puddu P, Borghi P, Gessani S, Valenti P, Belardelli F, Seganti L. Antiviral effect of bovine lactoferrin saturated with metal ions on early steps of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30:1055-62.
36. Hara K, Ikeda M, Saito S, Matsumoto S, Numata K, Kato N, Tanaka K, Sekihara H. Lactoferrin inhibits hepatitis B virus infection in cultured human hepatocytes. *Hepatology* 2002;24:228-35.
37. Ikeda M, Sugiyama K, Tanaka T, Sekihara H, Kato N. Lactoferrin markedly inhibits hepatitis C virus infection in cultured human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Comm* 1998;245:549-53.
38. Ikeda M, Nozaki A, Sugiyama K, Tanaka T, Naganuma A, Tanaka K, Sekihara H, Shimotohno K, Saito M, Kato N. Characterization of antiviral activity of lactoferrin against hepatitis C virus infection in human cultured cells. *Virus Res* 2000;66:51-63.
39. Grover M, Giouzeppos O, Schnagel RD, May JT. Effect of human milk prostaglandins and lactoferrin on respiratory syncytial virus and rotavirus. *Acta Paediatr* 1997;86:315-6.
40. Murphy ME, Kariwa H, Mizutani T, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I. *In vitro* antiviral activity of lactoferrin and ribavirin upon hantavirus. *Arch Virol* 2000;145:1571-82.
41. Superti F, Ammendolia MG, Valenti P, Seganti L. Antirotaviral activity of milk proteins: lactoferrin prevents rotavirus infection in the enterocyte-like cell line HT29. *Med Microbiol Immunol* 1997;186:83-91.
42. Superti F, Siciliano R, Rega B, Giansanti F, Valenti P, Antonini G. Involvement of bovine lactoferrin metal saturation, sialic acid and protein fragments in the inhibition of rotavirus infection. *Biochim Biophys Acta* 2001;1528:107-15.
43. Marchetti M, Superti F, Ammendolia MG, Rossi P, Valenti P, Seganti L. Inhibition of poliovirus type 1 infection by iron-, manganese- and zinc-saturated lactoferrin. *Med Microbiol Immunol* 1999;187:199-204.
44. Arnold D, Di Biase AM, Marchetti M, Pietrantonio A, Valenti P, Seganti L, Superti F. Antiadenovirus activity of milk proteins: lactoferrin prevents viral infection. *Antiviral Res* 2002;53:153-8.
45. Di Biase AM, Pietrantonio A, Tinari A, Siciliano R, Valenti P, Antonini G, Seganti L. Heparin interacting sites of bovine lactoferrin are involved in anti-adenovirus activity. *J Med Virol* 2003;69:495-502.
46. Pietrantonio A, Di Biase AM, Tinari A, Marchetta M, Valenti P, Seganti L, Superti F. Bovine lactoferrin inhibits adenovirus infection by interacting with viral structural polypeptides. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2688-91.
47. Lin TY, Chu C, Chiu CH. Lactoferrin inhibits enterovirus 71 infection of human embryonal rhabdomyosarcoma cells *in vitro*. *J Infect Dis* 2002;186:1161-4.
48. Drobni P, Naslund J, Evander M. Lactoferrin inhibits human papillomavirus binding and uptake *in vitro*. *Antiviral Res* 2004;64:63-8.
49. Mistry N, Drobni P, Naslund J, Sunkari VG, Jenssen H, Evander M. The anti-papillomavirus activity of human and bovine lactoferrin. *Antiviral Res* 2007;75:258-65.
50. Longhi G, Pietropaolo V, Mischitelli M, Longhi C, Conte MP, Marchetti M, Tinari A, Valenti P, Degener AM, Seganti L, Superti F. Lactoferrin inhibits early steps of human BK polyomavirus infection. *Antiviral Res* 2006;72:145-52

51. Tinari A, Pietrantonì A, Ammendolia MG, Valenti P, Superti F. Inhibitory activity of bovine lactoferrin against echovirus induced programmed cell death *in vitro*. *Int J Antimicrob Agents* 2005;25:433-8.
52. Pietrantonì A, Ammendolia MG, Tinari A, Siciliano R, Valenti P, Superti F. Bovine lactoferrin peptidic fragments involved in inhibition of echovirus 6 *in vitro* infection. *Antiviral Res* 2006;69:98-106.
53. Ammendolia MG, Pietrantonì A, Tinari A, Valenti P, Superti F. Bovine lactoferrin inhibits echovirus endocytic pathway by interacting with viral structural polypeptides. *Antiviral Res* 2007;73:151-60.
54. Viani RM, Gutteberg TJ, Lathey JL, Spector SA. Lactoferrin inhibits HIV-1 replication *in vitro* and exhibits synergy when combined with zidovudine. *AIDS* 1999;13:1273-4.
55. Siciliano R, Rega B, Marchetti M, Seganti L, Antonini G, Valenti P. Bovine lactoferrin peptidic fragments involved in inhibition of herpes simplex virus type 1 infection. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264:19-23.
56. Superti F, Ammendolia MG, Marchetti M. New advances in anti-HSV chemotherapy. *Curr Med Chem* 2008b;15:900-11.

# **EFFETTI IMMUNOMODULATORI DELLA LATTOFERRINA SULLE CELLULE DELLA RISPOSTA INNATA**

Patrizia Puddu (a), Maria Carollo (a), Daniela Latorre (a), Piera Valenti (b), Filippo Belardelli (a), Sandra Gessani (a)

(a) *Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Dipartimento di Scienza della Salute Pubblica, Università Sapienza di Roma*

## **Introduzione**

L'attività delle cellule presentanti l'antigene è indispensabile per lo sviluppo di una risposta immune efficace. Il macrofago e la cellula dendritica (DC), due elementi strategici della difesa innata, svolgono un ruolo fondamentale nella risposta immediata alle infezioni, nel mantenimento dell'omeostasi tissutale e nell'attivazione della risposta specifica tardiva. In particolare, i macrofagi mostrano un'alta capacità di fagocitosi e "killing" intracellulare del patogeno e producono diversi fattori essenziali nel controllo dell'infezione, oltre che svolgere un ruolo importante nei processi di riparo tissutale che seguono l'infiammazione (1, 2), mentre le DC, altamente specializzate nella presentazione dell'antigene, principalmente attivano e definiscono il tipo di risposta adattativa specifica (3-5).

## **Lattoferrina ed Immunomodulazione**

La lattoferrina (Lf) è una glicoproteina di 80 KD che appartiene alla famiglia delle transferrine, ed è in grado di legare il ferro ad alta affinità. La Lf è uno dei componenti principali dei granuli secondari rilasciati dai neutrofili attivati, e durante i processi infiammatori la sua concentrazione nel sangue può aumentare da 1 a 200 µg/mL. Inoltre, viene rilasciata nella forma "iron-free" dalle cellule epiteliali nelle secrezioni (lacrime, saliva, ecc.) dove nell'uomo può raggiungere concentrazioni da 1 a 7 mg/mL nel latte e nel colostro rispettivamente (5). La Lf oltre ad essere implicata nel metabolismo del ferro e rigenerazione dell'osso, svolge altre importanti attività essendo coinvolta nell'azione antimicrobica (contro virus, batteri e funghi), antitumorale, antinfiammatoria ed Immunomodulante. In particolare, la Lf è considerata un elemento importante della difesa innata precoce in grado di proteggere l'ospite dall'aggressione di patogeni e dall'eccessiva infiammazione che ne deriva, sia interagendo direttamente con il microorganismo o parti di esso, sia indirettamente modulando l'attività di cellule della risposta immunitaria (6-8). Malgrado non siano completamente noti i bersagli cellulari e molecolari attraverso cui la Lf modula la risposta immunitaria, studi *in vivo* e *in vitro* suggeriscono l'esistenza di molteplici meccanismi che includono la produzione di fattori solubili quali citochine/chemochine, la regolazione della produzione di specie reattive dell'ossigeno e il reclutamento di cellule della difesa immunitaria. Molte di queste attività sono legate alla capacità intrinseca di questa molecola di legare il ferro e componenti microbiche, quali il lipopolisaccaride (LPS) dei batteri gram-negativi (9).

Recentemente il nostro gruppo ha dimostrato (10) che un trattamento di 24 ore con la Lf bovina (bLf) è in grado di proteggere i macrofagi peritoneali (PM) di topo dall'infezione con il

virus della stomatite vescicolare (VSV). Ulteriori studi condotti in topi geneticamente difettivi per il recettore dell'interferone- $\alpha/\beta$  (IFN- $\alpha/\beta$ ) o in topi normali in presenza di anticorpi neutralizzanti l'IFN- $\alpha/\beta$  di tipo I hanno evidenziato che lo stato antivirale osservato nei PM a seguito del trattamento con bLf è mediato dalla espressione di bassi livelli di IFN- $\beta$ . Studi volti alla caratterizzazione dei meccanismi sottostanti, condotti in topi C3H/HeJ portatori di una mutazione a carico del Toll-Like Receptor 4 (TLR4), recettore dell'LPS, o in presenza di Polimixina B, un inibitore classico dell'LPS, hanno messo in evidenza che nel PM la bLf stimola la produzione di IFN- $\alpha/\beta$  in modo LPS-dipendente attraverso l'interazione con il TLR4. Al contrario la produzione di TNF- $\alpha$  non richiede l'espressione di un TLR4 funzionale in quanto tale produzione è indotta dalla bLf anche nei topi C3H/HeJ difettivi per la risposta all'LPS. Tali risultati suggeriscono che la bLf possa attivare diverse funzioni nel macrofago attraverso vie alternative.

In risposta a vari stimoli di derivazione microbica o di natura endogena, la DC presente nei tessuti va incontro ad un complesso processo di maturazione che comporta un mutamento del fenotipo e l'attivazione o l'inibizione di specifiche funzioni, quali la capacità di internalizzare e presentare l'antigene o di rilasciare fattori solubili polarizzanti la risposta delle cellule T. Il riconoscimento e la decodificazione di tali segnali di pericolo avviene mediante l'interazione alla membrana con diverse categorie di recettori tra cui i TLR e i C-type lectin receptors che consentono il riconoscimento di molecole di derivazione microbica (batteri, virus, funghi etc) (11). In un secondo studio abbiamo investigato gli effetti della bLf sui processi di differenziamento *in vitro* e maturazione della DC umana. I risultati da noi ottenuti hanno evidenziato che la bLf non interferisce con il differenziamento da monocita a DC, sebbene determini un blocco della maturazione indotta da LPS, polyI; C e R848, ligandi del TLR4, TLR3 e TLR8 rispettivamente. Infatti, le bLf-DC, differenziate in presenza di bLf, non up-modulano le molecole costimolatorie CD80 e CD86, il CD83 e il MHC di classe I e II, in risposta alla stimolazione con gli agonisti dei TLR. In accordo con il fenotipo osservato, tali cellule non perdono la capacità di internalizzare l'antigene e non producono citochine effettrici quali IL-12, TNF- $\alpha$  e IL-23 in risposta alla stimolazione. Al contrario, tali cellule vanno incontro a maturazione se stimolate con CD40L, suggerendo che il blocco maturativo osservato sia parziale e relativo a segnali derivanti dalla stimolazione dei TLR. Nei successivi studi di caratterizzazione della risposta T indotta, abbiamo osservato che la diminuita produzione di citochine polarizzanti risulta associata ad una diminuita risposta di tipo T helper 1. Tali risultati suggeriscono che nell'uomo la bLf possa esercitare un ruolo antinfiammatorio attraverso molteplici meccanismi comprendenti il legame di Fe<sup>+3</sup> o LPS e la modulazione dell'attività delle DCs.

## Bibliografia

1. Gordon S. 2007. The macrophage: past, present and future. *Eur J Immunol* 37 Suppl 1:S9-17.
2. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. 2008. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 13:453-61.
3. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu JY, Pulendran B, Palucka K.. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18: 767-811.
4. Steinman RM. Some interfaces of dendritic cell biology. *Apmis* 2003;111:675-97.
5. Legrand D, Pierce A, Ellass E, Carpentier M, Mariller C, Mazurier J. Lactoferrin structure and functions. *Adv Exp Med Biol* 2008;606:163-94.
6. Valenti P, Antonini G. Lactoferrin: an important host defence against microbial and viral attack. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:2576-87.

7. Legrand D, Ellass E, Carpentier M, Mazurier J. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:2549-59.
8. Ward PP, Uribe-Luna S, Conneely OM. Lactoferrin and host defense. *Biochem Cell Biol* 2002;80:95-102.
9. Appelmelk BJ, An YQ, Geerts M, Thijs BG, de Boer HA, MacLaren DM, de Graaff J, Nuijens JH. Lactoferrin is a lipid A-binding protein. *Infect Immun* 1994;62:2628-32.
10. Puddu P, Carollo MG, Belardelli F, Valenti P, Gessani S. Role of endogenous interferon and LPS in the Immunomodulatory effects of bovine lactoferrin in murine peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* 2007;82:347-53.
11. Macagno A, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation. *Trends Immunol* 2007; 28:227-33.

## **ATTIVITÀ IMMUNOMODULATORIA E METABOLISMO DELLA VITAMINA D3 IN CELLULE DENDRITICHE UMANE**

Maria Cristina Gauzzi, Cristina Purificato, Isabella Sanseverino, Filippo Belardelli, Sandra Gessani  
*Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

### **La vitamina D3**

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, la forma biologicamente attiva della vitamina D3, è universalmente conosciuta per il suo ruolo centrale nel metabolismo del calcio e nell'omeostasi del tessuto osseo. Oltre a questa funzione "classica", la vitamina D3 è però dotata di altre importanti attività, come la capacità di regolare la proliferazione e il differenziamento di diversi tipi cellulari normali e tumorali, e una potente attività immunomodulatoria (1, 2). Sia l'attività antiproliferativa che quella immunomodulatoria di 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> sono oggetto di un'intensa attività di ricerca, anche in considerazione di un suo potenziale utilizzo clinico nel trattamento di tumori e malattie autoimmuni. A supporto del potenziale terapeutico della vitamina D3 si sono recentemente accumulate molteplici evidenze, provenienti da diverse discipline: i) studi in modelli animali hanno dimostrato che 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> e i suoi analoghi sono efficaci nel prevenire e curare diverse malattie autoimmuni, e nel prolungare la sopravvivenza di trapianti (1); ii) studi di popolazione hanno rivelato una generale carenza di vitamina D3, da alcuni autori definita addirittura una pandemia, nella popolazione adulta, almeno nei paesi industrializzati (3); iii) studi epidemiologici hanno messo in evidenza un'associazione tra insufficienza e/o deficienza di vitamina D3 e suscettibilità a numerose malattie, inclusi alcuni tipi di cancro e patologie infiammatorie e/o immunomediate (3).

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> e i suoi analoghi sono effettivamente entrati di recente nella pratica clinica per il trattamento di malattie autoimmunitarie, come la psoriasi e l'iperparatiroidismo (4) e il loro potenziale terapeutico è in rapida espansione (5, 6).

A dispetto del nome, la vitamina D3 è contenuta in quantità apprezzabili in ben pochi alimenti (tra questi pesci grassi, uova, latte), e il suo apporto dalla dieta è quasi irrilevante rispetto al fabbisogno dell'organismo. Al contrario, l'organismo è in grado di sintetizzare in modo estremamente efficiente il metabolita attivo della vitamina D3, attraverso una serie di reazioni enzimatiche innescate dalle radiazioni ultraviolette, e dunque all'esposizione al sole. La prima di queste reazioni avviene nella pelle, dove la pro-vitamina D3 viene convertita in vitamina D3, che entra in circolo e, attraverso due reazioni di idrossilazione, che avvengono sequenzialmente nel fegato e nel rene, viene convertita in 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Il metabolita attivo entra di nuovo in circolo e raggiunge gli organi bersaglio. Un'ulteriore reazione di idrossilazione contribuisce, sempre nel rene, all'inattivazione della 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

Sia gli enzimi metabolici che quelli catabolici sono però anche espressi e funzionano in numerosi siti extrarenali, incluse le cellule del sistema immunitario, e un concetto emergente è che il metabolismo detto "extrarenale" della vitamina D3 svolge probabilmente un ruolo determinante nel regolare la concentrazione locale, e di conseguenza l'attività, di 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> nelle cellule e negli organi bersaglio (7).

## Le cellule dendritiche

Le cellule dendritiche (DC) sono cellule presentanti l'antigene *professional*, che svolgono un ruolo fondamentale nell'induzione e nella modulazione della risposta mediata dalle cellule T, indirizzandola verso l'immunità o la tolleranza immunologica. Esistono diverse sottopopolazioni di DC, che differiscono per fenotipo, funzione, stato di attivazione e localizzazione. Le vie di sviluppo che portano alla generazione delle diverse sottopopolazioni sono il risultato di una complessa interazione tra fattori trascrizionali e mediatori solubili presenti nel microambiente in cui la DC differenzia dal suo precursore ed eventualmente viene attivata (8).

Le DC del *lineage* mieloidi sono ormai riconosciute come uno tra i più importanti bersagli cellulari dell' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  nel sistema immunitario (9). Le DC mieloidi esprimono il recettore VDR, e alcuni studi, inclusi i nostri, hanno dimostrato che  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  e i suoi analoghi modificano profondamente il differenziamento e l'attivazione delle DC, indirizzandole verso l'induzione di tolleranza. Le DC trattate con  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  mostrano infatti una ridotta espressione di molecole costimolatorie (CD40, CD80 e CD86), una diminuita produzione di IL-12 e un'augmentata produzione di IL-10 in risposta a stimoli derivati da patogeni. Questi effetti, risultanti in un generale blocco della maturazione della DC, sono almeno in parte responsabili dell'induzione di cellule T  $\text{CD4}^+\text{Foxp3}^+$  con attività soppressoria/regolatoria, a scapito dell'induzione di cellule Th1 (9, 10). Oltre ad essere bersagli chiave della sua attività immunomodulatoria, le DC possono effettuare tutte le reazioni enzimatiche di conversione della vitamina D3 in  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , e di inattivazione, partecipando attivamente al suo metabolismo "extrarenale". Sia il metabolismo di  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  che la sensibilità alla sua attività immunomodulatoria sono regolati durante il differenziamento e l'attivazione delle DC (11-13).

## Attività immunomodulatoria della vitamina D3

Negli ultimi anni, uno degli interessi principali del nostro gruppo è stata la caratterizzazione dei meccanismi molecolari alla base dell'attività immunomodulatoria della vitamina D3 in differenti modelli di DC umane generate *in vitro* da monociti, e nelle due principali sottopopolazioni di DC (mieloidi e plasmacitoidi) circolanti nel sangue analizzate *ex-vivo*.

In particolare, il nostro interesse è attualmente focalizzato su due argomenti principali: i) studio della relazione (interferenze e/o possibili sinergie) tra l'attività immunomodulatoria della vitamina D3 e quella dell'interferone (IFN) di tipo I; ii) studio dell'effetto di  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  nella regolazione, a livello trascrizionale, del differenziamento e maturazione delle DC.

