



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia

ESTRATTI NATURALI E ANTIBIOTICI : NUOVE
COMBINAZIONI PER LA LOTTA
ALL'ANTIBIOTICO RESISTENZA

Relatore Chiar.mo
Prof. Andrea Giacometti

Tesi di laurea di:
Vitalia Cojocar

Correlatore
Dott. Gianluca Morroni

Anno Accademico 2019 - 2020

RINGRAZIAMENTI

Il percorso che sta terminando con la realizzazione di questo elaborato è durato sei anni , sei anni di montagne russe.

Proprio come sulla famosa attrazione si parte con tanta emozione e un po' di incoscienza, per poi dover rapidamente realizzare cosa ci aspetta. Si inizia a salire lentamente alla volta della prima cima, con un certa fatica, si sente quasi il *tuc-tuc* del trenino che stenta a salire; quando finalmente si raggiunge la sommità, pare la più alta possibile, da lì in poi sarà tutta discesa, si pensa, ma si scopre ben presto che quella dopo la sovrasta.

Lì su quel trenino, si continua ad avanzare, alle volte velocemente altre dovendo quasi spingere; dopo un lungo su e giù si arriva alla fine; quasi tirando un sospiro ci si gira per vedere attraverso cosa si è passati, ma guardandosi indietro si trova sì un cammino tortuoso, ma pieno di obbiettivi che non si pensava di poter raggiungere . Mentre sto quasi per scendere da questa giostra vorrei dedicare qualche riga a chi ha è salito con me.

Un sentito grazie al mio relatore prof. Andrea Giacometti per la sua infinita disponibilità e tempestività ad ogni mia richiesta.

Grazie anche al mio correlatore dott Gianluca Morroni per avermi seguito e insegnato pazientemente, per i suoi preziosi consigli e per avermi suggerito puntualmente le giuste modifiche da apportare alla mia tesi.

Grazie alle persone, ai colleghi, agli amici che mi hanno accompagnato nel percorso che ha portato fino a questo punto.

Infine grazie alla mia famiglia che, alle volte da lontano e alle volte da vicino, non mi ha mai fatto mancare la fiducia e l'amore. In particolare grazie a mia mamma, che come sempre nella vita, è stata il mio faro.

INDICE

INTRODUZIONE	4
Antibiotico resistenza	4
Storia degli antibiotici	5
Meccanismi di resistenza agli antibiotici	7
Effetti dell'associazione di antibiotici	11
Nuovi approcci per trattare le infezioni batteriche	12
Piante medicinali	13
Piante come antibiotici	15
Componenti attive degli estratti delle piante	17
Tannini	18
Amamelide	20
WH come strategia contro i biofilm batterici	24
SCOPO DELLA TESI	26
MATERIALI E METODI	27
Ceppi batterici	27
Farmaci	27
Determinazione della sensibilità	27
Checkerboard	30
RISULTATI	32
MIC del WH	32
Combinazione WH e antibiotici	32
Associazioni contro Escherichia coli ATCC 25922	34
Associazioni contro S. aureus ATCC 29213	40
DISCUSSIONE	46
BIBLIOGRAFIA	49

INTRODUZIONE

Antibiotico resistenza

La resistenza ai batteri, o antibiotico-resistenza, è un fenomeno naturale biologico per il quale i microrganismi non vengono più inibiti nella loro crescita o uccisi da antibiotici a cui erano prima sensibili, e rappresenta oggi un tema fondamentale di salute pubblica.

I meccanismi di resistenza agli antibiotici esistevano già molto prima dell'uso clinico degli antibiotici, poiché questi meccanismi sono già presenti in natura quindi la selezione di microrganismi resistenti è un'inevitabile conseguenza dell'uso di antimicrobici. Dall'inizio dell'era degli antibiotici, l'uso in pazienti e animali ha alimentato un forte aumento della pressione selettiva degli antibiotici, favorendo la comparsa di agenti patogeni resistenti ai farmaci. Negli ultimi anni il fenomeno si è accentuato e sono sempre più segnalati organismi altamente resistenti con nuovi meccanismi di resistenza. (1) La resistenza antimicrobica è un problema di grande entità perché aumenta la morbilità, la mortalità e i costi del trattamento delle malattie infettive. La diffusione dell'antibiotico-resistenza ha raggiunto negli ultimi anni livelli mai visti fino ad oggi. I fattori chiave che guidano questa minaccia sono l'aumentato uso di antibiotici (sia nella medicina umana che in quella animale), il maggiore movimento delle persone e l'incremento dell'industrializzazione. Un esempio è la diffusione globale del clone internazionale 1 di *Streptococcus pneumoniae* resistente alla penicillina (PRSP) che dimostra come i batteri multiresistenti si diffondano sfruttando gli spostamenti delle persone.(2)

