

CENTRO DI FITOTERAPIA AOU CAREGGI

La ricerca preclinica sulle piante medicinali

Da 5 anni il CERFIT ha avviato un'attività di ricerca preclinica costituendo il laboratorio Phyto-genomic Lab per l'applicazione di tecnologie genomiche alla produzione di sostanze bioattive vegetali: un primo bilancio delle ricerche svolte ad oggi, con lo sguardo al futuro

Lattività di ricerca, condotta da Valentina Maggini, ricercatore del CERFIT all'interno del Dipartimento di Biologia dell'Università di Firenze, in collaborazione con Patrizia Bogani dello stesso Dipartimento, si è concentrata su tre filoni principali.

Ricerche sugli endofiti

Sapendo che le concentrazioni delle sostanze vegetali, variabili da specie a specie, risentono di fattori quali stagionalità, tecniche di coltivazione, trattamento del tessuto vegetale e metodi di estrazione, è stato avviato il primo progetto di valutazione dell'interazione tra batteri endofiti (presenti cioè all'interno dei tessuti vegetali senza arrecare danno), ed *Echinacea*, per capire quanto e come tale rapporto possa influire su colonizzazione batterica, crescita della pianta e produzione di composti vegetali agendo sulle vie metaboliche vegetali.

Questa ricerca ha dimostrato, per la prima volta, come il microbiota di una pianta medicinale agisce sulle vie metaboliche della pianta stessa, influenzando la produzione di importanti metaboliti secondari. Abbiamo, infatti, simulato le condizioni di crescita in vivo inoculando le piante di *E. purpurea* in vitro con un pool di ceppi batterici isolati da steli e foglie di *E. purpurea* cresciuta in terra presso il Giardino delle Erbe di Casola Valsenio.

La caratterizzazione chimica dei tessuti vegetali delle piante di controllo (non infette) e di quelle infettate ha mostrato che la quantità di alcalammidi nelle piante infettate è maggiore rispetto a quelle di controllo, suggerendo che l'infezione batterica abbia un ruolo modulatore della biosintesi delle alcalammidi. Il dato è stato supportato anche dall'analisi molecolare che ha indagato il gene codificante per un enzima in grado di decarbossilare gli amminoacidi a catena ramificata, fonte di ammine necessarie alla formazione di

Echinacea purpurea cresciuta in vitro



CERFIT

Padiglione 28a, Ponte Nuovo "Mario Fiori"
AOU Careggi, Via delle Oblate, 4
50141 Firenze
tel. 055 794 9220/9635/6824
Prenotazioni visite: CUP Metropolitan
055 545454

alcammidi. Il profilo di espressione, in linea con i dati biochimici, ha mostrato un livello più elevato nei tessuti di *E. purpurea* infettati rispetto a quelli di controllo. Questi risultati suggeriscono che l'interazione pianta-endofita può modulare il metabolismo secondario delle piante e, di conseguenza, influire sulle proprietà terapeutiche di *E. purpurea*.

Abbiamo poi studiato la capacità di estratti da piante di *E. purpurea*, cresciute *in vitro* e inoculate con i propri endofiti, di inibire l'enzima lattato deidrogenasi (LDH5), molecola chiave del metabolismo energetico delle cellule tumorali: gli estratti ricchi di acidi fenolici sono in grado di inibire LDH5; in particolare l'estratto più ricco in acido cicorico, ottenuto da stelo e foglie inoculati di *E. purpurea*, ha mostrato una maggiore inibizione enzimatica.

Un altro filone di ricerca ha portato alla caratterizzazione degli endofiti batterici di alcune piante aromatiche, iniziando da *Lavandula angustifolia* Mill. Molti isolati hanno mostrato un forte potenziale di inibizione nei confronti dei patogeni umani, così come l'olio essenziale (OE) della stessa pianta, indicando la possibile presenza di un serbatoio di composti bioattivi rilevanti nel campo del controllo dei patogeni e della salute umana.