Nell'ambito del primo filone di ricerca, abbiamo investigato gli effetti di  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sul differenziamento dei monociti in DC indotto dall'IFN- $\beta$ . Abbiamo osservato che  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  previene la generazione di IFN-DC quando aggiunta a monociti isolati di fresco, ed è capace di "ridirigere" IFN-DC già differenziate verso uno stadio più immaturo, come dimostrato dal loro immunofenotipo, dalla loro ridotta capacità allostimolatoria, e da una diminuita capacità di produrre citochine responsabili della polarizzazione delle cellule T in cellule T *helper* 1 (14). L'effetto soppressivo è associato ad una potente diminuzione della capacità migratoria delle IFN-DC in risposta sia a chemochine infiammatorie (CCL4) che a chemochine che mediano il loro reclutamento nei linfonodi (CCL19). Questi studi ci hanno permesso di descrivere un nuovo meccanismo implicato nella modulazione delle attività funzionali delle DC da parte di  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , l'inibizione della loro attività chemiotattica poi confermato *in vivo* nel modello murino, e in DC mieloidi circolanti (15, 16). La capacità della vitamina D3 di interferire con il

“trafficking” delle DC, può essere di beneficio in condizioni in cui un reclutamento eccessivo di DC attivate risulta deleterio, come ad esempio in patologie infiammatorie o immunomediate, e sarà quindi importante estendere questi studi a cellule isolate da pazienti affetti da queste malattie.

Nell’ambito del secondo filone di ricerca, ci siamo concentrati su due fattori trascrizionali che svolgono un ruolo chiave nello sviluppo, differenziamento e attivazione delle DC: IRF4 (17) e STAT3 (18). Questi studi ci hanno permesso di dimostrare che l’inibizione del differenziamento delle DC mieloidi da parte di  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  è associato ad una marcata inibizione dell’espressione di IRF4, sia a livello di proteina che di mRNA. IRF4 si è rivelato dunque essere un nuovo gene bersaglio di bersaglio  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (19). Per quanto riguarda STAT3 abbiamo invece osservato che la presenza di  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , pur non alterandone il livello di espressione, ne altera le modifiche post-trascrizionali (livello di fosforilazione in tirosina) osservate in risposta a citochine o ligandi dei TLR (dati non pubblicati). Esperimenti di manipolazione genetica delle DC al fine di silenziare questi due fattori trascrizionali sono attualmente in corso per definire il loro ruolo nel differenziamento e attivazione delle DC, e nella risposta alla vitamina D3.

## Bibliografia

1. Mathieu C, Adorini L. The coming of age of  $1,25$ -dihydroxyvitamin D(3) analogs as immunomodulatory agents. *Trends Mol Med* 2002;8(4):174-9.
2. Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2007;7(9):684-700.
3. Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr* 2008;87(4):1080S-6S.
4. Brown AJ. Therapeutic uses of vitamin D analogues. *Am J Kidney Dis* 2001;38(5)Suppl5:S3-S19.
5. Cannell JJ, Hollis BW. Use of vitamin D in clinical practice. *Altern Med Rev* 2008;13(1):6-20.
6. Clarke JO, Mullin GE. A review of complementary and alternative approaches to immunomodulation. *Nutr Clin Pract* 2008;23(1):49-62.
7. Alpert PT, Shaikh U. The effects of vitamin D deficiency and insufficiency on the endocrine and paracrine systems. *Biol Res Nurs* 2007;9(2):117-29.
8. Wu L, Liu YJ. Development of dendritic-cell lineages. *Immunity* 2007;26(6):741-50.
9. Penna G, Amuchastegui S, Laverny G, Adorini L. Vitamin D receptor agonists in the treatment of autoimmune diseases: selective targeting of myeloid but not plasmacytoid dendritic cells. *J Bone Miner Res* 2007;22(Suppl 2):V69-73.
10. Adorini L, Penna G, Giarratana N, Roncari A, Amuchastegui S, Daniel KC, Uskokovic M. Dendritic cells as key targets for immunomodulation by Vitamin D receptor ligands. *Steroid Biochem Mol Biol* 2004;89-90(1-5):437-41.
11. Fritsche J, Mondal K, Ehrnsperger A, Andreesen R, Kreutz M. Regulation of  $25$ -hydroxyvitamin D $_3$ -1 alpha-hydroxylase and production of  $1$  alpha, $25$ -dihydroxyvitamin D $_3$  by human dendritic cells. *Blood* 2003;102(9):3314-6.
12. Hewison M, Freeman L, Hughes SV, Evans KN, Bland R, Eliopoulos AG, Kilby MD, Moss PA, Chakraverty R. Differential regulation of vitamin D receptor and its ligand in human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2003;170(11):5382-90.
13. Gottfried E, Rehli M, Hahn J, Holler E, Andreesen R, Kreutz M. Monocyte-derived cells express CYP27A1 and convert vitamin D $_3$  into its active metabolite. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;349(1):209-13.

14. Gauzzi MC, Purificato C, Donato K, Jin Y, Wang L, Daniel KC, Maghazachi AA, Belardelli F, Adorini L, Gessani S. Suppressive effect of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on type I IFN-mediated monocyte differentiation into dendritic cells: impairment of functional activities and chemotaxis. *J Immunol* 2005;174(1):270-6.
15. Enioutina EY, Bareyan D, Daynes RA. Vitamin D3-mediated alterations to myeloid dendritic cell trafficking *in vivo* expand the scope of their antigen presenting properties. *Vaccine* 2007;25(7):1236-49.
16. Penna G, Amuchastegui S, Giarratana N, Daniel KC, Vulcano M, Sozzani S, Adorini L. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2007;178:145.
17. Gauzzi MC, Gessani S. IRF4: a novel molecular player shaping dendritic cell development and activation. *Current Trends in Immunology* 2008;9:77-84.
18. Laouar Y, Welte T, Fu XY, Flavell RA. STAT3 is required for Flt3L-dependent dendritic cell differentiation. *Immunity*. 2003 Dec;19(6):903-12.
19. Gauzzi MC, Purificato C, Conti L, Adorini L, Belardelli F, Gessani S. IRF-4 expression in the human myeloid lineage: up-regulation during dendritic cell differentiation and inhibition by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *J Leukoc Biol* 2005;77(6):944-7.



## **IV SESSIONE**

### **Aspetti applicativi e normativi**



# RICERCA DI SOSTANZE NATURALI PER INTERVENTI PREVENTIVI E TERAPEUTICI IN ACQUACOLTURA

Emilio Guandalini (a), Cristiana Boros (b)

(a) Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Ufficio VI-RU, Istituto Superiore di Sanità, Roma

## Introduzione

Si stima che le perdite causate dalle patologie ittiche nelle produzioni d'acquacoltura arrivino intorno al 15-20% sul volume totale, con danni economici pari a diverse centinaia di milioni di euro/anno. Si tratta di pesci, crostacei e molluschi destinati all'alimentazione umana. Nei prossimi anni, la domanda di prodotti ittici crescerà ulteriormente, ma poiché la pesca ha raggiunto il massimo sostenibile delle catture, solo l'acquacoltura sembra essere in grado di soddisfare l'incremento della richiesta di pesce (1, 2). C'è quindi un forte interesse da parte delle agenzie internazionali, la *Food and Agriculture Organization* (FAO), l'*Office International des Epizooties* (OIE), la *Codex Alimentarius Commission* (CAC), a contenere il rischio sanitario negli allevamenti in tutte le aree geografiche del mondo. Le patologie ittiche sono numerose e gli interventi terapeutici e profilattici con farmaci tradizionali e vaccini, non sono sempre sufficienti ed efficaci. Inoltre, c'è una crescente attenzione alle problematiche di impatto ambientale per l'impiego di sostanze attive che entrano nell'ecosistema acquatico e di sicurezza degli alimenti in relazione alla potenziale presenza di residui chimici nei tessuti degli organismi acquatici. Per questi motivi, vengono avanzati nuovi approcci alla gestione delle problematiche sanitarie del comparto, proponendo l'impiego di sostanze più naturali come gli immunostimolanti (probiotici, polisaccaridi) e principi attivi estratti da piante e alghe. È un settore di ricerca in fase embrionale dove ci sono spazi per ipotizzare nuovi studi. Si interverrebbe su un settore di primaria importanza alimentare con i relativi aspetti della sicurezza alimentare, della farmacologia, della sanità pubblica veterinaria e del quadro normativo. Tutte tematiche che rientrano nelle competenze dell'ISS.

## Produzioni della pesca e dell'acquacoltura

Secondo dati FAO, nel 2005, la produzione ittica mondiale è stata di 141,4 milioni di tonnellate (t), inclusa l'acquacoltura con i suoi 48 milioni di t (Tabelle 1, 2). Questo settore contribuisce quindi con il 34% del volume totale e il valore economico dei suoi prodotti raggiunge i 71 miliardi di dollari. L'acquacoltura segna un costante sviluppo produttivo: negli ultimi 10 anni la produzione è quasi raddoppiata passando da 24,4 milioni di t nel 1995 a 48 milioni di t del 2005. Nel solo periodo 2001-2005 è cresciuta in media del 6% all'anno. Andamento diverso per la pesca che invece si è stabilizzata avendo raggiunto da anni il massimo delle catture, con una leggera tendenza al decremento (-1,6% rispetto al 2004), poiché più del 60% degli stock ittici di interesse della pesca è sovra sfruttato (2, 3).

Sempre la FAO stima che circa il 43% del pesce attualmente consumato sia di allevamento. Si valuta, inoltre, che entro il 2030, in relazione alla crescita della popolazione mondiale, saranno necessari ulteriori 40 milioni di t di organismi acquatici per mantenere gli attuali

consumi medi pro capite (16 kg). Solo l'acquacoltura sembra in grado di poter incrementare le produzioni sino a raggiungere quelle della pesca (2).

**Tabella 1. Produzione ittica in Italia nel 2006, in Unione Europea nel 2005 e mondiale nel 2005**

Tipo di produzione	Italia 2006*			Unione Europea 2005**			Mondiale 2005**		
	t (milioni)	%	Variaz. % (2004)	t (milioni)	%	Variaz. % (2004)	t (milioni)	%	Variaz. % (2004)
Pesca	269.523	55,1	-1,5	5.680	81,8	-2,6	93.253	65,9	-1,2
Acquacoltura	241.900	44,9	-1,7	1.262	18,2	-4,5	48.150	34,1	+4,8
<b>Totale</b>	<b>538.423</b>	<b>100</b>		<b>6.942</b>	<b>100</b>		<b>141.403</b>	<b>100</b>	

\* Fonti: FAO 2006 e ISMEA (Istituto di Servizi per il Mercato Agricolo Alimentare) 2007;

\*\* Fonte: FAO, 2006

**Tabella 2. Produzione acquacoltura in Italia 2006**

Specie	t	%
Spigole	9.300	12,9
Orate	9.500	13,2
Cefali	3.000	4,2
Anguille	1.700	2,4
Trote	40.200	55,9
Pesci gatto	600	0,8
Carpe	700	1,0
Storioni	1.300	1,8
Altri pesci*	5.600	7,8
<b>Totale pesci</b>	<b>71.900</b>	<b>100</b>
Mitili**	125.000	73,5
Vongole veraci	45.000	26,5
<b>Totale molluschi</b>	<b>170.000</b>	<b>100</b>
<b>Totale acquacoltura</b>	<b>241.900</b>	<b>100</b>

Fonte: Ismea, 2007

\*Insieme di ombrina, sarago, salmerino, luccio; \*\*Inclusi i mitili da banchi naturali

In questo scenario, appare del tutto evidente l'importanza che riveste l'acquacoltura quale fonte di produzione alimentare per l'uomo e anche per gli aspetti socio economici che implica per molti dei paesi in via di sviluppo, dove questo comparto rappresenta una delle principali voci dell'economia. Gli allevamenti degli organismi acquatici, intendendo in questo contesto solo pesci, crostacei e molluschi bivalvi, pur avendo raggiunto ottimi livelli tecnologici (impiantistica, qualità dei mangimi, qualità delle acque metodologie riproduttive), rimangono esposti al rischio sanitario, ovvero alla possibilità di contrarre patologie di varia eziologia e di diversa severità. Le patologie ittiche rappresentano le principali cause delle perdite di un impianto d'acquacoltura.

## Le patologie ittiche

Una delle più note malattie che ha causato ingenti danni economici è la *White Spot Disease*, un agente virale che colpisce i gamberi penecidi. Segnalata inizialmente nel 1991

nell'area di Taiwan, si è diffusa praticamente in tutti gli allevamenti di crostacei di tutto il mondo. La perdita economica determinata solo da questa patologia è stata stimata a 3 miliardi di dollari/anno (4). In Indonesia, nel 2003, la *Koi Herpes Virus* (KHV), una malattia virale delle carpe, ha causato perdite per 5,5 milioni di dollari. In Thailandia, tra il 1998 e il 2002, le perdite negli allevamenti di tilapia, causate da un piccolo crostaceo parassita (*Alitropus typus*), sono state valutate intorno a 468 milioni di dollari (5).

Nei paesi dell'Unione Europea (UE), la Commissione ha stimato nel 2004 che le perdite nel settore dell'acquacoltura, dovute alle patologie ittiche, siano nell'ordine al 20% rispetto alla produzione totale, pari ad un valore economico di 500 milioni di euro, su un valore complessivo di 2,5 miliardi di euro (6, 7).

In tutte le aree del mondo sono state riconosciute più di 200 le patologie che rivestono importanza sanitaria per gli allevamenti ittici. Ovviamente la maggior parte degli agenti eziologici è presente in determinate aree e per lo più colpisce solo specie suscettibili. Negli ultimi due decenni, però, gli scambi commerciali di animali vivi, con gli spostamenti di uova, avannotti e pesci vivi da aree geograficamente molto distanti hanno avuto un incremento enorme, veicolando così anche agenti infettivi nuovi in aree prima indenni. Quindi, i pesci allevati, come quelli selvatici, si possono ammalare come qualunque altro organismo animale a causa di infezioni dovute a batteri, virus, funghi e parassiti.

L'*Office International des Epizooties* (OIE) ha stilato una lista delle principali patologie ittiche di particolare importanza a livello internazionale (Tabelle 3 e 4).

Le malattie degli organismi acquatici rientrano nell'elenco della Lista B dell'OIE, cioè: malattie trasmissibili che sono considerate di importanza socio-economica e/o di salute pubblica e/o negli scambi commerciali internazionali. La notifica delle patologie della Lista B da parte dei paesi aderenti all'OIE è annuale, ma gli Stati membri sono invitati ugualmente ad avvisare se sono in corso focolai epidemici pericolosi per altre aree o specie indenni (13).

Negli allevamenti, dove generalmente è alto il carico di pesce per volume d'acqua (35-50 kg/m<sup>3</sup>), le condizioni di stress degli animali aumentano, favorendo lo sviluppo di infezioni. Per combattere le numerose patologie si è ricorsi all'impiego di vaccini, di farmaci veterinari e di varie sostanze disinfettanti. In una prima fase, questo tipo di intervento ha fatto registrare una complessiva riduzione delle infezioni, facendo sperare in una tranquilla gestione delle problematiche sanitarie. Così non è stato per diversi motivi:

1. introduzione e diffusione di nuovi agenti eziologici con effetti devastanti non solo per la mancanza di adeguati mezzi terapeutici, ma soprattutto perché il sistema immunitario delle nuove specie acquatiche infettate non riusciva ad esprimere alcuna risposta di difesa;
2. sviluppo dell'antibiotico resistenza in alcune specie di patogeni per l'eccessivo impiego di classi di antibiotici e conseguente ricomparsa di infezioni che si pensavano superate o controllabili ;
3. maggiore attenzione agli impatti ambientali conseguenti all'impiego non responsabile di sostanze attive;
4. introduzione di norme comunitarie più severe per l'uso del farmaco veterinario (Regolamenti CE n. 2377/90 e n. 726/2004).

Negli anni più recenti si è cercato di cambiare impostazione anche attraverso l'applicazione di linee guida sulle buone pratiche di allevamento e di un codice di condotta responsabile per la pesca e l'acquacoltura, orientate più sulle attività di prevenzione che di terapia (13). Parallelamente, sono stati elaborati nuovi vaccini e altri principi immunostimolanti che hanno contribuito a limitare la diffusione di certe patologie.

Nonostante questa evoluzione, molte malattie hanno continuato a manifestarsi e il ricorso a molecole farmacologicamente attive è spesso risultato indispensabile.

**Tabella 3. Malattie degli organismi acquatici (OIE)**

Organismi acquatici	Patologia	Specie sensibili
Pesci	Setticemia emorragica virale	Trota ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ; <i>Salmo trutta</i> ); coregone ( <i>Coregonus sp.</i> ); luccio ( <i>Esox lucius</i> ); Rombo <i>Scophthalmus maximus</i> ; temolo ( <i>Thy</i> )
	Viremia primaverile della carpa	Carpa ( <i>Cyprinus carpio</i> ; <i>Ctenopharyngodon Idellus</i> , <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> ; <i>Aristichthy nobilis</i> ; <i>Carassius carassius</i> ; <i>C. auratus</i> ); tinca ( <i>Tinca tinca</i> ); siluro ( <i>Silurus gl</i> )
	Necrosi ematopoietica infettiva	Salmonidi ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ; <i>O. nerka</i> ; <i>O. Tshawytscha</i> ; <i>O. keta</i> ; <i>O. masou</i> ; <i>O. rhodurus</i> ; <i>O. kisutch</i> ; <i>Salmo salar</i> )
	Necrosi ematopoietica epizootica	Trota ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ); persico ( <i>Perca fluviatilis</i> )
	Malattia da <i>Oncorhynchus masou virus</i>	Salmoni ( <i>Oncorhynchus nerka</i> ; <i>O. masou</i> ; <i>O. Keta</i> ; <i>O. kisutch</i> ; <i>O. mykiss</i> )
Molluschi	Bonamiosi ( <i>Bonamia exitiosus</i> ; <i>B. ostreae</i> )	Ostriche ( <i>Ostrea edulis</i> ; <i>O. angasi</i> ; <i>O. lurida</i> ; <i>O. puelchana</i> )
	Malattia MSX ( <i>Haplosporidium nelsoni</i> )	Ostriche ( <i>Crassostrea virginica</i> ; <i>C. gigas</i> ; <i>Ostrea edulis</i> ; <i>O. angasi</i> ) vongola ( <i>Ruditapes</i> )
	Perkinsosi ( <i>Perkinsus marinus</i> ; <i>P. olseni/atlanticus</i> )	<i>Crassostrea virginica</i> ; <i>Haliotis ruber</i>
	Marteiliosi ( <i>Martelia refrigens</i> ; <i>M. sydney</i> )	<i>Cassostrea</i> ; <i>Ostrea edulis</i> ; <i>Argopect. Gibbus</i> <i>Cardium edule</i> , <i>Mytilus edulis</i> , <i>M. maurini</i> .
	Mikrocytosi ( <i>Mikrocytos mackini</i> )	<i>Cassostrea gigas</i> ; <i>C. virginica</i> ; <i>Ostrea ed.</i>
Crostacei	Sindrome di Taura	<i>Penaeus vannamei</i> ; <i>P. stylirostris</i> ; <i>P. setiferus</i> .
	Malattia dei punti bianchi	<i>Penaeus monodon</i> ; <i>P. japonicus</i> ; <i>P. chinensis</i>
	Malattia della testa gialla	<i>Penaeus monodon</i>

**Tabella 4. Altre patologie, non in Lista B, ma considerate comunque significative dall'International Aquatic Animal Health Code dell'OIE, per i riflessi sulle produzioni d'acquacoltura**

Organismi acquatici	Patologia
Pesci	<i>Channel catfish virus disease</i>
	Encefalopatia e retinopatia virale
	Necrosi pancreatica infettiva
	Anemia infettiva del salmone
	Sindrome ulcerativa epizootica
	Malattia batterica renale ( <i>Renibacterium salmoninarum</i> )
	Setticemia enterica del pesce-gatto ( <i>Edwardsiella ictaluri</i> )
	Girodattilosi ( <i>Gyrodactylus salaricus</i> )
Malattia iridovirale dell'orata rossa	
Malattia iridovirale dello storione bianco	
Molluschi	Malattia degli organismi marini, SSO disease, ( <i>Haplosporidium costale</i> )
	Sindrome dell'appassimento degli abaloni ( <i>Candidatus xenohaliotis c.</i> )
Crostacei	<i>Tetrahedral baculovirus</i> ( <i>Baculovirus penaei</i> )
	<i>Spherical baculovirus</i> ( <i>Penaeus monodon</i> )
	Necrosi infettiva ipodermica ed ematopoietica
	Peste dei gamberi di fiume ( <i>Aphanomyces astaci</i> )
<i>Spawner-isolated mortality virus disease</i>	

## Farmaci veterinari autorizzati per l'acquacoltura in Italia

I farmaci veterinari, i principi attivi e altre sostanze ad azione disinfettante possono essere impiegati sugli animali acquatici solo se: i) valutati positivamente dall'EMEA e quindi inseriti negli allegati del Regolamento CE n. 2377/90; ii) registrati e autorizzati all'uso specifico per pesci dal Ministero della Salute. Le principali disposizioni legislative che regolamentano l'uso del farmaco veterinario sono:

### *Normativa italiana*

- Decreto Legislativo 6 aprile 2006, n. 193. Attuazione della direttiva 2004/28/CE recante codice comunitario dei medicinali veterinari.
- Decreto Legislativo 16 marzo 2006, n. 158. Attuazione della direttiva 2003/74/CE concernente il divieto di utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze beta-agoniste nelle produzioni animali.
- Comunicato Ministero della Salute. Elenco dei medicinali per uso veterinario registrati al 1° gennaio 200 cui sono attribuiti i tempi di sospensione cautelativi previsti dall'art.4 del decreto ministeriale 4 marzo 2005.
- Decreto 4 marzo 2005. Ministero della Salute. Revisione dei medicinali per uso veterinario.
- Decreto Legislativo 9 aprile 2003, n. 71. Attuazione delle direttive 2000/37/CE e 2001/82/CE concernenti medicinali veterinari.