Gli antibiotici sin dalla loro introduzione non solo hanno salvato la vita dei pazienti, ma hanno svolto un ruolo fondamentale nel raggiungimento di importanti progressi in medicina e chirurgia. Hanno prevenuto o trattato con successo infezioni che possono verificarsi in pazienti sottoposti a trattamenti chemioterapici; che hanno patologie croniche come diabete, patologie renali allo stadio terminale o artrite reumatoide; o che hanno subito interventi chirurgici complessi come trapianti di organi, protesi articolari o cardiocirurgia. Gli antibiotici hanno anche contribuito a prolungare la durata della vita prevista modificando l'esito delle infezioni batteriche e stravolgendo la durata media della vita nell'ultimo secolo. Gli antibiotici hanno avuto effetti benefici simili in tutto il mondo. (3) Nei paesi in via di sviluppo in cui i servizi igienico-sanitari sono ancora scarsi, gli antibiotici riducono la morbilità e la mortalità causate da infezioni di origine alimentare e altre infezioni legate alla povertà. Essi hanno rappresentato una rivoluzione di cui si rischiano di perdere i benefici. (4)

Si cerca ora di focalizzarsi sull'eliminazione dell'abuso di antibiotici per rallentare questa ondata di resistenze. Gli antibiotici vengono spesso usati impropriamente, su pazienti che non hanno infezioni batteriche, per periodi inutilmente prolungati o troppo corti. Inoltre, l'urgenza della terapia antibiotica spesso richiede l'utilizzo di molecole ad ampio spettro che non mostrano la stessa efficacia della terapia mirata e possono indurre lo sviluppo di resistenze. Grandi quantità di antibiotici sono state utilizzate nell'allevamento per stimolare la crescita e prevenire l'infezione in animali vivi, e questo ha ulteriormente aggravato la pressione selettiva che induce la comparsa di organismi resistenti. Nell'ultimo decennio sono stati messi in atto programmi per eliminare gradualmente l'uso non terapeutico di antibiotici nel bestiame e piani d'azione nazionali con l'obiettivo di migliorare gli sforzi di gestione antimicrobica, gli strumenti per diagnosticare le malattie infettive e la sorveglianza degli organismi resistenti. (5) Tuttavia, anche se questi programmi avessero successo, ci vorranno anni prima che i benefici siano evidenti.

Storia degli antibiotici

L'era moderna degli antibiotici è iniziata con la scoperta della penicillina da parte di Sir Alexander Fleming nel 1928; da allora, gli antibiotici hanno trasformato la medicina moderna e salvato milioni di vite. Furono prescritti per la prima volta per curare gravi infezioni negli anni '40, in quel periodo la penicillina ebbe successo nel controllo delle infezioni batteriche tra i soldati della Seconda Guerra Mondiale. Tuttavia, poco dopo, la resistenza alla penicillina divenne un problema clinico sostanziale, tanto che, negli anni '50, molti dei progressi del decennio precedente furono minacciati. In risposta, sono stati scoperti, sviluppati e distribuiti nuovi antibiotici beta-lattamici, come la Meticillina nel '60, ma in quello stesso decennio si ebbe il primo caso di *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA), nel Regno Unito nel 1962 e negli Stati Uniti nel 1968 (3). Sfortunatamente, alla fine è stata osservata resistenza a quasi tutti gli antibiotici che sono stati sviluppati (Figura 1). La vancomicina è stata introdotta nella pratica clinica nel 1972 per il trattamento della resistenza alla meticillina sia negli ceppi di *S. aureus* che negli stafilococchi coagulasi negativi. Era stato così difficile indurre la resistenza alla vancomicina in laboratorio che si riteneva improbabile che questa si manifestasse in un contesto clinico. Tuttavia, casi di resistenza alla vancomicina sono stati riportati negli stafilococchi coagulasi negativi nel 1979 e nel 1983. Dalla fine degli anni '60 ai primi anni '80, l'industria farmaceutica ha introdotto molti nuovi antibiotici per risolvere il problema della resistenza (3), ma l'entusiasmo è andato scemando, negli ultimi anni i produttori vi hanno visto sempre minor opportunità di guadagno in un campo sempre più ostico portando ad una diminuita introduzione di nuovi antibiotici. Negli ultimi anni, la ridotta commercializzazione di nuove molecole e la com-