Successivamente abbiamo valutato se il microbiota di 2 specie aromatiche di Timo, *Thymus vulgaris* e *Thymus citriodorus*, differisse in relazione alla composizione del rispettivo OE. In totale 576 isolati batterici ottenuti da 3 distretti (foglie, radici

Valentina Maggini e Fabio Firenzuoli

e suolo rizosferico) sono stati caratterizzati tassonomicamente e controllati per la tolleranza all'OE delle 2 specie di timo. È stato trovato un modello tassonomico relativo al comparto vegetale da cui i batteri sono stati isolati ed è stata rilevata un'elevata diversità tassonomica tra gli isolati dalle foglie. I dati hanno rivelato poi un modello differenziale di resistenza degli isolati agli OE di *T. vulgaris* e *T. citriodorus*, interpretato in termini di diversa composizione chimica degli OE delle rispettive piante ospiti. La colonizzazione batterica delle foglie in *Thymus* spp. è risultata influenzata dall'OE presente nel tessuto ghiandolare fogliare come una delle forze selettive che modellano la composizione della comunità endofitica.

Attività antibiotica di oli essenziali

Abbiamo analizzato l'attività antibatterica dell'OE di *Origanum vulgare* testandolo su patogeni umani e in particolare su 3 patogeni opportunisti - *Staphylococcus aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Achromobacter xylosoxidans* - isolati da polmoni di pazienti con fibrosi cistica. L'OE si è rivelato efficace contro tutti i ceppi batterici testati indicando un suo ruolo potenziale come antimicrobico nel trattamento delle infezioni dei pazienti con fibrosi cistica.

È stata inoltre indagata l'ampia variabilità della composizione di OE estratti da diverse specie della stessa pianta confrontando in particolare la composizione e l'attività contro *Pseudomonas aeruginosa* (altro

patogeno opportunisto multiresistente agli antibiotici) di 3 oli essenziali estratti da *Origanum compactum*, *Origanum vulgare* e *Origanum vulgare* var. *hirtum*. Nonostante i 3 OE abbiano una composizione chimica abbastanza diversa, hanno mostrato livelli simili di attività antimicrobica e ciò potrebbe essere dovuto al fatto che la principale classe chimica (carvacrolo/timolo) e il *p*-cymene sono rappresentati in percentuali abbastanza simili. Questi risultati potrebbero indicare, se confermati, che un OE ricco di carvacrolo e di timolo e con una discreta presenza di idrocarburi monoterpici sia un buon candidato come antibiotico. È stato approfondito il meccanismo d'azione antimicrobico di 6 OE verso batteri antibioticoresistenti, in particolare contro il complesso di *Burkholderia cepacia*, patogeni umani opportunisti altamente resistenti agli antibiotici. Gli OE di *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* ed *Eugenia caryophyllata* hanno mostrato il potere antimicrobico maggiore. Infine l'utilizzo di mutanti batterici nelle pompe di efflusso ha permesso di evidenziare come gli OE possano utilizzare meccanismi di azione intracellulare e, quindi, l'aggiunta di inibitori delle pompe di efflusso potrebbe aumentarne l'attività antibatterica.

Cannabis

In un lavoro in collaborazione con il Dipartimento NeuroFarBa dell'Università di Firenze e il Laboratorio di Tossicologia Clinica dell'ASL Toscana Centro, sono stati analizzati 219 campioni di preparazioni magistrali di olio di cannabis prodotte in 3 laboratori diversi, per valutare la variabilità nelle concentrazioni dei maggiori principi attivi della Cannabis.

Sono stati esaminati il cannabinolo (CBN), il cannabidiolo (CBD), il tetraidrocannabinolo (THC) e l'acido tetraidrocannabinolico (THCA), quantificandoli mediante cromatografia liquida ad alta pressione. Dall'analisi dei vari preparati è emersa una significativa variabilità tra le concentrazioni di cannabinoidi stimate dai vari laboratori evidenziando la necessità di stilare un protocollo standardizzato per tutti i laboratori galenici, volto a limitare i possibili effetti clinici legati a dosi eccessive o sottoterapeutiche.

Questi settori di ricerca costituiscono l'indispensabile base di partenza per condurre studi farmacologici e clinici in modo corretto e hanno suscitato interesse nella comunità scientifica, testimoniato dalle numerose pubblicazioni scientifiche (20 in 5 anni) su riviste con significativo Impact Factor e dalle rispettive citazioni.

Fabio Firenzuoli
Responsabile CERFIT