### *Normativa comunitaria*

- Regolamento (CE) n. 726/2004 del 31 marzo 2004, che istituisce procedure comunitarie per l'autorizzazione e la sorveglianza dei medicinali per uso umano e veterinario, e che istituisce l'agenzia europea per i medicinali.
- Regolamento (CE) n. 178/2002 del 28 gennaio 2002, che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità Europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare.
- Regolamento(CE) n. 2377/90 del 26 giugno 1990, che definisce una procedura comunitaria per la determinazione dei limiti massimi di residui di medicinali veterinari negli alimenti di origine animale.

In base alle leggi sopra citate, i farmaci registrati in Italia per l'impiego specificatamente in acquacoltura al momento risultano: 1) *clortetraciclina*; 2) *ossitetraciclina*; 3) *amoxicillina*; 4) *flumequina*; 5) *sulfadiazina + trimetoprim*; 6) *bronopol*. I primi cinque principi sono molecole inserite nell'Allegato I del Regolamento 2377/90, quindi con definiti *livelli massimi di residui* (MRL). Il bronopol è inserito in Allegato II, quindi non necessita di MRL, e al momento è l'unico composto autorizzato dell'ampia classe dei disinfettanti che può essere impiegato direttamente nell'ambiente acquatico in presenza di pesci. ( 8-10).

I vaccini registrati sono per la prevenzione della Bocca rossa (*Yersinia ruckeri*) e della Vibriosi (*Vibrio anguillarum*, *V.salmonicida*). Il Ministero della Salute, ha autorizzato alcuni Istituti Zooprofilattici (IZS) alla produzione e all'impiego di vaccini stabulogeni contro la streptococcosi (Tabella 5).

Negli altri paesi europei, il numero dei principi attivi registrati per l'acquacoltura non si discosta molto da quello italiano. Solo alcune nazioni come Danimarca, Finlandia, Irlanda e Gran Bretagna utilizzano in più alcuni antiparassitari per salmoni (cypermetrina, deltametrina, diflubenzuron, teflubenzuron). Principi con MRL definito.

È dunque evidente che l'attuale disponibilità di sostanze terapeutiche registrate per l'acquacoltura in Italia, come per numerosi altri paesi UE, sia piuttosto esigua. Soprattutto in relazione alle numerose patologie che possono presentarsi negli allevamenti ittici (Tabelle 6 e 7).

Tabella 5. Farmaci registrati in Italia per l'acquacoltura

Farmaco	MRL	Patologie	Pesci
Clortetraciclina/	100 µg/kg (muscolo + pelle)	Foruncolosi ( <i>Aeromonas salmonicida</i> )	Salmonidi
Ossitetraciclina		Pseudotubercolosi ( <i>Photobacterium damselae ssp. piscicida</i> )	Pesci marini
		Vibriosi ( <i>Vibrio anguillarum</i> , <i>V. orali</i> ); Bocca rossa ( <i>Yersinia ruckeri</i> )	Salmonidi
		Infezioni da <i>A. hydrophila</i> ; <i>Edwardsiella tarda</i> ; <i>Flexibacter sp.</i>	Anguilla, ciprinidi
Amoxicillina triidrato	50 µg/kg (muscolo + pelle)	Foruncolosi ( <i>Aeromonas sp.</i> ); Pseudotubercolosi	Salmonidi
		( <i>Photobacterium damselae ssp. piscicida</i> ); Streptococcosi ( <i>Streptococcus sp.</i> ; <i>Lactococcus garvie</i> )	Pesci marini
Flumequina	600 µg/kg (muscolo + pelle)	Foruncolosi ( <i>Aeromonas sp.</i> ; <i>A. hydrophila</i> ); Vibriosi ( <i>V. anguillarum</i> ; <i>V. orali</i> ); Bocca rossa ( <i>Y. ruckeri</i> ).	Salmonidi
Sulfadiazina + Trimetoprim	100 µg/kg (muscolo + pelle)	Foruncolosi ( <i>Aeromonas sp.</i> ); Vibriosi ( <i>V. anguillarum</i> ; <i>V. salmonicida</i> ); Bocca rossa ( <i>Y. ruckeri</i> ).	Salmonidi
Bronopol	Nessuno (All. II)	Micosi ( <i>Saprolegnia spp.</i> ); Infezioni batteriche aspecifiche	Salmonidi

Tabella 6. Elenco delle malattie esotiche di animali acquatici secondo il DL.vo n. 148/2008 (Attuazione Direttiva 2006/88/CE)

Organismi acquatici	Malattia	Specie sensibili
Pesci	Necrosi ematopoietica epizootica	Trota iridea ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ), pesce persico ( <i>Perca fluviatilis</i> ).
	Sindrome ulcerativa epizootica	Genera: <i>Catla</i> , <i>Channa</i> , <i>Labeo</i> , <i>Mastacembelus</i> , <i>Mugil</i> , <i>Puntius</i> , <i>Trichogaster</i> .
Molluschi	Infezione da <i>Bonamia exitiosa</i>	Ostrica piatta australiana ( <i>Ostrea angasi</i> ) e ostrica cilena ( <i>Ostrea chilensis</i> )
	Infezione da <i>Perkinsus marinus</i>	Ostrica giapponese ( <i>Crassostrea gigas</i> ), ostrica della Virginia ( <i>Crassostrea virginica</i> )
	Infezione da <i>Microcytos mackini</i>	Ostrica giapponese ( <i>Crassostrea gigas</i> ), ostrica della Virginia ( <i>Crassostrea virginica</i> ), ostrica di Olimpia ( <i>Ostrea conchaphila</i> ), ostrica piatta ( <i>Ostrea edulis</i> ).
Crostei	Sindrome di Taura	Gambero bianco del Golfo ( <i>Penaeus setiferus</i> ), gambero blu del Pacifico ( <i>Penaeus stylirostris</i> ), gambero dalle zampe bianche del Pacifico ( <i>Penaeus vannamei</i> ).
	Malattia della testa gialla	Gambero nero del Golfo ( <i>Penaeus aztecus</i> ), gambero rosa ( <i>P. duorarum</i> ), gambero Kuruma ( <i>P. japonicus</i> ), gambero tigre nero ( <i>P. monodon</i> ), gambero bianco del Golfo ( <i>P. setiferus</i> ), gambero blu del Pacifico ( <i>Penaeus stylirostris</i> ), gambero dalle zampe bianche del Pacifico ( <i>Penaeus vannamei</i> ).

**Tabella 7. Elenco delle malattie non esotiche di animali acquatici secondo il DL.vo n. 148/2008 (Attuazione Direttiva 2006/88/CE)**

Organismi acquatici	Malattia	Specie sensibili
Pesci	Viremia primaverile delle carpe (SVC) <u>(Patologia cancellata dal presente elenco con specifica direttiva 2008/88/CE)</u>	Carpa testa grossa ( <i>Aristichthys nobilis</i> ), Carassio dorato ( <i>Carassius auratus</i> ), carassio comune ( <i>Carassius carassius</i> ), carpa erbivora ( <i>Ctenopharyngodon idellus</i> ), carpa comune ( <i>Cyprinus carpio</i> ), carpa argentata ( <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> ), siluro ( <i>Silurus glanis</i> ), tinca ( <i>Tinca tinca</i> ).
	Setticemia emorragica virale (VHS)	Aringa ( <i>Clupea sp.</i> ), coregoni ( <i>Coregonus sp.</i> ), luccio ( <i>Esox lucius</i> ), eglefino ( <i>Gadus aeglefinus</i> ), merluzzo del Pacifico ( <i>Gadus macrocephalus</i> ), merluzzo bianco ( <i>Gadus morhua</i> ), salmone del Pacifico ( <i>Oncorhynchus sp.</i> ), trota iridea ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ), motella ( <i>Onos mustelus</i> ), salmo trota ( <i>Salmo trutta</i> ), rombo ( <i>Scophthalmus maximus</i> ), spratto ( <i>Sprattus sprattus</i> ), temolo ( <i>Thymallus thymallus</i> ).
	Necrosi ematopoietica infettiva (IHN)	Salmone keta ( <i>Oncorhynchus keta</i> ), salmone argentato ( <i>O.kisutch</i> ), salmone giapponese ( <i>O.nerka</i> ), salmone rosa ( <i>O.rhodurus</i> ), salmone reale ( <i>O.tshawytscha</i> ), salmone atlantico ( <i>Salmo salar</i> ).
	Virus erpetico (KHV) Anemia infettiva del salmone (ISA)	Carpa comune ( <i>Cyprinus carpio</i> ) Trota iridea ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ), salmone atlantico ( <i>Salmo salar</i> ), salmo trota ( <i>Salmo trutta</i> ).
Molluschi	Infezione da <i>Marteilia refrigens</i>	Ostrica piatta australiana ( <i>Ostrea angasi</i> ) ostrica cilena ( <i>Ostrea chilensis</i> ), ostrica piatta europea ( <i>Ostrea edulis</i> ), ostrica argentina ( <i>O.puelchana</i> ), mitilo ( <i>Mytilus edulis</i> , <i>M.galloprovincialis</i> ).
	Infezione da <i>Bonamia ostreae</i>	Ostrica piatta australiana ( <i>Ostrea angasi</i> ) ostrica cilena ( <i>Ostrea chilensis</i> ), ostrica di Olympia ( <i>O.conchaphila</i> ), ostrica asiatica ( <i>O.denselammellosa</i> ), ostrica piatta europea ( <i>Ostrea edulis</i> ), ostrica argentina ( <i>O.puelchana</i> ).
Crostacei	Malattia dei punti bianchi	Tutti i decapodi (ordine <i>Decapoda</i> ).

## L'impiego di sostanze naturali in acquacoltura

Negli ultimi anni, alla luce delle problematiche e dei limiti precedentemente descritti, è cresciuta l'attenzione verso il potenziale espresso dalle sostanze naturali. Al momento non sono molti i principi naturali utilizzati in piscicoltura, ma solo perché gli studi e le ricerche in questo campo sono molto giovani.

### 1. Beta-glucani

Già da diversi anni, 1,3/1,6 beta-glucani (polisaccaridi) vengono impiegati come additivi nei mangimi per pesci poiché è stato osservato che stimolano il sistema immunitario, determinando nel complesso una maggiore produzione di macrofagi e di lisozima. I beta-

glucani sono utilizzati sia per pesci d'acqua dolce che marina e anche per gamberi peneidi.

### 2. Probiotici

Gatesoupe definisce probiotici “*selezionati organismi microbici che vengono appositamente somministrati e che giungono intatti nel tratto gastrointestinale da dove sviluppano benefici effetti sull'organismo dell'ospite*” (11). I benefici di questi integratori alimentari microbici si manifestano attraverso il miglioramento dei meccanismi enzimatici della digestione che permettono di assimilare meglio il cibo, inibiscono i microrganismi patogeni e accrescono la risposta immunitaria (12). *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus* spp., *Carnobacterium inihbens*, *Vibrio alginolyticus*, *Pseudomonas* spp., *Lactobacillus* spp, sono le specie di batteri più comunemente usati come probiotici. *Saccharomyces cerevisiae* tra i funghi. Generalmente si impiegano le spore o ceppi attenuati o componenti purificate di questi microrganismi.

### 3. Microalghe

*Tetraselmis suecica* è una specie di microalga che ha mostrato una marcata capacità di inibire diversi agenti patogeni dei pesci. È stato osservato che somministrata attraverso il mangime riduce la mortalità causata da *A. salmonicida*, *V. anguillarum*, *Yersinia ruckeri*. Questa attività è stata confermata anche su colture cellulari in laboratorio.

## Conclusioni

La situazione sanitaria degli organismi acquatici destinati al consumo alimentare umano costituisce una preoccupazione per molte agenzie internazionali (FAO, OIE, CODEX, Commissione UE) e per molte amministrazioni governative dove l'attività d'acquacoltura è un segmento produttivo molto importante (i paesi dell'Africa, dei Caraibi e del Pacifico, paesi ACP). Le perdite economiche determinate dalle patologie ittiche sono ragguardevoli sia in termini di volumi che di valore economico, come riportato all'inizio.

Per arginare la diffusione dei patogeni l'OIE ha stilato una lista delle malattie di maggiore impatto a livello internazionale (Tabella 1), così come la Comunità Europea ha emanato la direttiva 2006/88/CE relativa alle condizioni di polizia sanitaria applicabili alle specie animali d'acquacoltura, per prevenire alcune malattie. Questa direttiva è stata recepita dall'Italia con il DL.vo n. 148 del 4 agosto 2008.

In questa norma viene considerato lo stato sanitario della zona e il rischio di contrarre e diffondere le malattie da parte delle aziende ittiche. Inoltre, è stata compilata una lista delle patologie considerate a maggior rischio di diffusione e di impatto socio-sanitario in ambito comunitario (Tabelle 3 e 4). Queste norme cercano solo di organizzare alcune misure di prevenzione. Rimane comunque alto il rischio di contrarre infezioni per le specie acquatiche allevate e si ripropone la questione degli interventi profilattici e terapeutici tradizionali. Questi mostrano molti limiti, come analizzato precedentemente (disponibilità, efficacia, impatto, residui, resistenza), infatti non risultano esserci rimedi validi per una serie di importanti patologie ittiche presenti nella maricoltura italiana (ma anche di altri paesi mediterranei), come la Necrosi Virale del Sistema Nervoso (VNN), la Tuberculosis (*Mycobacterium marinum*), l'Infezione Enterica (*Enteromyxum leei*), la Linfocisti (Iridovirus), la *Winter disease*, le infezioni parassitarie da protozoi, elminti, ectoparassiti.

Senza principi attivi anche alcune importanti patologie dei pesci allevati in d'acqua dolce: la Necrosi Ematopoietica Infettiva (IHN-Rhabdovirus), la Malattia Proliferativa Renale (PKD-*Tetracapsuloides bryosalmonae*).

La streptococcosi (*Lactococcus garvieae*, *Streptococcus iniae*, *S. agalactiae*), che ha causato importanti perdite negli anni passati, è ora contrastata da vaccini stabulogeni prodotti da alcuni IZS. In Italia è registrata una sola sostanza disinfettante presente in Allegato II. Al momento non risulta registrato alcun anestetico, né antiparassitario.

Tale situazione, consente di ipotizzare una diversa strategia nella ricerca scientifica per l'individuazione di nuovi principi presenti negli organismi vegetali o provenienti dall'attività della flora batterica e fungina. Sostanze che stanno offrendo interessanti risultati.

Ovviamente, anche gli elementi attivi provenienti dalle sostanze naturali per impiego in acquacoltura devono rientrare nei basilari principi della farmacopea classica: efficacia, sicurezza e qualità. Inoltre, la ricerca di questo tipo di sostanze dovrebbe tenere in considerazione la reperibilità dei prodotti base (piante, alghe) e i costi finali non dovrebbero risultare eccessivi per le aziende ittiche, soprattutto in confronto con quelli tradizionali.

Infine, l'impiego di sostanze naturali alternative a quelle tradizionali per contrastare le eventuali patologie assume crescente importanza in relazione allo sviluppo di allevamenti ittici che producono applicando i principi dell'agricoltura biologica (3).

## Bibliografia

1. Food and Agriculture Organisation of the United Nations. State of World Aquaculture 2006. *FAO Fisheries Technical Paper* 2006;500.
2. Food and Agriculture Organisation of the United Nations. Review of the current state of world aquaculture insurance. *Fao Fisheries Technical Paper* 2006;493.
3. Istituto di Servizi per il Mercato Agricolo Alimentare (ISMEA). *Il settore ittico in Italia e nel mondo: le tendenze recenti. Filiera Pesca ed Acquacoltura*. Roma: ISMEA; novembre 2007.
4. Hill BJ. National and International impacts of white spot disease of shrimp. *Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Conference of the European Association of Fish Pathologists*. Dublin 9-14 Sep 2001; 2001. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 22(2) 2002, 58. Disponibile all'indirizzo: <http://eafp.org/eafp-bulletin-archive/2002-volume-22/issue-2/>; ultima consultazione 22/1/2009.
5. Food and Agriculture Organisation of the United Nations. *Preventative medicine: dealing with aquatic animal diseases in Asia*. FAONewsroom; 2004. Disponibile all'indirizzo: <http://www.fao.org/newsroom/EN/news/2004/50753/index.html>; ultima consultazione 16/1/2009.
6. Europa. Commissione delle Comunità Europee. COM(2005)362-1, 2005/0153/CNS del 23/08/2005. *Proposta di Direttiva del Consiglio relativa alle condizioni di polizia sanitaria applicabili alle specie animali d'acquacoltura e ai relativi prodotti, nonché alla prevenzione di talune malattie degli animali acquatici e alle misure di lotta contro tali malattie*.
7. Istituto di Servizi per il Mercato Agricolo Alimentare (ISMEA). *La gestione del rischio nel settore ittico. Quaderni Pesca ed Acquacoltura*. Roma: ISMEA; febbraio 2006.
8. Guandalini E. *Farmaci e disinfettanti utilizzabili in acquacoltura in Italia e nei paesi UE (Reg.CE n. 2377/90)*. Milano: Libri Editore API; 2003.
9. Guandalini E, Esposito AM, Lucchetti D, Fabrizi L, Coni E. L'impiego di eritromicina in acquacoltura: tempi di deplezione e di sospensione per le trote, p. 52, *Atti XIII<sup>o</sup> Convegno Nazionale Società Italiana Patologia Ittica*, Abano Terme (PD), 26-28 ottobre 2006. Disponibile all'indirizzo: <http://www.sipi-online.it/Convegni/abano%20terme%202006/abstract%202006.pdf>; ultima consultazione 22/1/2009.
10. Lucchetti D, Fabrizi L, Guandalini E, Podestà E, Marvasi L, Zaghini A, Coni E. Long depletion time of enrofloxacin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(10):3912-7.
11. Gatesoupe FJ. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 1999;180:147-65.