parsa di nuove resistenze ha aumentato la preoccupazione per alcuni ceppi resistenti agli antibiotici a livello globale. Tra questi possiamo elencare: lo MRSA resistente alle penicilline antistafilococciche; gli enterococchi resistenti alla vancomicina o VRE; i Gram negativi produttori di betalattamasi ad ampio spettro ESBL; gli enterobatteri resistenti ai carbapenemi. (6)

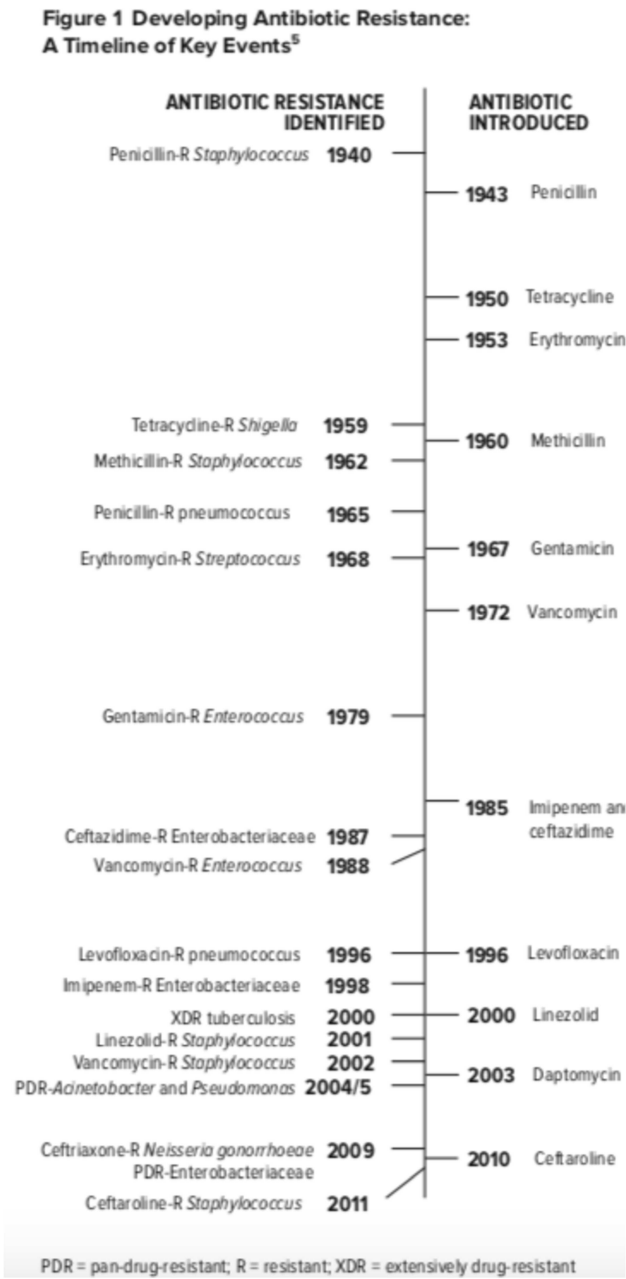


Figura 1: Sviluppo nel tempo di antibiotici e antibiotico resistenze
The Antibiotic Resistance Crisis.
Part 1: Causes and Threats - C.
Lee Ventola, MS

Questi ultimi antibiotici hanno rappresentato per anni la più efficace risorsa terapeutica per le infezioni causate da batteri Gram-negativi. Oggi, la diffusione di patogeni resistenti a queste molecole rappresentano il motivo di maggior preoccupazione.

La perdita di efficacia dei carbapenemi, in particolare, lascia uno scarso margine di intervento terapeutico e richiede il ricorso a combinazioni di antibiotici e a molecole non più usate da molti anni e relativamente tossiche (colistina) o di limitata efficacia (fosfomicina) (6).