12. Kim DH, Austin B. Innate immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotics. *Fish & Shellfish Immunology* 2006;21:513-24.
13. Food and Agriculture Organisation of the United Nations. *Code of Conduct for Responsible Fisheries*. FAO; 1995.
14. World Organization for Animal Health, Office International des Epizooties (OIE). *International Aquatic Animal Health Code*. Paris: OIE; 2008.

# PRODOTTI DI NATURA VEGETALE IN ITALIA E NELLA COMUNITÀ EUROPEA: ASPETTI NORMATIVI

Maria Francesca Cometa  
*Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## Introduzione

Il mondo dei prodotti commerciali a base di sostanze di origine vegetale, generalmente connotati come “naturali”, è al giorno d’oggi differenziato in svariate categorie merceologiche. Tali prodotti, a causa del potenziale impatto sulla salute pubblica, sono oggetto di controllo e valutazione da parte delle autorità sanitarie. La problematica si rivela critica non tanto per le specie vegetali, i cui requisiti di carattere terapeutico li rendono assoggettabili ai criteri previsti dalla normativa del settore farmaceutico, ma in riferimento a tutti gli altri prodotti per i quali il confine fra l’azione terapeutica e quella funzionale o salutistica ancora non è stato tracciato in maniera chiara e univoca e sono, pertanto, definiti prodotti *borderline*. La presenza di quest’ultimi è sostanzialmente dovuta alla carenza di un quadro legislativo specificatamente indirizzato ai prodotti “erboristici” rimandando al quadro normativo, sia comunitario sia nazionale, in riferimento ai campi di definizione di medicinale/dispositivo medico/ integratore alimentare/cosmetico. I requisiti indicati in ambito legislativo per le suddette categorie merceologiche spesso riservano delle sovrapposizioni, inducendo ad un’ambiguità interpretativa per la corretta collocazione all’interno del mercato e quindi determinando un impatto critico per la conseguente valutazione e controllo degli stessi.

## Campi di applicazione dei prodotti di natura vegetale

Le differenziate categorie merceologiche presso le quali trovano applicazione i prodotti di origine vegetale sono essenzialmente rappresentate da quella delle specialità medicinali, degli integratori alimentari, dei cosmetici e dei dispositivi medici. Campi di ulteriore sviluppo applicativo, ma non compresi nella presente relazione, sono quelli rappresentati dai prodotti veterinari (compresi quelli di cosmesi) e prodotti omeopatici.

Nell’ambito della categoria delle specialità medicinali, i prodotti a base vegetale devono sostanzialmente avere gli stessi e rigorosi requisiti previsti sia dalla normativa nazionale (1) sia da quella comunitaria (2-4) in linea con le procedure di registrazione dei medicinali per uso umano. Un primo passo determinante verso il riconoscimento e quindi la “registrazione” di prodotti a base di sostanze vegetali con caratteristiche medicinali identificabili da un impiego “tradizionale” è stato recentemente fatto in ambito comunitario con la direttiva 2004/24/CE (5).

Per quanto riguarda tutti gli altri prodotti “erboristici” non assoggettati alla legislazione farmaceutica, e che comunque rappresentano la stragrande maggioranza sul mercato, una prima svolta di orientamento a livello nazionale è stata effettuata dal Ministero della Salute collocando nel settore alimentare i derivati da specie vegetali in associazione e a complemento della componente nutrizionale di integratori alimentari proposti al consumatore per il miglioramento dello stato nutrizionale e per favorire lo stato di benessere (6). Tale indicazione ha subordinato quindi la commercializzazione di questa tipologia di prodotti erboristici, o che contengano

derivati di piante, alle procedure previste dal DL.vo 111/1992 per gli integratori alimentari (7) escludendo dalla procedura di notifica gli ingredienti vegetali di tradizionale impiego alimentare (Camomilla, Tè ecc.) che permangono nel campo legislativo dei normali alimenti. Il settore degli integratori alimentari è stato poi ulteriormente soggetto ad aggiornamenti con il DL.vo n. 169 del 21 maggio 2004 (8) che recepisce la Direttiva del Parlamento Europeo e del Consiglio per il riavvicinamento delle legislazioni degli stati membri relative agli integratori alimentari (Direttiva 2002/46/CE) (9).

In ambito cosmetico, l'impiego dei prodotti di origine vegetale ha subito negli ultimi tempi un notevole incremento. Essi rientrano a pieno titolo nella normativa che disciplina la produzione e la vendita dei cosmetici (legge n. 713 dell'11 ottobre 1986) (10). La legge ha recepito la direttiva comunitaria 76/768/CEE (attualmente al settimo emendamento) (11), emanata al fine di rendere uniforme a livello europeo la disciplina relativa alla produzione e alla vendita dei cosmetici ed è stata successivamente soggetta ad aggiornamenti (DL.vo 300/1991, DL.vo 126/1997; DL.vo 50/2005) (12-14) in attuazione degli ultimi emendamenti alla Direttiva base (Dir. 2003/15/CE e 2003/83/CE) (15, 16).

Prodotti di origine vegetale o "sostanze naturali" possono a loro volta essere inclusi nella categoria dei dispositivi medici in accordo al DL.vo 46/1997 (17) che recepisce la Direttiva Comunitaria 93/42/CEE (18) recentemente modificata dalla nuova Direttiva del Parlamento e del Consiglio 2007/47/CE il cui recepimento dagli Stati Membri è previsto per il 21 Dicembre 2008 (19).

## Specialità medicinali e prodotti tradizionali

Il DL.vo n. 219 del 24 Aprile 2006 che recepisce le ultime direttive in materia di medicinali per uso umano (1, 3, 4) definisce con il termine "medicinale" (Articolo1):

- a) *ogni sostanza o associazione di sostanze presentata come avente proprietà curative o profilattiche delle malattie umane;*
- b) *ogni sostanza o associazione di sostanze che può essere utilizzata sull'uomo o somministrata all'uomo allo scopo di ripristinare, correggere o modificare funzioni fisiologiche, esercitando un'azione farmacologica, immunologica o metabolica, ovvero di stabilire una diagnosi medica.*

Con il termine "sostanza": *ogni materia, indipendentemente dall'origine; tale origine può essere: umana (omissis), animale (omissis), vegetale, come: microorganismi, piante, parti di piante, secrezioni vegetali, sostanze ottenute per estrazione; chimica, come: elementi, materie chimiche naturali e prodotti chimici di trasformazione e di sintesi (omissis). Il decreto intende per sostanze vegetali: tutte le piante, le parti di piante, le alghe, i funghi e i licheni, interi, a pezzi o tagliati, in forma non trattata, di solito essiccata, ma talvolta anche allo stato fresco (omissis) tali essudati non sottoposti ad un trattamento specifico. Le sostanze vegetali sono definite in base alla parte di pianta utilizzata e alla denominazione botanica binomiale (genere, specie, varietà e autore).*

Nel campo di applicazione dello stesso decreto (Articolo 2, comma 2) è inoltre stabilito che *in caso di dubbio, se un prodotto, tenuto conto dell'insieme delle sue caratteristiche, può rientrare contemporaneamente nella definizione di medicinale e nella definizione di un prodotto disciplinato da un'altra normativa comunitaria, si applicano le disposizioni del presente decreto.*

Alla luce di tali evidenze, la collocazione del prodotto "naturale di origine vegetale" nel campo delle specialità medicinali, richiede esattamente identici requisiti di qualità, sicurezza ed efficacia previsti per la registrazione di altre nuove tipologie di specialità medicinali sia per le

nuove Autorizzazioni d'Immissione in Commercio (AIC) Nazionali sia in ambito comunitario secondo le procedure previste dall'Agenzia Europea dei Medicinali (EMA) (2). Il dossier richiesto dalle Autorità Competenti per l'autorizzazione al commercio di un nuovo medicinale deve dunque contenere informazioni e documenti relativi alla qualità, alla sicurezza e all'efficacia del prodotto candidato al mercato farmaceutico. Gli aspetti della qualità opportunamente da documentare in ambito registrativo e di richiesta di sperimentazione clinica sull'uomo, riguardano la caratterizzazione chimica del principio attivo contenuto nella specialità medicinale e l'esatta composizione di quest'ultima ed eventuali aspetti di tipo biologico o microbiologico attraverso l'impiego di rigorosi e validati test scientifici. All'occorrenza è necessario considerare l'obbligo da parte del produttore di "fabbricare" la specialità medicinale in accordo alle Buone Pratiche di Fabbricazione (*Good Manufacturing Practice o GMP*) stabilite in ambito comunitario sin dal 1991 (20) e successivamente aggiornate estendendole ai medicinali in fase di sperimentazione (21).

Gli aspetti della sicurezza di un potenziale medicinale per uso umano sono stabiliti in ambito regolatorio prevalentemente a livello pre-clinico ossia attraverso test tossicologici (di tossicità acuta, ripetuta, di *safety* farmacologica, tossicità riproduttiva e dello sviluppo, test di mutagenesi e cancerogenesi), adeguatamente condotti in modelli sperimentali animali, sia *in vitro* sia *in vivo*, e negli studi clinici di fase I condotti sul volontario sano. Anche per gli aspetti della sicurezza è previsto l'obbligo di condurre alcuni e specifici studi tossicologici in accordo alle Buone Pratiche di Laboratorio (*Good Laboratory Practice, GLP*) (22, 23).

Ai fini della caratterizzazione della sicurezza di un prodotto medicinale è dunque necessario conoscere il suo "profilo tossicologico" per poter effettuare una adeguata valutazione del rapporto rischio/beneficio.

Tuttavia, gli studi pre-registrativi consentono di evidenziare gli effetti avversi più frequenti. Gli effetti avversi più rari (in genere più pericolosi) possono essere valutati solo dopo l'immissione in commercio del farmaco (farmacovigilanza).

Per quanto riguarda la valutazione dell'efficacia di un potenziale prodotto medicinale, gli studi *in vitro* e nell'animale consentono di definire il 'profilo farmacologico' di una sostanza (legame a recettori, azione agonista o antagonista, effetti su organi e sistemi ecc.). Queste informazioni sono tuttavia insufficienti per prevedere l'effetto terapeutico nell'uomo. La valutazione dell'efficacia in una determinata patologia è valutata infatti mediante studi clinici condotti su pazienti selezionati; si basa sul monitoraggio di parametri clinicamente significativi e pre-determinati (*endpoints*); è sempre comparativa in confronto con quella di un farmaco di riferimento o rispetto al placebo. Le disposizioni legislative in materia di sperimentazioni cliniche obbligano la conduzione di quest'ultime secondo le procedure comunitarie (24, 25) previste dalla Buona Pratica Clinica (*Good Clinical Practice, GCP*) e recepite in Italia con il DL.vo n. 211/2003 (26).

Il processo dello sviluppo di un farmaco è dunque molto articolato e complesso (Figura 1) e sulla base dei requisiti richiesti in ambito regolatorio, la collocazione di prodotti a base di sostanze di natura vegetale è piuttosto poco frequente.

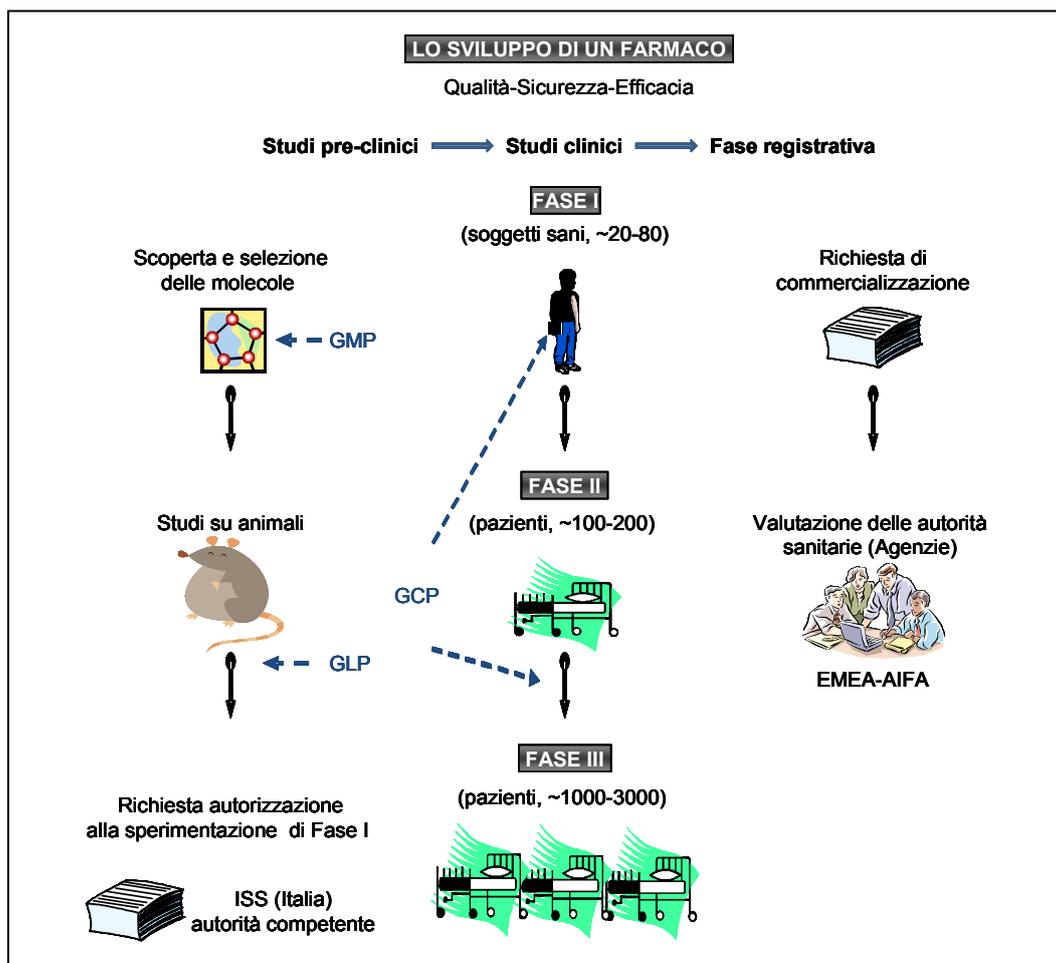


Figura 1. Fasi che caratterizzano lo sviluppo di un farmaco ai fini della registrazione e relativi rapporti con i sistemi di qualità. GMP: *Good Manufacturing Practice*; GLP: *Good Laboratory Practice*; GCP: *Good Clinical Practice*

Problemi nella valutazione della qualità, sicurezza ed efficacia di tale tipologia di prodotti sono infatti essenzialmente legati alla variabilità della composizione, alla non conoscenza del “componente attivo” che di conseguenza non permette di stabilire (esattamente) una posologia per gli studi clinici. Nel caso il componente attivo sia stato identificato (come per esempio per digossina, teofillina, alcaloidi della *Vinca*) e quindi purificato è possibile valutarne l’efficacia e la sicurezza come per i farmaci di sintesi.

Un aspetto peculiare dei prodotti naturali con caratteristiche medicinali riguarda essenzialmente la questione che tali prodotti sono generalmente “pensati” per patologie “minori” (raffreddori, dolori lievi ecc.), per stati di “non benessere” (costipazione, dispepsia, inappetenza ecc.), come prevenzione generica (“adattogeni”, “immunostimolanti”) e in alcuni casi per quadri lievi di patologie “maggiori” (iperico, aglio).

Tenendo in considerazione che gli studi clinici accettati in ambito regolatorio presentano degli obiettivi definiti, che inquadrano l’esatta definizione della patologia, includono la puntuale descrizione dei parametri con cui valutare l’efficacia, ed effettuano una selezione mirata dei pazienti (con precisi criteri di inclusione ed esclusione), è intuitivo immaginare la motivazione

per cui allo stato attuale esistono pochissime preparazioni vegetali autorizzate (registrate) come prodotti medicinali.

In soccorso dell'intera categoria dei prodotti medicinali a base di sostanze vegetali, inducendo ad un nuovo forte orientamento in ambito comunitario è arrivata la Direttiva 2004/24/CE (5), finalizzata ad uniformare la legislazione relativa ai prodotti medicinali vegetali di uso consolidato. La Direttiva in questione ha introdotto una serie di norme adatte a garantire sicurezza e qualità di questi particolari prodotti medicinali. Il presupposto fondamentale su cui è stata costruita la nuova direttiva risiede nell'accettazione che la lunga tradizione di impiego di un prodotto derivato da specie vegetali possa essere un principio valido per permettere la semplificazione e l'abbreviazione dei tempi di registrazione, alla stregua di quanto previsto per il componente o i componenti del medicinale con impiego medicinale ben noto e con riconosciuta efficacia e un livello accettabile di sicurezza per i quali, ai sensi delle recenti direttive europee, il richiedente non è tenuto a fornire i risultati di prove precliniche o quelli delle sperimentazioni cliniche. Tenendo conto delle specificità delle peculiarità delle medicinali vegetali è stato istituito il Comitato dei Medicinali Vegetali (*Herbal Medicinal Product Committee - HMPC*) presso l'EMA con lo scopo di svolgere compiti relativi alla registrazione semplificata e all'autorizzazione dei medicinali vegetali tradizionali promuovendo il processo di armonizzazione tra i vari Stati Membri. L'HMPC svolge le sue funzioni attraverso la redazione di Monografie comunitarie alle quali i richiedenti dell'autorizzazione all'immissione in commercio potranno fare riferimento ai fini della registrazione e dell'autorizzazione dei medicinali di origine vegetale e redige appositi elenchi di "sostanze" vegetali con caratteristiche medicinali, che soddisfino i criteri per l'uso tradizionale, ovvero che rispondano a determinati requisiti di efficacia e sicurezza e che siano quindi considerate innocue alle normali condizioni d'impiego. In questo elenco sono specificate le indicazioni, la posologia, la via di somministrazione e ogni altra informazione utile per l'impiego sicuro. Il Comitato svolge anche una serie di compiti riguardanti i medicinali di origine vegetale già in commercio, come le attività di farmacovigilanza, di produzione e importazione, di variazioni di registrazioni già concesse e ispezioni.

In funzione delle indicazioni emesse dall'HMPC, secondo la direttiva sui "medicinali vegetali tradizionali", ai fini della registrazione, quindi, non è necessario presentare un dossier completo degli studi relativi alle proprietà farmacodinamiche, farmacocinetiche e tossicologiche e alle evidenze di efficacia clinica di questi potenziali specialità medicinali, ma è sufficiente sottoporre all'autorità competente dello Stato membro interessato, una puntuale rassegna bibliografica corredata da una relazione di un esperto comprovanti efficacia e sicurezza, sulla base di un periodo di impiego pari a 30 anni, di cui almeno 15 all'interno della Comunità Europea. Su richiesta dello Stato membro in cui è stata presentata la domanda di registrazione per l'impiego tradizionale, l'HMPC esprime un parere sull'adeguatezza della dimostrazione dell'uso di lunga durata del medicinale in questione o del prodotto corrispondente. La direttiva specifica comunque che l'uso tradizionale non esclude che possano esistere problemi riguardo alla sicurezza di questi prodotti; di conseguenza le autorità competenti degli Stati Membri hanno facoltà di richiedere ai produttori l'esibizione di tutti i dati necessari ai fini della valutazione del profilo di sicurezza. Gli aspetti della qualità devono essere puntualmente riportati nel dossier di registrazione e devono essere completi in riferimento alla produzione nel rispetto delle norme di buona fabbricazione (GMP) e non sono concesse deroghe all'obbligo di effettuare le necessarie prove chimico-fisiche, biologiche e microbiologiche.

I requisiti richiesti per i medicinali tradizionali di origine vegetale secondo i quali può essere applicata la procedura di registrazione semplificata in accordo alla direttiva 2004/24/CE sono:

- Le indicazioni di utilizzo non richiedono diagnosi, prescrizione o controllo medico.
- La somministrazione prevista è solo in una determinata concentrazione e posologia.

- La specialità è destinata per l'uso orale, esterno e/o inalatorio.
- La "sostanza o il preparato vegetale" detiene un impiego per un periodo di almeno 30 anni anteriormente alla data di presentazione della domanda di registrazione, di cui almeno 15 nella UE.
- Il prodotto ha dimostrato di non essere nocivo nelle normali condizioni di uso indicate.
- L'efficacia deve essere verosimile sulla base dell'impiego di lunga data.
- In caso di presenza nel medicinale vegetale di vitamine o minerali, questi ultimi devono avere un'azione secondaria rispetto a quella dei principi attivi vegetali in funzione delle indicazioni specifiche richieste.

La lista delle sostanze e preparati vegetali sui quali l'HMPC sta adottando indicazioni e aggiornata a settembre 2008 è riportata in Allegato A.

## Integratori alimentari

La problematica relativa alla definizione dei criteri distintivi per il riconoscimento di una specie vegetale a fini medicinali o dietetici/alimentari rimane, dal punto di vista della sicurezza d'uso, un argomento molto sentito in ambito comunitario, tenendo conto di quanto detto per le specialità medicinali per le quali si applicano procedure di autorizzazioni mirate, rilasciate solo dopo un'accurata verifica della rispondenza a criteri di qualità/sicurezza ed efficacia che permettono un'adeguata valutazione del rischio per il consumatore esposto. Per gli alimenti e in particolare per gli integratori non sussiste una preventiva valutazione del rischio caso per caso ma, nella migliore delle ipotesi, una valutazione delle caratteristiche tossicologiche e farmacologiche della specie vegetale da cui la preparazione è derivata (27). Inoltre fino a pochi anni fa gli integratori alimentari erano soggetti a normative differenti nei vari stati membri dell'UE ma, con l'aumentato consumo è maturata la necessità di maggiori garanzie per il consumatore e il bisogno di creare un mercato comune europeo per questi prodotti ha reso necessaria l'armonizzazione delle procedure di notifica/etichettatura giungendo all'adozione di una specifica regolamentazione a livello comunitario (Direttiva 46/2002/CE), recepita in Italia con il DL.vo 169/2004 del 21 maggio (8, 9). Gli integratori alimentari sono chiaramente definiti nell'art. 2 del DL.vo 169/2004 (8) come: *prodotti alimentari destinati ad integrare la comune dieta e che costituiscono una fonte concentrata di sostanze nutritive, quali le vitamine e i minerali, o di altre sostanze aventi un effetto nutritivo o fisiologico, in particolare (omissis) aminoacidi, acidi grassi essenziali, fibre ed estratti di origine vegetale, sia monocomposti sia pluricomposti, in forme predosate.*

Il testo normativo in materia di integratori alimentari chiaramente indica che tali prodotti non sono medicinali e pertanto devono essere privi di qualunque finalità terapeutica. Di conseguenza i prodotti contenenti ingredienti erboristici per poter rientrare in questa categoria devono possedere solo finalità salutistiche e nel caso specifico si identificano nella categoria degli integratori in qualità di "sostanze aventi un effetto nutritivo o fisiologico".

Il Ministero della salute, inoltre, essendo attualmente il settore degli integratori alimentari di competenza normativa comunitaria, ha avviato, in conformità alle vigenti regole, una procedura comunitaria per pervenire all'adozione di una lista di vegetali il cui uso deliberato negli integratori alimentari dovrebbe essere escluso. Un primo elenco approvato dalla Commissione Unica per la Dietetica e la Nutrizione (CUDN) è accessibile sul sito web del Ministero della salute [www.ministerosalute.it](http://www.ministerosalute.it). In tale contesto le aziende e altri che siano in possesso di dati che possano portare ad una riconsiderazione di un tale orientamento sono invitati a trasmetterli al Ministero della salute, Direzione generale sanità veterinaria e alimenti. Al fine di garantire la sicurezza d'uso, legata chiaramente alla composizione, alle dosi e alle eventuali associazioni dei

vari principi “funzionalmente attivi”, il Ministero della Salute aggiorna periodicamente anche la lista delle piante “ammesse” per l’uso, alla luce delle ultime evidenze riportate dalla letteratura scientifica.

Diversamente da quanto detto per le specialità medicinali, la procedura di autorizzazione all’immissione in commercio di un integratore a base di principi vegetali, analogamente ad altre tipologie di integratori alimentari, riguarda esclusivamente la notifica di etichetta che consente la verifica da parte dell’autorità competente della composizione del prodotto e dell’ingrediente vegetale dai quali dipende l’efficacia e soprattutto la sicurezza d’uso. La notifica della composizione del prodotto erboristico-integratore alimentare deve avvenire secondo precise indicazioni (Allegato B) che consentano l’individuazione degli elementi critici per la valutazione dei requisiti di sicurezza.

Fattori di rischio specifici legati all’utilizzo di prodotti a base vegetale “non adeguatamente” controllati riguardano errori nell’identificazione della piante/parte utilizzata; l’impiego di specie differenti (ad esempio, piante appartenenti allo stesso genere ma di specie diversa possono avere proprietà differenti); sofisticazione (adulterazione volontaria con specie o parti di specie affini). Alcuni problemi relativi alla sicurezza d’uso dei prodotti di origine vegetale contenuti negli integratori alimentari sono anche da riferirsi ad elementi “estranei” alla “sostanza o preparato vegetale”, tra cui si deve tener presente la potenziale presenza di sostanze tossiche naturalmente contenute in alcune piante o di contaminanti (come per esempio metalli pesanti, micotossine, droghe sintetiche e altre sostanze indesiderabili). Quest’ultimo problema è più frequentemente legato all’uso di alcuni prodotti vegetali importanti dall’Oriente.

L’introduzione dei prodotti erboristici nella categoria degli integratori ha introdotto anche per questi prodotti l’obbligatorietà di adeguamento da parte dei produttori alle normative vigenti in materia di sicurezza. Pertanto, anche per i prodotti di derivazione vegetale che risiedono nella categoria “integratori alimentari” si applica l’intero contesto della produzione “in qualità” secondo il sistema HACCP (*Hazard Analysis Critical Control Point*) il più efficace per tenere sotto controllo il sistema produttivo e quindi i rischi ad esso associati (27, 28).

## Cosmetici

L’interesse dei consumatori per prodotti cosmetici a base vegetale è straordinariamente cresciuto negli ultimi tempi in seguito alla scoperta di nuove molecole “bioattive” d’origine vegetale (comprendenti anche quelle ottenute dalla flora marina), all’acquisizione di evidenze sugli effetti sinergici dei componenti di un fito-complesso e soprattutto a causa della ben radicata idea riguardo l’innocuità per la salute umana dei prodotti “naturali”, non considerando che in alcuni casi anche prodotti di questa natura possono rappresentare un rischio e un pericolo apprezzabile per chi ne è esposto. Episodi come quello dell’epatite spongiforme bovina, che hanno portato a sostituire gli estratti di origine animale con quelli di origine vegetale, hanno inoltre particolarmente contribuito ad incrementare l’interesse per i cosmetici “naturali” offrendo una grande opportunità di mercato. La composizione dei cosmetici è un aspetto di fondamentale importanza, disciplinato con particolare attenzione e oggetto di continuo studio a livello della Comunità Europea. La stessa definizione di prodotto cosmetico, secondo le caratteristiche indicate dagli articoli 1, 2 della Legge 713/86 (10), indica inequivocabilmente i requisiti perché un prodotto possa essere considerato “cosmetico”:

1. *Ai fini della presente legge si intendono per prodotti cosmetici le sostanze e le preparazioni, diverse dai medicinali, destinate ad essere applicate sulle superfici esterne del corpo umano (epidermide, sistema pilifero e capelli, unghie, labbra, organi genitali esterni) oppure sui denti e sulle mucose della bocca allo scopo esclusivo o prevalente, di*

*pulirli, profumarli, modificarne l'aspetto, correggere gli odori corporei, proteggerli o mantenerli in buono stato.*

*2. I prodotti cosmetici non hanno finalità terapeutica e non possono vantare attività terapeutiche.*

Il piano di valutazione e controllo dei prodotti cosmetici “naturali” deve essenzialmente sorvegliare la qualità dei prodotti, che può essere compromessa a causa di diversi fattori (quali ad esempio la presenza di metalli pesanti /pesticidi; la formazione di prodotti tossici per cattiva conservazione/ inadeguate tecniche di preparazione e stoccaggio), e la sicurezza degli stessi (dipendente essenzialmente dagli aspetti biologici intrinseci del prodotto). Già la direttiva 76/768/CEE (11) prevedeva appositi elenchi di sostanze non ammesse o ammesse con limitazioni nella composizione dei prodotti cosmetici. Gli elenchi sono continuamente aggiornati a seguito delle indicazioni dei comitati tecnici che a livello comunitario si occupano del settore. I dati chimico-fisici per l'identificazione inequivocabile della sostanza (anche di origine vegetale) e le prove di stabilità sono fondamentali per la caratterizzazione della composizione dei cosmetici. Sebbene la stessa legge fornisca gli strumenti interpretativi (allegati) per la valutazione “dell'idoneità” di una sostanza in generale e “di origine vegetale” nel nostro caso specifico, indicando quali sostanze non sono consentite (allegato II) e quali sono consentite solo in determinati limiti e condizioni (allegato III), particolare criticità rivelano quelle sostanze di origine vegetale apparentemente “consentite” ma di cui esiste una documentata evidenza scientifica che ne indicherebbe un certo profilo “potenzialmente terapeutico” in funzione di un effetto farmacologico (dimostrato prevalentemente a livello preclinico). Esempi tipici di criticità sono rappresentati da alcune sostanze naturali appartenenti alla classe degli “oli essenziali” e per le quali sono continuamente stilate rassegne e/o linee guida per la loro “sicurezza d'uso” o da molecole farmacologicamente attive (es. caffeina, curcumina, ac. glicirretico ecc.) o estratti come quelli ottenuti da diverse specie di Camomilla (da *Matricaria recutita*, o da *Anthemis nobilis*), di Aloe (*Aloe vera* o *A. barbadensis*), di Tè verde/nero (*Camelia sinensis*).

Nell'Allegato C è riportato un estratto dell'elenco delle sostanze non consentite nei cosmetici a base di principi vegetali (Allegato II alla direttiva base).

Superata la criticità dell'“assenza di potenziale attività terapeutica”, l'ingrediente cosmetico “ideale” deve soddisfare il requisito di “innocuità” e quindi di “sicurezza” nel contesto della tipologia di esposizione prevista (epidermide/capelli/unghie/labbra/denti/mucosa orale/genitali esterni).

La sicurezza, dipendente dalla modalità di produzione e di valutazione degli aspetti tossicologici di ingrediente cosmetico, è assolutamente garantita dagli strumenti legislativi che sanciscono la responsabilità del “*direttore tecnico della corretta esecuzione delle operazioni di produzione e confezionamento conformemente alle Buone Pratiche di Fabbricazione (L.713/86; Art -10 comma 3)*” e introducono che *la valutazione della sicurezza per la salute umana venga effettuata conformemente ai principi di Buone Pratiche di Laboratorio, così come previsti nel Decreto legislativo 2 marzo 2007, n. 50, per le prove sugli ingredienti dei prodotti (L.713/86; Art-10-ter, comma 4)*”.

Gli altri aspetti fondamentali in ambito regolatorio per la valutazione della sicurezza di un prodotto cosmetico, prevedono l'esecuzione di una batteria di saggi tossicologici, (tossicità acuta, irritazione e corrosività, sensibilizzazione cutanea, assorbimento percutaneo, tossicità a dosi ripetute, fototossicità, mutagenicità, tossicocinetica) oltre alla quale l'autorità competente può richiedere altri studi sulla base del profilo tossicologico della sostanza, o per la specifica natura del prodotto. Per quanto riguarda i prodotti cosmetici finiti, secondo gli ultimi emendamenti alla direttiva base, il produttore deve preparare e rendere disponibile su richiesta della Autorità Competente degli Stati membri un file di informazioni tecniche (TIF), contenente

la valutazione di sicurezza del prodotto basata sul profilo tossicologico degli ingredienti, sulla loro struttura chimica e sui livelli di esposizione. È stato comunque raccomandato, in sede comunitaria, dal Comitato Scientifico di Cosmetologia e dei Prodotti Non Alimentari (SCCNFP) di condurre alcuni studi di compatibilità su un numero adeguato di volontari umani prima della commercializzazione del prodotto su larga scala. Il fabbricante, inoltre, è tenuto a prendere in considerazione il profilo tossicologico generale degli ingredienti, la struttura chimica e il livello d'esposizione e le caratteristiche peculiari dell'esposizione delle parti sulle quali il prodotto viene applicato o la popolazione alla quale il prodotto è destinato. In particolare, è tenuto ad effettuare una specifica valutazione dei prodotti cosmetici destinati a bambini di età inferiore a tre anni e di quelli destinati unicamente all'igiene intima esterna. La caratterizzazione del profilo di sicurezza è altrettanto garantita dagli strumenti legislativi che introducono l'obbligo di indicazione in etichetta di sostanze potenzialmente allergeniche se presenti oltre determinate concentrazioni. Attualmente sono state identificate dal Comitato Scientifico di Cosmetologia e dei Prodotti Non Alimentari (SCCNFP) 26 sostanze di cui la maggior parte è di origine vegetale trattandosi di oli essenziali comunemente impiegati per la formulazione di essenze e fragranze (Allegato D). L'elenco è contenuto nella parte I dell'allegato III della Direttiva base e della legge aggiornata con DL.vo 50/2005 (14) insieme alle 66 sostanze il cui impiego era già soggetto a specifiche limitazioni. La criticità fondamentale è che in taluni casi la concentrazione di tali sostanze potenzialmente allergeniche nell'olio essenziale è molto elevata potendo superare il 90%!

La principale novità introdotta dalla direttiva 2003/15/CE (15) e recepita nel nostro ordinamento con il decreto legislativo n. 50/2005 (14) riguarda la graduale soppressione della sperimentazione sugli animali impedendo l'immissione sul mercato, in primo luogo, dei prodotti cosmetici finiti la cui formulazione finale sia stata oggetto di una sperimentazione animale e, in secondo luogo, dei prodotti contenenti ingredienti che siano stati oggetto di sperimentazione animale nel caso sia stato già convalidato e adottato a livello comunitario un metodo di sperimentazione alternativo rispetto a quello adoperato. È prevista, la possibilità di derogare a tali divieti solo in casi eccezionali, qualora sorgano gravi preoccupazioni riguardo alla sicurezza di un ingrediente cosmetico, previo parere della Commissione europea. Come recita la Direttiva 2003/15/CE attualmente soltanto *“i metodi alternativi convalidati sotto il profilo scientifico dal Centro Europeo per la Convalida dei Metodi Alternativi (ECVAM), e dall'organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economici (OCSE) sono adottati sistematicamente a livello comunitario”*. La valutazione della sicurezza in ambito cosmetico assume quindi connotati più dinamici, prendendo le distanze dalla valutazione degli “studi formali” richiesti per la caratterizzazione del profilo di sicurezza di una molecola destinata ad essere un “ingrediente cosmetico e intraprendendo percorsi più critici nella valutazione dei requisiti a cui debbono sottostare le sostanze naturali, spesso oggetto di sperimentazione preclinica “di base investigativa”.

Gli strumenti tecnici a disposizione della competente amministrazione statale, oltre a quelli più strettamente legislativi, sono essenzialmente gli elenchi/monografie di piante “ammissibili”/“non ammissibili”. È inoltre da segnalare che la Commissione Europea ha istituito una banca dati on-line, denominata “CosIng” (Cos da COSmetici ed Ing da INGredienti) <http://ec.europa.eu/enterprise/cosmetics/cosing/>, con lo scopo di semplificare la ricerca d'informazioni sulle sostanze necessarie per la formulazione di nuovi cosmetici o per migliorare quelli già esistenti. La banca dati raccoglie in particolare informazioni inerenti a più di 15.000 ingredienti usati nei prodotti cosmetici secondo quanto richiesto dalla Direttiva dei Cosmetici 76/768/EEC con i relativi aggiornamenti, dall'Inventario degli Ingredienti Cosmetici con le relative modifiche e congiuntamente riporta le opinioni sugli ingredienti cosmetici espresse dal Comitato Scientifico dei Prodotti di Consumo (SCCP).

Grazie a questo strumento, è possibile agevolmente controllare quale sia lo stato normativo di una sostanza a livello dell'Unione Europea e quali siano le opinioni dell'SCCP, che costituiscono la base per la legislazione in questo settore offrendo un supporto armonizzato al livello comunitario sia alle industrie produttrici di cosmetici sia alle autorità competenti per il controllo e la valutazione degli stessi.

## Dispositivi medici

Prodotti di origine vegetale sono, in un contesto recente di applicazione, inclusi anche nella categoria dei dispositivi medici in accordo al DL.vo 46/1997 (17) che recepisce la Direttiva Comunitaria 93/42/CEE (18) in funzione della definizione testualmente riportata nell'Art.1 comma 2:

- 1) *Il presente decreto si applica ai dispositivi medici e ai relativi accessori. Ai fini del presente decreto gli accessori sono considerati dispositivi medici a pieno titolo. Nel presente decreto e nei suoi allegati i dispositivi medici e i loro accessori vengono indicati con termine «dispositivi».*
- 2) *Ai fini del presente decreto s'intende per dispositivo medico: qualsiasi strumento, apparecchio, impianto, sostanza o altro prodotto, utilizzato da solo o in combinazione, compreso il software informatico impiegato per il corretto funzionamento, e destinato dal fabbricante ad essere impiegato nell'uomo a scopo di diagnosi, prevenzione, controllo, terapia o attenuazione di una malattia; (omissis) il quale prodotto non eserciti l'azione principale, nel o sul corpo umano, cui è destinato, con mezzi farmacologici o immunologici né mediante processo metabolico ma la cui funzione possa essere coadiuvata da tali mezzi.*

Il 21 settembre 2007 il Parlamento Europeo ha pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea la Direttiva 2007/47/CE (19) che modificando la precedente introduce fra le numerose modifiche alla normativa vigente quella relativa ai "prodotti *borderline*" con la particolare criticità derivata dalla non ben definita classificazione di quei meccanismi e degli effetti terapeutici ad essi correlati che sono stati sempre ad appannaggio della categoria farmaceutica.