Meccanismi di resistenza agli antibiotici

Un ceppo batterico viene definito come resistente ad un farmaco quando è in grado di moltiplicarsi in presenza di concentrazioni del farmaco che risultano inibitorie per la maggior parte dei ceppi della stessa specie o, operativamente, quando un ceppo batterico è in grado di moltiplicarsi in presenza di concentrazioni del farmaco pari a quelle massime raggiungibili nel corso dell'impiego terapeutico (7).

La resistenza può instaurarsi per mutazioni del genoma batterico (resistenza mutazionale) o per scambi di materiale genetico tra microrganismi attraverso meccanismi specializzati (resistenza acquisita): essenzialmente trasformazione, trasduzione e coniugazione. Lo scambio può riguardare materiale genetico cromosomico, oppure extracromosomico. La resistenza mutazionale si può sviluppare con modalità diverse a seconda del batterio e del farmaco; in alcuni casi è sufficiente una singola mutazione per conferire un fenotipo di resistenza; in altri, invece, la comparsa della resistenza è un processo graduale, a più step, in ognuno dei quali si ha una modesta alterazione della sensibilità del batterio. L'acquisizione della resistenza tramite trasformazione consiste nella captazione o nell'incorporazione, per ricombinazione omologa, di DNA libero nell'ambiente all'interno del genoma dell'ospite. La trasduzione invece coinvolge i batteriofagi. In questo caso segmenti di DNA possono essere trasferiti da una cellula ad un'altra sfruttando le capacità dei batteriofagi di infettare le cellule batteriche. L'ultimo meccanismo di acquisizione è la coniugazione con cui si ha passaggio di materiale genetico da batterio a batterio per contatto diretto tramite un pilo sessuale. L'importanza di questo sistema è legato al fatto che possono essere trasferiti contemporaneamente parti di DNA, sia cromosomiche che plasmidiche, contenenti geni che conferiscono resistenza a più antibiotici. Oltre ai plasmidi, ci sono altri elementi genetici mobili, come i trasposoni e gli integroni, che possono promuovere il trasferimento di materiale genetico tra repliconi diversi all'interno di una stessa cellula batterica, tra cromosoma batterico e plasmidi, oppure tra plasmide e plasmide. I trasposoni, generalmente possono veicolare uno o più geni di resistenza, contribuendo alla diffusione delle resistenze batteri-

che. Questo tipo di resistenza è definita acquisita e va distinta da quella condizione di generale insensibilità ad uno o più farmaci che si estende a tutti i ceppi di una data specie, in quel caso si parla di resistenza naturale o intrinseca (7) (8).

Possiamo quindi riassumere in due tipologie di antibiotico resistenza:

- Resistenza naturale (origine naturale): insensibilità costituzionale di un microrganismo verso un determinato antibiotico.
 - Immutabile nel tempo;
 - Geneticamente determinata, si manifesta in tutti i ceppi di una stessa specie.
- Resistenza acquisita: comparsa di ceppi che, nell'ambito di una specie microbica originariamente sensibile ad un chemioterapico, hanno perso la sensibilità verso concentrazioni del farmaco terapeuticamente raggiungibili in vivo
 - Cromosomica o endogena;
 - Extra-cromosomica o esogena (più frequente).

Un esempio classico di resistenza acquisita riguarda le penicilline: inizialmente le penicilline V e G erano attive contro gli stafilococchi ma col passare del tempo questi batteri sono diventati resistenti attraverso l'acquisizione di mutazioni o di geni di resistenza (betalattamasi) e di conseguenza è stato necessario sviluppare nuove molecole per superare questa resistenza che a loro volta sono diventate inefficaci.

Considerate le tipologie di antibiotico resistenza, i meccanismi con cui queste si possono attuare sono:

- produzione di enzimi inattivanti gli antibiotici
- modificazione del bersaglio su cui agisce l'antibiotico
- alterazione della permeabilità dell'involucro
- aumentata eliminazione dell'antibiotico dalla cellula
- sviluppo di una via metabolica alternativa a quella inibita dall'antibiotico

Produzione di enzimi inattivanti gli antibiotici

L'integrità della struttura chimica è essenziale per l'attività antibiotica. Pertanto, diversi tipi di enzimi conferiscono resistenza andando a scindere i legami chimici che possono essere idrolizzati. Gli esempi più noti sono le amidasi che scindono l'anello β -lattamico delle clas-

si di farmaci penicillina e cefalosporina; esterasi (resistenza ai macrolidi) ed epossidasi ad apertura dell'anello (resistenza alla fosfomicina). Questi enzimi richiedono acqua per la catalisi e vengono escreti dai batteri, in modo da intercettare gli antibiotici prima che entrino in contatto con il loro bersaglio batterico (9).