Il contesto problematico su cui si basa l'operato delle autorità competenti per i singoli stati membro della UE si inquadra sostanzialmente nell'identificazione di quei meccanismi "critici" ossia quelli compatibili con la definizione di "dispositivo medico". Un classico esempio è costituito da tutti i meccanismi di tipo chimico-fisico che sono spesso alla base di un effetto biologico e in ultima analisi anche "terapeutico" (azione osmotica, azione antiossidante, azione sulla temperatura, reazioni acido-base ecc). In funzione della normativa a volte è ambigua la caratterizzazione degli effetti meccanici (e quindi non farmacologici, metabolici o immunologici) e quella dei costituenti responsabili (per gli estratti vegetali questo punto è estremamente critico). Il produttore è tenuto a dimostrare in maniera inequivocabile che l'effetto sortito dalla componente vegetale è squisitamente di tipo meccanico e, qualora fossero presenti sostanze all'interno del fitocomplesso impiegato con effetti "non desiderabili" ai fini legislativi dei requisiti previsti per un dispositivo medico, è auspicabile che tali sostanze non siano presenti in concentrazioni tali da indurre l'effetto medesimo.

## Ruolo dell'ISS nella valutazione/controllo dei prodotti a base di specie vegetali

Il rischio dell'insorgenza di possibili eventi avversi o decisamente tossici legati all'esposizione di prodotti di natura vegetale rappresenta un problema concreto, e spesso non adeguatamente considerato per una serie di ragioni. Spesso la non accurata conoscenza delle specie impiegate nelle varie categorie merceologiche descritte, associata alla radicata convinzione dell'innocuità di un prodotto "naturale" determina una pericolosa trappola per il consumatore. Dovrebbe essere facilmente intuibile che quando si presentano degli effetti, essi sono facilmente correlabili con l'attività di specifici composti chimici, e in questo caso sarà sufficiente un sovradosaggio per provocare effetti collaterali, sebbene ci siano specie vegetali con documentata tossicità che andrebbero evitate a prescindere dal sovradosaggio. Tali specie sono spesso descritte e disponibili su mercati paralleli alla comune distribuzione (soprattutto sulla rete web) e di conseguenza rappresentano una fonte di estremo pericolo (es. alcune *Smart Drug* o prodotti "non controllati" provenienti da Paesi terzi, a base di stramonio, ricino, mescalina, amanita, belladonna, yohimbe, efedra).

Come si può evincere per le varie categorie descritte, la tossicità può essere di natura intrinseca, legata cioè ai composti attivi contenuti nel prodotto, ma anche causata dalla possibile "contaminazione/adulterazione" degli stessi. Un altro aspetto ritenuto vincolante nella valutazione da parte degli organi tecnici preposti al controllo riguarda l'individuazione, all'interno del prodotto finito a base "naturale", delle possibili interazioni fra gli "ingredienti" del fitocomplesso e fra il prodotto e i potenziali concomitanti prodotti somministrati (es. integratori/farmaci). L'aspetto dell'"interazione", sebbene molto più stringente in ambito terapeutico nel contesto dell'automedicazione con prodotti a base di sostanze "naturali" incautamente assunti, potrebbe nel tempo assumere dei connotati tossicologici anche in ambito cosmetico, considerando il nuovo trend crescente che riconosce nella co-somministrazione (prodotto cosmetico/integratore alimentare) la "maggior efficacia del prodotto".

In Italia, al fine di caratterizzare il rischio di tali speciali "prodotti", nel contesto della specifica valutazione/controllo, l'Istituto Superiore di Sanità assicura il supporto tecnico-scientifico all'attività svolta:

- dall'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) e dell'Agenzia Europea dei Medicinali (EMA) in riferimento ai prodotti in registrazione come "farmaci" compresi quelli a base di "principi vegetali";
- dal Ministero della Salute, con particolare riferimento a quella preposta alla classificazione commerciale del prodotto a base di sostanze naturali;
- dall'Autorità Giudiziaria (NAS, GGFF) in funzione dei controlli/pareri tecnici richiesti per prodotti sequestrati in quanto non conformi ai requisiti richiesti per l'autorizzazione al commercio (*Smart Drugs*/Prodotti di derivazione da Paesi Terzi non controllati).

Tale tipologia di attività richiede competenze trasversalmente cooperanti fra i vari Dipartimenti e Centri dell'ISS, coinvolgendo a seconda degli aspetti peculiari della problematica il Dipartimento del Farmaco, di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, dell'Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria e il Centro Nazionale di Epidemiologia Sorveglianza e Promozione della Salute.

## Collocazione del “prodotto erboristico”

Quanto finora esposto sta esplicitamente ad indicare che il settore dei prodotti contenenti sostanze di origine vegetale in senso generale o più genericamente definiti “prodotti erboristici” per molto tempo si sia sviluppato senza precisi riferimenti normativi, sia quando sono stati proposti al consumatore prodotti con possibili effetti terapeutici sia quando gli stessi sono stati consigliati per uso alimentare (funzionale) o cosmetico. A livello comunitario non esiste un’agenzia centrale per i prodotti erboristici. Tutte le autorizzazioni sono svolte con modalità differenti in seno ai singoli Stati Membri a seconda della tipologia e classificazione del prodotto a livello nazionale. È urgente di conseguenza la definizione di un quadro normativo armonizzato. Occorrerebbe, in primo luogo una distinzione più marcata tra prodotti definiti “medicinali”, costituiti da piante, loro parti o miscele, o da derivati semplici o complessi delle stesse, capaci di modificare, correggere o ripristinare funzioni organiche dell’uomo e preparati definiti “salutari” che possono soltanto favorire queste stesse funzioni esercitando così un’azione semplicemente benefica, i quali possono essere fabbricati e commercializzati al di fuori della regolamentazione vigente per i medicinali.

In Italia il settore dei prodotti erboristici è disciplinato da norme speciali ma del tutto insufficienti e soprattutto datate a cinquant’anni fa (Legge 6/11/1931, n. 99; 19/11/1931, n. 1793; 26/5/1932, n. 77; 30/10/1940, n. 1724; 9/10/1942, n. 1421). In particolare la Legge del 6 gennaio 1931 n. 99 (29), ha introdotto il sistema di autorizzazioni preventive per la Coltivazione/Raccolta/Preparazione/Commercio delle Piante officinali. Tale legge non distingue le piante ad utilizzo medicinale da quelle non medicinale (salutistico), istituisce il “diploma di erborista” rilasciato dalle scuole di erboristeria presso le scuole di farmacia universitarie, conferendo però all’erborista solo l’autorizzazione a coltivare e raccogliere piante officinali indigene ed esotiche, nonché alla preparazione industriale di esse non comprendendo la facoltà di vendere al minuto, che spettava, peraltro, ai farmacisti.

Successivamente gli aspetti legislativi hanno subito una serie di interpretazioni che hanno permesso anche all’erborista “diplomato” la vendita delle piante, loro miscele e derivati a condizione che non siano identificate come medicinali, in riferimento sia alle caratteristiche intrinseche (qualitative e quantitative) sia a quelle estrinseche (confezione, indicazione, etichette e pubblicità). L’8 gennaio 1981 una Circolare (Circolare Aniasi) del Ministero della Sanità istituiva una lista negativa e una positiva. Quella negativa elenca circa 400 piante medicinali con specifica attività farmacologica e/o riconosciuta tossicità, la cui vendita è limitata alle farmacie, mentre quella positiva elenca circa 900 piante che potrebbero essere utilizzate come prodotti erboristici con vendita teoricamente limitata a farmacie o erboristerie qualificate. I due elenchi sono solo indicativi, per cui le piante non incluse nell’una o nell’altra lista non debbono ritenersi a priori vendibili fuori della farmacia. Con Decreto del Ministero della Sanità del 17 aprile del 1991 viene pubblicato il volume sulle “Droghe vegetali e preparazioni”, quale parte integrante della Farmacopea, che raccoglie 101 Monografie di droghe vegetali riprese anche dalla farmacopea Europea (che ne prevede circa 800). Le Monografie rivestono un ruolo indispensabile per l’allestimento delle preparazioni fitoterapiche in forma di galenico tradizionale di derivazione magistrale (Integrazione nel Codex). Con Decreto del Ministero dell’Università del 6 giugno 1995 è istituito il Diploma Universitario in Tecniche Erboristiche. L’ultimo tentativo di riordino del settore erboristico risale all’approvazione del disegno di legge alla Camera (C. 278) nel marzo 2004 trasmesso al Senato nel febbraio 2006 (S.2852) “*Disciplina del settore erboristico*”. Ai fini del presente disegno di legge i prodotti erboristici sono definiti: *i prodotti a base di piante officinali singole o in miscela o parte di pianta fresca o essiccata e loro derivati e altre sostanze o prodotti naturali aventi finalità salutistiche, diversi da medicinali, integratori alimentari, prodotti cosmetici, prodotti aromatici e coloranti, intesi a*

*favorire lo stato di benessere dell'organismo umano o animale; conseguentemente i prodotti erboristici, alla dose utilizzata, non possono vantare attività terapeutica o nutrizionale (omissis). La vendita al dettaglio dei prodotti erboristici inclusi nella tabella di cui al comma 1 è riservata al farmacista e all'erborista.*

In attesa di un riordino definitivo del settore, l'autorizzazione dei singoli prodotti erboristici ricade nelle legislazioni riguardanti le categorie merceologiche descritte in questa presentazione.

## Bibliografia

1. Italia. Decreto legislativo 24 aprile 2006, n. 219. Attuazione della Direttiva 2001/83/CE e successive direttive di modifica relativa ad un codice comunitario concernente i medicinali per uso umano, nonché della direttiva 2003/94/CE. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 142, 21 giugno 2006.
2. Unione Europea. Regolamento N. 726/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 31 Marzo 2004, che istituisce procedure comunitarie per l'autorizzazione e la sorveglianza dei medicinali per uso umano e veterinario, e che istituisce l'agenzia europea per i medicinali. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L136/1, 30 aprile 2004.
3. Unione Europea. Direttiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 6 novembre 2001, recante un codice comunitario relativo ai medicinali per uso umano. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea*, L. 311/67, 28 novembre 2001.
4. Unione Europea. Direttiva 2004/27/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 31 marzo 2004, che modifica la direttiva 2001/83/CE recante un codice comunitario relativo ai medicinali per uso umano. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea*, L.136/34, 30 aprile 2004.
5. Unione Europea. Direttiva 2004/24/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 31 marzo 2004, che modifica, per quanto riguarda i medicinali vegetali tradizionali, la 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.
6. Italia. Circolare n. 3 del 18 luglio 2002. Applicazione della procedura di notifica di etichetta di cui all'art. 7 del decreto legislativo n. 111/1992, ai prodotti a base di piante e derivati aventi finalità salutistiche. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 188, 12 agosto 2002.
7. Italia. Decreto legislativo 27 gennaio 1992, n. 111. Attuazione della Direttiva 89/398/CEE concernente i prodotti alimentari destinati ad un'alimentazione particolare. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 33, 17 febbraio 1992.
8. Italia. Decreto legislativo 21 maggio 2004, n. 169. Attuazione della Direttiva 2002/46/CE relativa agli integratori alimentari. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 164, 17 luglio 2004.
9. Unione Europea. Direttiva 2002/46/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 10 giugno 2002, per il ravvicinamento delle legislazioni degli stati membri relative agli integratori alimentari. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee* L183/51, 12 luglio 2002.
10. Italia. Legge 11 ottobre 1986, n. 713. Norme per l'attuazione delle direttive della Comunità economica europea sulla produzione e la vendita dei cosmetici. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 253, 30 ottobre 1986.
11. Unione Europea. Direttiva 76/768/CEE del Consiglio del 27 luglio 1976 concernente il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri relative ai prodotti cosmetici. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 262, 27 settembre 1976.
12. Italia. Decreto Legislativo 10 Settembre 1991, n. 300. Attuazione della direttiva n. 88/677/CEE recante quarta modifica alla direttiva n. 76/768/CEE concernente il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri relative ai prodotti cosmetici. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 221, 20 settembre 1991.

13. Italia. Decreto Legislativo 24 aprile 1997, n. 126. Attuazione della direttiva 93/35/CEE recante la sesta modifica alla direttiva 76/768/CEE concernente il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri relative ai prodotti cosmetici e della direttiva 95/17/CE recante modalità di applicazione della direttiva 76/768/CEE riguardo alla non iscrizione di uno o più ingredienti nell'elenco previsto per l'etichettatura dei prodotti cosmetici. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 112, 16 maggio 1997.
14. Italia. Decreto Legislativo 15 Febbraio 2005, n. 50. Attuazione delle direttive 2003/15/CE e 2003/80/CE in materia di prodotti cosmetici. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 87, 15 aprile 2005.
15. Unione Europea. Direttiva 2003/15/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 27 febbraio 2003 che modifica la direttiva 76/768/CEE del Consiglio concernente il ravvicinamento delle legislazioni degli stati membri relative ai prodotti cosmetici. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L66/26, 11 marzo 2003.
16. Unione Europea. Direttiva 2003/83/CE del Consiglio del 24 settembre 2003, che adegua al progresso tecnico gli allegati II, III e VI della direttiva 76/768/CEE del Consiglio concernente il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri relative ai prodotti cosmetici. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 238, 25 settembre 2003.
17. Italia. Decreto legislativo. Attuazione della direttiva 93/42/CEE, concernente i dispositivi medici. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 54, 6 marzo, 1997.
18. Unione Europea. Direttiva 93/42/CEE del Consiglio del 14 giugno 1993 concernente i dispositivi medici. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L169, 12 Luglio 1993.
19. Unione Europea. Direttiva 2007/47/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 5 settembre 2007 che modifica la direttiva 90/385/CEE del Consiglio per il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri relative ai dispositivi medici impiantabili attivi, la direttiva 93/42/CEE del Consiglio concernente i dispositivi medici, e la direttiva 98/8/CE relativa all'immissione sul mercato dei biocidi. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L247/21, 5 settembre 2007.
20. Unione Europea. Direttiva 91/356/CEE della Commissione, del 13 giugno 1991, che stabilisce i principi e le direttrici sulle buone prassi di fabbricazione dei medicinali per uso umano. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L193 , 17 luglio 1991.
21. Unione Europea. Direttiva 2003/94/CE della Commissione dell'8 ottobre 2003 che stabilisce i principi e le linee direttrici delle buone prassi di fabbricazione relative ai medicinali per uso umano e ai medicinali per uso umano in fase di sperimentazione. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L262/22, 14 ottobre 2003.
22. Unione Europea. Direttiva 2004/10/CE del Parlamento europeo e del Consiglio dell'11 febbraio 2004. Ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative relative all'applicazione dei principi di buona pratica di laboratorio e al controllo della loro applicazione per le prove sulle sostanze chimiche. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L50/44, 20 febbraio 2004.
23. Italia. Decreto Legislativo 2 marzo 2007, n. 50 Attuazione delle direttive 2004/9/CE e 2004/10/CE, concernenti l'ispezione e la verifica della buona pratica di laboratorio (BPL) e il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative relative all'applicazione dei principi di buona pratica di laboratorio e al controllo della loro applicazione per le prove sulle sostanze chimiche. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 86, 13 Aprile 2007.
24. Unione Europea. Direttiva 2001/20/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 4 aprile 2001, concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative degli Stati membri relative all'applicazione della buona pratica clinica nell'esecuzione della sperimentazione clinica di medicinali ad uso umano. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L121/34, 1 maggio 2001.
25. Unione Europea. Direttiva 2005/28/CE della Commissione dell'8 aprile 2005, che stabilisce i principi e le linee guida dettagliate per la buona pratica clinica relativa ai medicinali in fase di

- sperimentazione a uso umano nonché i requisiti per l'autorizzazione alla fabbricazione o importazione di tali medicinali. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L91/13, 9 aprile 2005.
26. Italia. Decreto Legislativo 24 giugno 2003, n. 211 Attuazione della direttiva 2001/20/CE relativa all'applicazione della buona pratica clinica nell'esecuzione delle sperimentazioni cliniche di medicinali per uso clinico. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 184, 9 agosto 2003.
  27. Aureli P. Considerazioni generali introduttive sull'uso delle piante negli alimenti, negli integratori e in fitoterapia. *Ann Ist Super Sanità* 2005; 41(1):3-6.
  28. Oelker L. Il controllo di qualità degli integratori a base vegetale. *Ann Ist Super Sanità* 2005; 41(1):43-48.
  29. Italia. Legge 6 gennaio 1931, n. 99. Disciplina della coltivazione, raccolta e commercio delle piante officinali. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 41, 19 febbraio 1931.

## Allegato A

### Lista prioritaria delle sostanze e preparati vegetali in studio da parte del Comitato dei Prodotti Medicinali Vegetali (HMPC) presso l'Agenzia Europea dei Medicinali (EMA)

<i>Absinthii herba</i> (D)	<i>Foeniculi amari fructus aetheroleum</i> (F)	<i>Plantaginis ovatae semen</i> (F)
<i>Achilleae millefolii flos</i> (R)	<i>Foeniculi dulcis fructus</i> (F)	<i>Plantaginis ovatae seminis tegumentum</i> (F)
<i>Agni casti fructus</i> (R)	<i>Foenugraeci semen</i> (R)	<i>Polypodii radix</i> (PF)
<i>Agrimoniae herba</i> (R)	<i>Fragariae folium</i> (R)	<i>Primulae flos</i> (F)
<i>Agropyri repentis rhizoma</i> (R)	<i>Frangulae cortex</i> (F)	<i>Primulae radix</i> (F)
<i>Allii sativi bulbosus</i> (R)	<i>Gentianae radix</i> (R)	<i>Psyllii semen</i> (F)
<i>Aloe</i> (F)	<i>Ginkgo folium</i> (R)	<i>Quercus cortex</i> (R)
<i>Althaeae radix</i> (P)	<i>Ginseng radix</i> (R)	<i>Rhamni purshianae cortex</i> (F)
<i>Anisi aetheroleum</i> (F)	<i>Hamamelis cortex</i> (D)	<i>Rhei radix</i> (F)
<i>Anisi fructus</i> (F)	<i>Hamamelis folium</i> (P)	<i>Ribis nigri folium</i> (R)
<i>Arnicae flos</i> (R)	<i>Hamamelis folium et cortex, distillate</i> (D)	<i>Rosmarini folium</i> (R)
<i>Avenae fructus</i> (F)	<i>Harpagophyti radix</i> (PF)	<i>Rusci aculeati rhizoma</i> (F)
<i>Avenae herba</i> (F)	<i>Hederae helioidis folium</i> (R)	<i>Salicis cortex</i> (PF)
<i>Betulae folium</i> (F)	<i>Hippocastani semen</i> (P)	<i>Salviae folium</i> (D)
<i>Boldi folium</i> (PF)	<i>Hyperici herba</i> (D)	<i>Sambuci flos</i> (F)
<i>Calendulae flos</i> (F)	<i>Juglandis folium</i> (R)	<i>Sennae folium</i> (F)
<i>Capsella bursa-pastoris herba</i> (R)	<i>Juniperi fructus</i> (D)	<i>Sennae fructus</i> (F)
<i>Cardui mariae fructus</i> (R)	<i>Levistici radix</i> (R)	<i>Serenoae repentis fructus</i> (R)
<i>Carvi fructus</i> (R)	<i>Lichen islandicus</i> (R)	<i>Solani dulcamarae stipites</i> (C)
<i>Centaurii herba</i> (P)	<i>Lini semen</i> (F)	<i>Solidaginis virgaureae herba</i> (F)
<i>Centellae asiaticae herba</i> (C)	<i>Lupuli flos</i> (F)	<i>Symphyti radix</i> (R)
<i>Cimicifugae rhizoma</i> (D)	<i>Liquiritiae radix</i> (R)	<i>Tanacetii parthenii herba/folium</i> (R)
<i>Crataegi folium cum flore</i> (R)	<i>Marrubii herba</i> (R)	<i>Taraxaci folium</i> (R)
<i>Crataegi fructus</i> (R)	<i>Mate folium</i> (R)	<i>Taraxaci radix cum herba</i> (D)
<i>Cucurbitae semen</i> (R)	<i>Matricariae aetheroleum</i> (R)	<i>Thymi aetheroleum</i> (R)
<i>Curcumae longae rhizoma</i> (D)	<i>Matricariae flos</i> (R)	<i>Thymi herba</i> (F)
<i>Cynarae folium</i> (R)	<i>Meliloti herba</i> (F)	<i>Thymi herba/Primulae radix</i> (R)
<i>Echinaceae angustifoliae radix</i> (R)	<i>Melissae folium</i> (F)	<i>Tormentillae rhizoma</i> (R)
<i>Echinaceae pallidae radix</i> (P)	<i>Menthae piperitae aetheroleum1</i> (F)	<i>Urticae folium</i> (PF)
<i>Echinaceae purpureae herba</i> (F)	<i>Menthae piperitae aetheroleum2</i> (PF)	<i>Urticae herba</i> (F)
<i>Echinaceae purpureae radix</i> (R)	<i>Menthae piperitae folium</i> (F)	<i>Urticae radix</i> (D)
<i>Eleutherococci radix</i> (F)	<i>Millefolii herba</i> (R)	<i>Uvae ursi folium</i> (R)
<i>Equiseti herba</i> (F)	<i>Myrrha (Commiphora molmol)</i> (C)	<i>Valerianae radix</i> (F)
<i>Eucalypti aetheroleum</i> (R)	<i>Myrtilli fructus siccus</i> (R)	<i>Valerianae radix/Lupuli flos</i> (D)
<i>Eucalypti folium</i> (R)	<i>Oleae folium</i> (R)	<i>Verbasci flos</i> (F)
<i>Filipendulae ulmariae flos</i> (R)	<i>Orthosiphonis folium</i> (R)	<i>Violae tricoloris herba</i> (R)
<i>Filipendulae ulmariae herba</i> (R)	<i>Passiflorae herba</i> (F)	<i>Vitis viniferae folium</i> (R)
<i>Foeniculi amari fructus</i> (F)	<i>Plantaginis lanceolatae folium</i> (R)	<i>Zingiberis rhizoma</i> (R)

(R): *Rapporteur* assegnato, (C): discussione in corso per l'assegnazione, (D): Bozza in discussione, (P): Bozza pubblicata, (PF): Valutazione pre-finale, (F): Opinione finale adottata.  
 Aggiornamento a settembre 2008 Fonte © EMA 2008

## Allegato B

### Tipologia di scheda di ingrediente erboristico da presentare con la procedura di notifica

- Nome botanico
- Origine della pianta
- Provenienza della materia prima impiegata nel prodotto
- Parte della pianta utilizzata
- Tipo di preparazione utilizzata
- Costituenti attivi della pianta e titolo relativo
- Marker biologico
- Finalità fisiologiche e salutistiche
- Dati tossicologici
- Contaminanti
- Controindicazioni, avvertenze, interazioni
- Eventuali note particolari

## Allegato C

### Estratto dall'Allegato II alla Direttiva 76/768/CEE e successive modifiche, delle sostanze non consentite nei cosmetici a base di principi vegetali. Specie vegetali incluse

11. *Aconitum napellus* L. (foglie, radici e preparati)
13. *Adonis vernalis* L. e suoi preparati
15. *Rauwolfia serpentina* estratto radice (solo alcaloidi e loro sali)
44. *Atropa belladonna* L. e suoi preparati
98. *Claviceps purpurea* Tul., suoi alcaloidi e preparati
99. *Conium maculatum* L. (frutti, polvere, preparati)
104. *Colchicum autumnale* L. e suoi preparati
106. *Anamirta cocculus* L. (frutti)
107. *Croton tiglium* L. (olio)
109. Curaro e curarine
211. *Hyoscyamus niger* L., (foglie, semi, polveri e preparati)
215. *Uragoga ipécacuanha* Baill, e specie vicine (radici e loro preparati)
218. *Lobelia inflata* L. e preparati
281. *Physostigma venenosum* Balf.
291. *Prunus laurocerasus* L. (acqua distillata di lauroceraso)
294. *Juniperus sabina* L. (foglie, oli essenziali e preparati)
298. *Solanum nigrum* L. e suoi preparati
301. *Datura stramonium* L. e suoi preparati
303. *Strophantus* (specie) e loro preparati
305. *Strychnos* (specie) e loro preparati
311. *Pilocarpus jaborandi* Holmes e suoi preparati
318. *Thevetia nerifolia* Juss. (glicosidi estratti)
330. *Urginea scilla* Stern e suoi preparati
332. *Schoenocaulon* officinale Lind, suoi semi e suoi preparati
333. *Veratrum* spp. e preparati
345. *Pyrethrum album* L. e suoi preparati
359. *Laurus nobilis* L. (olio dai semi)
365. *Aristolochia* spp. e suoi preparati
374. *Phytolacca* spp. e suoi preparati
423. Olio essenziale di radice di enula (*Inula helenium*)
450. Essenza di verbena (*Lippia citriodora* Kunth.)

## Allegato D

### Sostanze naturali allergeniche indicate dalla direttiva 2003/15/CEE

Sostanze	Presenza in natura (alcuni esempi) (*)
Alcol anisico	Anice, vaniglia
Alcol benzilico	Gelsomino, violetta, ylang-ylang
Alcol cinnamico	Cannella, gelsomino, narciso, vaniglia, violetta
Benzil benzoato	Balsamo del Perù e del Tolù, cannella, giacinto, gelsomino, narciso
Benzil cinammato	Balsamo del Perù e del Tolù
Cinammaldeide	Cannella, cassia
Citral (nerale + geraniale)	Citronella, limone foglie, melissa, verbena
Citronellolo	Bergamotto, citronella, eucalipto, geranio
Cumarina	Cannella, cassia
Eugenolo	Alloro, cannella, garofano chiodi, gelsomino, giacinto, rosa, violetta
Farnesolo	Rosa, ylang-ylang
Geraniolo	Citronella, geranio, limone
Isoeugenolo	Macis, noce moscata, ylang-ylang
Limonene	Arancio, limone, pompelmo, mandarino (scorze)
Linalolo	Alloro, arancio amaro foglie, arancio dolce foglie, bergamotto, coriandolo, gelsomino, geranio, lavanda, mandarino foglie, narciso

(\*) Nelle preparazioni aromatiche ottenute da materie prime di origine naturale (es. oli essenziali, oleoresine, estratti secchi, ecc.).

# ALCUNI ASPETTI DI ETICA NELLA SPERIMENTAZIONE E NELL'UTILIZZO DI TERAPIE NATURALI E ALTERNATIVE

Carlo Petrini

*Unità di Bioetica, Presidenza, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## La posizione del Comitato Nazionale per la Bioetica

Il Comitato Nazionale per la Bioetica (CNB) si è espresso a proposito delle medicine naturali in vari documenti.

Nel documento “Scopi, limiti e rischi della medicina”, approvato il 14 dicembre 2001, il CNB innanzi tutto prende atto della crescente diffusione delle medicine alternative. L’espressione “medicine alternative” è giudicata dal CNB più idonea rispetto a “medicine non convenzionali”. Infatti “definire la Medicina Scientifica come “convenzionale” (...) potrebbe indurre all’erronea idea che essa sia frutto di un accordo tra coloro che la praticano definendone le regole. Pertanto il definire le Medicine Alternative come “non convenzionali” potrebbe ridurre la loro differenza rispetto a quelle scientifiche ad una semplice scelta soggettiva, il che impedirebbe l’invocare il noto principio di falsificabilità di Popper quale elemento di demarcazione tra scienza e pseudo-scienza”. Nel documento il CNB riconosce dunque la rilevanza e il valore delle medicine alternative, anche se si aggiunge: “Allo stato attuale non si può porre in discussione la constatazione che i progressi della medicina sono esclusivamente dovuti alla Medicina Scientifica, mentre le Medicine Alternative rappresentano un’area essenzialmente statica”. Secondo il CNB “è evidente il dovere etico di una presa di posizione la quale implica, se possibile, la soluzione del problema posto da Karl Popper della demarcazione, costituito dalla necessità di individuare una linea netta di divisione tra scienza medica e pseudo-scienza. Si tratta di un problema molto complesso non solo perché richiede strumenti di discriminazione di sicura affidabilità – i quali peraltro esistono – ma anche perché realizzata la distinzione sicura tra le due aree, quella realmente scientifica e quella non scientifica, nel contempo non è automatico il ripudio di metodi di trattamento non scientifici, a condizione che la loro offerta ai pazienti avvenga in un regime di assoluta chiarezza e di onesta informazione”. Secondo il CNB “Nel rapporto medico-paziente (...), malgrado l’incessante elaborazione dei principi di informazione veritiera al malato e della sua autonomia, si insinua nel paziente, con elevata frequenza, la diffidenza circa l’efficacia dei trattamenti “ufficiali” unita al timore della sofferenze e dai rischi prodotti da prestazioni diagnostiche e terapeutiche invasive (comprese quelle farmacologiche) e della morte. La verità è temuta e la rassicurazione viene ricercata come un bene primario. Le suggestioni “magiche” che caratterizzano molta parte delle Medicine Alternative, anche in ragione dell’apoditticità delle prescrizioni, rispondono spesso a queste esigenze psicologiche”. Pertanto, il CNB sottolinea l’esigenza di un’informazione veritiera e di competenza professionale. A proposito dell’informazione, secondo il CNB “È essenziale che l’informazione chiarisca quali sono le basi della cura proposta, anche e soprattutto quando esse sono sconosciute (come in gran parte dei casi)”. A proposito della competenza il CNB osserva che “Le Pratiche di Cura Alternative sono spesso svolte da persone prive della laurea in medicina che esercitano senza alcun controllo, ma anche da molti medici che le attuano con

continuità, non è sempre chiaro se per reale convinzione o perché le ritengono economicamente più proficue” (1).

IL CNB è poi tornato sull'argomento con una mozione, approvata il 23 aprile 2004, riguardante una proposta di legge sulle medicine e pratiche non convenzionali che in quel momento era in discussione alla Commissione Affari Sociali della Camera. Quest'ultimo testo contiene interessanti considerazioni anche sotto il profilo epistemologico. Il Comitato definisce infatti “discutibile” il principio del “pluralismo scientifico”: “Se per pluralismo scientifico si intende la contemporanea presenza di più scienze concernenti un medesimo oggetto – ad esempio la presenza di più chimiche organiche o di più fisiche – il pluralismo non esiste e non è mai esistito” (2).

Con un documento approvato all'unanimità il 18 marzo 2005 il CNB si è occupato ancora dell'argomento, analizzando in particolare il problema del consenso informato. Il Comitato evidenzia come il consenso informato sia una condizione indispensabile per il ricorso alle medicine alternative, e anzi come esso rappresenti l'unica legittimazione, sotto il profilo dell'etica, alle medicine alternative. Il Comitato sconsiglia dunque l'uso per individui che, come i bambini, non sono in grado di esprimere un consenso autonomo e informato (3).

## **La posizione della Federazione Nazionale degli Ordini dei Medici Chirurghi e Odontoiatri (FNOMCeO)**

Il Comitato Nazionale per la Bioetica, di cui si è già detto, non è l'unica voce istituzionale ad essersi pronunciata in Italia sulle medicine non convenzionali. Particolarmente significativa, tra le altre, è la posizione della Federazione Nazionale dei Medici Chirurghi e Odontoiatri (FNOMCeO).

L'articolo 15 della versione del “Codice di deontologia medica” approvata il 16 dicembre 2006 (4) è particolarmente esplicito. Vi si legge infatti: “Il ricorso a pratiche non convenzionali non può prescindere dal rispetto del decoro e della dignità della professione e si esprime nell'esclusivo ambito della diretta e non delegabile responsabilità professionale del medico. Il ricorso a pratiche non convenzionali non deve comunque sottrarre il cittadino a trattamenti specifici e scientificamente consolidati e richiede sempre circostanziata informazione e acquisizione del consenso. È vietato al medico di collaborare a qualsiasi titolo o di favorire l'esercizio di terzi non medici nel settore delle cosiddette pratiche non convenzionali”.

La FNOMCeO si era già ufficialmente pronunciata sull'argomento in altre circostanze, e in particolare il 18 maggio 2002 con il documento “Delibera e linee guida FNOMCeO su medicine e pratiche non convenzionali”. Nel documento si esprime un'apertura verso nove tipi di medicine non convenzionali. Vi si legge infatti: “Le medicine e pratiche non convenzionali ritenute in Italia come rilevanti da un punto di vista sociale sia sulla base delle indicazioni della risoluzione n. 75 del Parlamento Europeo del 29 maggio 1997 e della Risoluzione n. 1206 del Consiglio d'Europa del 4 novembre 1999, che sulla base della maggiore frequenza di ricorso ad alcune di esse da parte dei cittadini, oltre che degli indirizzi medici non convenzionali affermatasi in Europa negli ultimi decenni sono: agopuntura, fitoterapia, medicina ayurvedica, medicina antroposofica, medicina omeopatica, medicina tradizionale cinese, omotossicologia, osteopatia, chiropratica” (5). La FNOMCeO auspicava inoltre un “urgente e indifferibile intervento legislativo da parte del Parlamento e l'istituzione di un'Agenzia nazionale per le medicine non convenzionali”. La posizione espressa dalla FNOMCeO suscitò dissensi aspri. Venne infatti poco dopo divulgato un documento firmato inizialmente da 35 scienziati (tra cui i premi Nobel Renato Dulbecco e Rita Levi Montalcini), e che poi raccolse molte adesioni, nel

quale si legge: “L’apertura della Federazione (verso le medicine non convenzionali, ndr) non può che suscitare amarezza in chi crede nella medicina scientifica, basata su prove di efficacia (...). Le pratiche di medicina non convenzionale hanno un approccio ideologico alle malattie, si basano su presupposti arbitrari, non tengono in considerazione i meccanismi biologici e le conoscenze scientifiche più moderne, non offrono una spiegazione razionale alla presunta efficacia delle cure e fanno riferimento a meccanismi del tutto indimostrabili”. Una posizione analoga è stata espressa nei confronti della FNOMCeO più recentemente, il 13 giugno 2007, dalla Società Italiana di Medicina Interna con una lettera indirizzata al Ministro della Salute, all’Agenzia Italiana del Farmaco e alle altre istituzioni competenti in materia.

Un’interpretazione forse meno rigida del documento della FNOMCeO permette di individuare in esso un passaggio dalla chiusura categorica alla volontà di fare maggiore chiarezza sull’argomento. Purtroppo la materia continua ad essere al centro di polemiche anche per interessi economici. La stessa FNOMCeO fu accusata di essere intervenuta sull’argomento con il documento del 2002 per interessi economici degli iscritti (6).

## La posizione della Commissione Europea

Un richiamo a prestare attenzione agli aspetti di etica per quanto riguarda le medicine non convenzionali era stato espresso già nel 1998 dalla Commissione Europea in un rapporto sull’argomento, dove si legge: “Il fatto di etichettare una medicina come naturale non offre scuse ai professionisti per eludere gli standard di comportamento e di pratica etica che ci si aspetta da chiunque si prenda cura del benessere delle persone”. Nello stesso documento si afferma: “È necessario bilanciare le libertà di scelta degli individui con il dovere di proteggerli da eventuali danni. Alla luce di queste considerazioni (...) si raccomanda che:

- gli specialisti in medicine non convenzionali siano soggetti ai medesimi o a simili codici di condotta, disciplina e responsabilità degli altri professionisti sanitari;
- le nuove terapie o trattamenti sanitari siano soggetti al normale processo di verifica attraverso ricerche approvate da comitati etici prima di essere rese disponibili nella pratica;
- la ricerca basata sulle evidenze sia utilizzata per informare gli specialisti sull’uso appropriato delle medicine non convenzionali” (7).

## La posizione dell’Organizzazione Mondiale della Sanità

A proposito di istituzioni, è opportuno ricordare anche che il 22 giugno 2004 l’Organizzazione Mondiale della Sanità ha reso pubbliche le *Guidelines on developing information on proper use of traditional, complementary and alternative medicine* (8). Nelle linee guida si offrono, tra l’altro, indicazioni operative:

- *Politiche che i governi potrebbero attuare:*
  - Assicurarsi che ai consumatori siano date sufficienti informazioni sull’efficacia e la sicurezza dei prodotti e sulle loro controindicazioni.
  - Istituire canali appropriati per permettere ai consumatori di segnalare le reazioni avverse ai farmaci e far conoscere i canali stessi.
  - Organizzare campagne di comunicazione per dare ai consumatori le capacità per valutare la qualità dei servizi ricevuti.

- Assicurarsi che i medici siano adeguatamente qualificati e regolarmente iscritti alla loro categoria professionale.
- Incoraggiare l'interazione tra medici tradizionali e non convenzionali.
- Prevedere un'assicurazione per le terapie non convenzionali (...).
- *Strutture sanitarie e processi che contribuirebbero a promuovere maggiori qualità e sicurezza:*
  - Sviluppo di standard di qualità e linee guida per i trattamenti, per garantire uniformità in un particolare sistema sanitario.
  - Standardizzazione della formazione e dei requisiti di conoscenze affinché i medici promuovano la credibilità delle pratiche tradizionali e alternative aumentando la fiducia dei consumatori.
  - Collaborazione tra professionisti sanitari tradizionali e complementari per migliorare gli esiti dei trattamenti e promuovere una riforma dello stesso settore sanitario.
  - (...) Meccanismi di auto controllo.
- *Domande che i consumatori potrebbero rivolgere:*
  - La terapia è adatta alla propria malattia o condizione?
  - La terapia ha la capacità di prevenire, alleviare e/o curare i sintomi o di contribuire in altri modi a migliorare la salute e il benessere di chi ne fa uso?
  - La terapia o medicina naturale è prescritta da un medico esperto in medicina tradizionale o medicina complementare e alternativa oppure da un medico con una formazione adeguata, con buone capacità e conoscenze?
  - Le medicine e i prodotti naturali sono di qualità certificata? Quali sono le controindicazioni e precauzioni di questi materiali e prodotti?
  - Le terapie o le medicine naturali sono disponibili ad un prezzo competitivo?

Il direttore generale dell'OMS, Lee Jong-Wook, presentando le linee guida, affermava che "L'Organizzazione Mondiale della Sanità favorisce le medicine tradizionali e alternative quando queste dimostrano benefici per il paziente e rischi minimi" e aggiungeva che "Poiché è sempre più grande il numero di soggetti che ricorre a tali pratiche, i governi hanno il dovere di assicurare che tutti i soggetti coinvolti abbiano le migliori informazioni sui rischi e sui benefici" (9). Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità "un'informazione accessibile, facilmente comprensibile è la chiave per guidare i consumatori nelle loro scelte" (9).

L'Organizzazione Mondiale per la Sanità ha poi prodotto linee guida anche su specifici aspetti delle medicine non convenzionali, come, per citare due esempi tra gli altri, le *Guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems* (10) e le *Guidelines on basic training and safety in chiropractic* (11).

## Una proposta operativa

Sulla base delle valutazioni espresse nei documenti istituzionali si può cercare di elencare, senza pretesa di completezza, alcuni requisiti necessari per garantire il rispetto dei principi di etica nella sperimentazione, e anche nell'impiego, di farmaci naturali e alternativi.

- *Requisiti generali:*
  - Benessere dell'individuo come obiettivo prioritario.
  - Proporzionalità tra rischi e benefici.
  - Onestà nelle informazioni che vengono fornite.
  - Efficacia della comunicazione.
  - Consenso informato.
  - Partecipazione volontaria.

- *Requisiti che devono essere assicurati per la partecipazione a sperimentazioni cliniche:*
  - Tutela dei soggetti e in particolare delle categorie vulnerabili.
  - Valutazione indipendente dei protocolli sperimentali e approvazione da parte del comitato etico.
  - Competenza del personale.
  - Confidenzialità e tutela dei dati personali.
  - Accuratezza nella registrazione e nell'analisi dei dati.
  - Trasferimento delle informazioni ad altri medici che eventualmente abbiano in cura il soggetto.
- *Informazioni da fornire ai partecipanti a sperimentazioni cliniche:*
  - Finalità della ricerca.
  - Caratteristiche fondamentali della ricerca (randomizzazione, eventuale uso del placebo, ecc.).
  - Natura, frequenza, durata di ogni trattamento o procedura o tecnica.
  - Rischi e potenziali benefici:
    - 1) A breve termine.
    - 2) A lungo termine.
  - Modalità di registrazione di eventuali eventi avversi.
  - Eventuali indennizzi per danni subiti
  - Modalità di trattamento dei dati:
    - 1) Raccolta.
    - 2) Utilizzo.
    - 3) Diffusione.
  - Modalità per un eventuale ritiro dalla sperimentazione.
  - Informazioni e risultati che ci si può attendere al termine della sperimentazione.

## Bibliografia

1. Italia. Presidenza del Consiglio dei Ministri. Comitato Nazionale per la Bioetica. *Scopi, limiti e rischi della medicina*. 14 dicembre 2001. Disponibile all'indirizzo: <http://www.governo.it/bioetica/testi/141201.html>; ultima consultazione 20/1/2009.
2. Italia. Presidenza del Consiglio dei Ministri. Comitato Nazionale per la Bioetica. *Mozione del Comitato Nazionale per la Bioetica su medicine e pratiche non convenzionali*. 23 aprile 2004. Disponibile all'indirizzo: [http://www.governo.it/bioetica/testi/medicine\\_non\\_convenzionali.pdf](http://www.governo.it/bioetica/testi/medicine_non_convenzionali.pdf); ultima consultazione 20/1/2009.
3. Italia. Presidenza del Consiglio dei Ministri. Comitato Nazionale per la Bioetica. *Le medicine alternative e il problema del consenso informato*. 18 marzo 2005. Disponibile all'indirizzo: <http://www.governo.it/bioetica/testi/Medicine%20Alternative.pdf>; ultima consultazione 20/1/2009.
4. Federazione Nazionale degli Ordini dei Medici Chirurghi ed Odontoiatri. *Codice di Deontologia Medica*. 16 dicembre 2006. Disponibile all'indirizzo: [http://portale.fnomceo.it/Jcmsfnomceo/cmsfile/attach\\_3819.pdf](http://portale.fnomceo.it/Jcmsfnomceo/cmsfile/attach_3819.pdf); ultima consultazione 20/1/2009.
5. Federazione Nazionale dei Medici Chirurghi ed Odontoiatri. *Delibera e "linee guida" FNOMCeO su medicine e pratiche non convenzionali*. 18 maggio 2002. Disponibile all'indirizzo: <http://www.siommi.it/documenti/news2002/fnomceo.pdf>; ultima consultazione 20/1/2009.
6. Remuzzi G. Quelle cure (troppo) alternative. *Corriere della Sera*. 14 giugno 2002. Disponibile all'indirizzo: [http://archiviostorico.corriere.it/2002/giugno/14/Quelle\\_cure\\_troppo\\_alternative\\_co\\_0\\_02061410327.shtml](http://archiviostorico.corriere.it/2002/giugno/14/Quelle_cure_troppo_alternative_co_0_02061410327.shtml); ultima consultazione 23/1/2009.

7. European Commission. *EUR 18420. COST Action B4. Unconventional Medicine. Final Report of the Management Committee. 1993–1998*. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities; 1998.
8. World Health Organization. *Guidelines on developing consumer information on proper use of traditional, complementary and alternative medicine*. Geneva: WHO; 2004. Disponibile all'indirizzo: <http://www.who.int/medicines/publications/traditional/guidelines2004/en/>; ultima consultazione 20/1/2009.
9. World Health Organization. *Press release: New WHO guidelines to promote proper use of alternative medicines*. WHO; 2004. Disponibile all'indirizzo: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/en/>; ultima consultazione 20/1/2009.
10. World Health Organization. *Guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems*. Geneva: WHO; 2004. Disponibile all'indirizzo: <http://www.who.int/medicinedocs/index/assoc/s7148e/s7148e.pdf>; ultima consultazione 20/1/2009.
11. World Health Organization. *Guidelines on basic training and safety in chiropractic*. Geneva: WHO; 2005. Disponibile all'indirizzo: <http://www.chiroeco.com/50/bonus/WHOGuidelines.pdf>; ultima consultazione 20/1/2009.

# USO CLINICO DELLE SOSTANZE NATURALI: ALCUNE CONSIDERAZIONI

Andrea Geraci  
Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

## Introduzione

L'Istituto Superiore di Sanità (ISS) svolge diverse funzioni: ricerca scientifica, controllo in ambito della sanità pubblica, divulgazione, comunicazione, consulenza. L'evento odierno, dedicato all'approfondimento di argomenti riguardanti l'uso di sostanze naturali, si inserisce a pieno titolo tra queste attività. Il gruppo TISNa, Terapie Innovative e Sostanze Naturali, formatosi di recente e in maniera assolutamente spontanea, assume una valenza trasversale rispetto alla struttura dell'ISS. Di fatto, le oltre ottanta unità del nostro gruppo rappresentano quasi tutti i dipartimenti e centri. Ciò che ci accomuna è l'interesse a studiare, a vario titolo, le sostanze di origine naturale, cioè quelle provenienti dai regni vegetale, animale e minerale. È evidente a tutti che stiamo vivendo un periodo nel quale, sia tra le persone di scienza come per la gente comune, è presente un crescente interesse per ciò che è "naturale". Spesso però, attraverso internet o col semplice passaparola, circolano informazioni anche errate e quindi pericolose. È un'idea abbastanza consolidata per numerose persone, pensare che ciò che è naturale sia anche innocuo: errore grossolano!

Teoricamente anche l'acqua, lo zucchero, il rosmarino, il succo di pompelmo, come il veleno di serpente e il carbonato di calcio, possono essere sia tossici che terapeutici: dipende dalla dose, dal periodo di somministrazione, dal caso clinico, ecc. Sono necessarie allora tutta una serie di conoscenze che riguardano le caratteristiche di una certa sostanza naturale e la relativa interazione con l'uomo. C'è quindi tanto da studiare e approfondire. La ricerca nel campo delle sostanze naturali si dovrebbe sviluppare realmente in maniera traslazionale, nel senso che bisognerebbe arrivare ad una diretta utilizzazione in campo terapeutico o alimentare. L'aspetto applicativo ci ricorda che vi è un crescente interesse dell'industria in campo medico e farmaceutico, come nella nutraceutica, nella cosmetica e in campo alimentare. Pensiamo al bombardamento che subiamo attraverso i media riguardo gli integratori, i pro-biotici, ecc. e a quanto poco la popolazione conosce realmente dei benefici, i limiti e anche i rischi di ciò che viene sbandierato come naturale e quindi buono ed efficace.

In campo scientifico molto si sa, ma tanto si deve ancora conoscere. Solo per fare un esempio, si sa che delle circa 400.000 specie di vegetali superiori, solo il 10% è stato studiato chimicamente in qualche dettaglio e dei 100.000 metaboliti secondari di origine vegetale si conoscono le strutture solo di un 50%.

## Studiare la singola molecola o il complesso naturale?

In generale potremmo ipotizzare due tipi di approccio per lo studio delle attività bio-farmacologiche delle sostanze naturali:

- *Caratterizzazione del singolo principio attivo isolato dalla sostanza naturale di provenienza.*
- *Studio di una determinata sostanza naturale nel suo complesso.*

Nel primo caso dovremmo giungere all'isolamento e alla caratterizzazione della singola molecola, il principio attivo, per poi, attraverso un'eventuale modificazione chimica, pervenire

alla produzione di un nuovo farmaco. Esistono numerosi esempi di farmaci di origine naturale che, dopo qualche modificazione, vengono impiegati nella pratica clinica: quasi tutti gli antibiotici e, per fare qualche esempio, molecole provenienti da *Salix alba*, *Atropa belladonna*, *Papaver somniferum*, *Digitalis purpurea*, *Vinca major*, *Taxus brevifolia*.

L'altro metodo è quello di studiare l'attività, le proprietà non della singola molecola ma, a seconda del campo, del fitocomplesso, del latte in toto, del veleno animale, della polvere dell'ostrica. In generale sono due approcci completamente diversi ma potenzialmente integrabili. L'uno non è meglio dell'altro, sono solo diversi e il fine comune è quello di identificare una sostanza medicamentosa che possa presentare attività curativa e sicura per quanto concerne gli eventi avversi, cioè venga rispettato il principio di efficacia e sicurezza.

Notoriamente la singola molecola con grado di purezza elevata è utile nelle urgenze, nelle situazioni cliniche gravi in cui vi è la necessità di interventi farmacologici molto attivi e ad azione rapida: è il caso dell'adrenalina, dei cardiotonici, degli antiaritmici, degli antistaminici, degli antibiotici e così via. Come si diceva precedentemente, molti di questi sono spesso derivati semisintetici da sostanze naturali.

Nel caso del mondo vegetale, che rappresenta il più importante serbatoio di sostanze ad attività medicamentosa, è importante sottolineare il concetto di fitocomplesso. Esso si può definire come un insieme di singole molecole (alcaloidi, terpeni, flavonoidi ecc.) con una loro attività specifica, presenti nella pianta e associate ad altri costituenti che non presentano una evidente attività farmacologica avendo probabilmente un'azione di supporto. Sembra che proprio la presenza dell'insieme armonico e sinergico di tutte le sostanze permetta l'attività terapeutica della droga vegetale *in toto*.

I principali procedimenti per ottenere il fitocomplesso sono l'essiccazione, l'estrazione in alcol o glicerina, o per mezzo della distillazione come nel caso degli oli essenziali. Si otterranno di volta in volta tisane, polveri, estratti fluidi e secchi, tinture madri, macerati glicerici, succhi. Il punto cruciale, e forse una grossa limitazione della preparazione di una droga vegetale, è la variabilità dei componenti. Questo dipende da numerosi fattori: tipo e luogo di coltivazione, tipo di estrazione ecc., così che di volta in volta diviene opportuna e necessaria la titolazione di uno o più principi attivi, al fine di poter avere una standardizzazione e una riproducibilità d'uso della sostanza. Di fatto sono poche le case produttrici che si possono permettere una titolazione per ogni estratto vegetale, mentre invece sul mercato sono presenti numerosi prodotti che non danno tutte le garanzie di qualità, specialmente quelli provenienti da paesi esteri con una regolamentazione carente riguardo i controlli di qualità.

## Sostanze naturali e salute umana

Mentre in molte patologie serie è necessario il farmaco attivo in modo estremamente rapido, il campo della fitoterapia, che è forse tra le discipline "complementari" più diffuse, riguarda, a mio modo di vedere, quelle situazioni cliniche di squilibrio che necessitano di un approccio meno drastico rispetto alle urgenze. In questo caso il medicamento di origine naturale è forse più adatto alla natura umana, riequilibrando "dolcemente". Esempi possono essere l'affaticamento psicofisico, alcuni squilibri endocrini, l'insufficienza epatica, la stipsi, l'ipercolesterolemia, l'insufficienza venosa, solo per fare alcuni esempi.

Come dicevo prima è bene ribadire che naturale non è sinonimo di innocuo e il famoso caso dell'iperico ne è un dimostrazione. Preparati a base di principi attivi di *Hypericum perforatum*, utilizzati nella depressione leggera, hanno interferito sul metabolismo della ciclosporina che viene somministrata per prevenire il rigetto dei trapianti, provocando così il decesso di certo numero di pazienti che avevano subito un trapianto cardiaco (1).

## Complessità, essere umano, sostanza naturale

Come è stato accennato prima, una molecola, un principio attivo o un insieme di molecole agiscono sull'uomo con un meccanismo d'azione ben determinato da un punto di vista biochimico. Ma una cosa è riparare un tessuto danneggiato, un'altra è curare una persona malata. La cura, la terapia di una persona malata ha altre e più ampie implicazioni.

La persona è sinonimo di complessità, nel senso che non siamo fatti solo di cellule entro le quali avvengono delle reazioni chimiche, ma siamo sensibili a tutto ciò che ci circonda, alle influenze sociali, ambientali, energetiche, perfino cosmiche. Quelli che erano i concetti meccanicistici di Newton stanno evolvendo verso una più ampia visione di tipo einsteiniana, secondo la quale la materia e l'energia sono aspetti diversi di una medesima cosa. A corollario di ciò, si può affermare che anche i sistemi viventi sono influenzati dall'energia. Vengono così a delinarsi nuove frontiere della scienza. Anatomia, fisiologia, anatomia patologica, biochimica, farmacogenomica dovrebbero essere integrate da nuovi approcci scientifici, nuove discipline, quali lo studio dei sistemi complessi, la bioenergetica, la psiconeuroendocrinoimmunologia, l'endocrinologia comportamentale, la medicina vibrazionale (2).

Il concetto di complessità si lega strettamente all'energia vitale, cioè quella ipotizzata componente comune a tutti gli esseri viventi e che antiche tradizioni chiamavano in vari modi. È il *prana* per gli indù, il *chi* per i cinesi, *ka* per gli egizi, *ruah* per gli ebrei, *rooh* per i musulmani, *wakan* per i sioux, *mana* per i polinesiani. Ne parlavano personaggi come Aristotele, Eraclito, Talete, Anassimandro, Empedocle, Pitagora, Ippocrate, Paracelso, Hanhemann. Può essere definita, in semplici parole, ciò che permette la vita, un *quid* di energia che “avvolge” e permea l'essere vivente.

Le sostanze naturali, e quelle di origine vegetale in particolare, avrebbero una stretta relazione con l'energia vitale, di cui molte persone di scienza “non convenzionali”, studiano da sempre le proprietà: sono quelli che si occupano di medicina tradizionale cinese, di medicina ayurvedica o di quella omeopatica o antroposofica, di bioenergetica.

La ricerca ortodossa in questo campo ha un atteggiamento di grande diffidenza, ha qualche remora ad aprirsi allo studio di nuovi *paradigmi*. Sicuramente vi è una grande potenzialità se le diverse conoscenze potessero confluire in maniera sinergica nell'approfondire quegli aspetti ancora ignoti degli esseri viventi ma che “si intuisce” siano presenti.

Parlando di complessità e tornando per un attimo al fitocomplesso di origine vegetale, potremmo ipotizzare che il suo utilizzo in campo umano sia particolarmente appropriato per ristabilire l'equilibrio non di una sola reazione chimica, ma di un infinito *network* che sta alla base della capacità di autoregolazione e auto guarigione di ciascun essere umano. L'azione sulla complessità della persona, avverrebbe in maniera più “dolce” rispetto a quella del principio attivo unico.

Il fitocomplesso è sicuramente più difficile da studiare, ma credo esistano dei mezzi come la risonanza magnetica nucleare (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR), la cromatografia liquida ad alta pressione (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) o altri metodi, che possano mettere in evidenza le caratteristiche, l'impronta digitale nel senso dell'unicità della sostanza in questione e la sua attività sugli esseri viventi. Un'altra considerazione su cui riflettere riguarda il rapporto tra fitocomplesso e il sistema complesso umano: se la pianta trasforma luce in materia, attraverso la fotosintesi, allora può la sostanza di origine vegetale albergare al suo interno “luce/energia congelata” che può essere utilizzata da un sistema complesso sensibile alle “energie”?

## Proposte conclusive

Per ciò che riguarda l'attività di controllo e ricerca nel campo delle sostanze naturali all'interno dell'ISS, possiamo dire che la ricerca pre-clinica è già attiva in vari dipartimenti, così come quella clinica di fase IV, cioè la fitovigilanza presente al centro nazionale di epidemiologia (CNESPS). La parte prettamente clinica (fase I-II-III) non è ancora attiva, ma il reparto di Ricerca Clinica e Terapia Sperimentale del Dipartimento del Farmaco, di cui faccio parte, sarebbe lieto di instaurare delle collaborazioni con centri clinici interessati all'uso di sostanze naturali, per verificare attraverso studi controllati, l'efficacia e la sicurezza di questo gruppo di sostanze.

Quello che si potrebbe sviluppare dal lavoro di questo nuovo gruppo all'interno dell'ISS, potrebbe essere riassunto schematicamente nei seguenti due punti:

1. Studio di *principi attivi di origine naturale* / Studio del *complesso naturale*, che comportino collaborazioni intra ed extramurali al fine della pianificazione di studi clinici.
2. Studio del *complesso naturale* da un punto di vista bioenergetico attraverso la collaborazione intra ed extramurale con biofisici, biologi, biochimici, farmacologi ecc.

## Bibliografia

1. Ruschitzka F, Meier PJ, Turina M, Lüscher TF, Noll G. Acute heart transplant rejection due to Saint John's wort. *Lancet*. 2000;355(9203):548-9.
2. Gerber R. *Medicina vibrazionale*. Zogno (BG): Lampis; 1998.

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN  
deve essere preventivamente autorizzata.  
Le richieste possono essere inviate a: [pubblicazioni@iss.it](mailto:pubblicazioni@iss.it).*

*Stampato da Tipografia Facciotti srl  
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

*Roma, ottobre-dicembre 2008 (n. 4) 20° Suppl.*