Si può considerare l'esempio β -lattamici perché essendo fra i farmaci più utilizzati, uno dei meccanismi di resistenza più frequenti è proprio la produzione di β -lattamasi. Questo enzima è in grado di idrolizzare l'anello β -lattamico dell'antibiotico annullando totalmente la sua attività antibatterica. I Gram-positivi liberano tale enzima nell'ambiente circostante in modo da degradare il farmaco prima che possa svolgere la sua azione. Nei Gram-negativi la produzione di β -lattamasi avviene, invece, a livello dello spazio periplasmico, neutralizzando l'antibiotico. L'idrolisi dell'anello β -lattamico può essere impedita utilizzando i cosiddetti inibitori suicidi, cioè molecole affini strutturalmente ai β -lattamici ma con modesta azione antibatterica, con capacità di legarsi in modo covalente alle β -lattamasi bloccando la loro attività enzimatica e impedendo l'inattivazione dell'altro eventuale farmaco presente. Gli inibitori suicidi più diffusi oggi in uso sono: acido clavulanico, tazobactam e sulbactam. Questi composti vengono abbinati a penicilline (ad esempio: amoxicillina + acido clavulanico) o cefalosporine e garantiscono loro immunità dalle più diffuse β -lattamasi (in pratica permettono il superamento della resistenza ai β -lattamici mediata da questi enzimi) (10) (11).

Gli altri enzimi inattivanti gli antibiotici (acetil-trasferasi, fosforil-transferasi, adenil-transferasi) non idrolizzano l'antibiotico, ma reagiscono chimicamente con esso, trasferendo diversi gruppi chimici in vari siti del principio attivo con conseguente modificazione della sua attività. Di questo gruppo fanno parte gli enzimi che inattivano gli aminoglicosidi, i quali possono essere acetilati, fosforilati o adenilati con conseguente inattivazione dovuta al loro mancato accumulo all'interno della cellula batterica e all'impossibilità di legarsi alle molecole bersaglio. Il cloramfenicolo può essere inattivato dall'enzima CAT (cloramfenicolo acetil transferasi) che acetila i gruppi idrossilici della molecola rendendola non tossica per la cellula (10).

Modificazione del bersaglio su cui agisce l'antibiotico

Le alterazioni del bersaglio possono essere dovute a mutazioni del bersaglio naturale (mutazioni nelle topoisomerasi o DNA girasi nel caso dei fluorochinoloni), a modificazioni del bersaglio (aggiunta di gruppi metilici nel ribosoma nel caso dei macrolidi e o produzione di proteine di protezione ribosomiale nelle tetracicline), sostituzione del bersaglio naturale e sensibile con un'alternativa resistente (resistenza alla meticillina negli stafilococchi).

Questo meccanismo di resistenza è dovuto a un ridotto legame del farmaco al bersaglio o dalla sostituzione del bersaglio naturale con un nuovo bersaglio che non lega il farmaco (9).

È ben nota la resistenza alla vancomicina basata sulla produzione di un bersaglio alternativo. La maggior parte dei batteri Gram-positivi può acquisire resistenza a questo antibiotico, cambiando la terminazione D-ala-A-ala, nel precursore N-acetilmuramico-pentapeptide della parete, con D-ala-D-lattato. Questa terminazione ha un'affinità per la vancomicina parecchie volte inferiore rispetto a quella della terminazione-bersaglio usuale; in questo modo il ceppo resistente riesce a costruire il proprio peptidoglicano (11).

Un altro esempio è la resistenza alla meticillina dovuta a produzione di nuove proteine che legano la penicillina (PBP2a). In questo caso viene acquisito un gene detto *mecA*, veicolato da una cassetta cromosomica chiamata *scmec*, che codifica per una nuova PBP insensibile a tutti i β -lattamici. I ceppi meticillino-resistenti oltre ad acquisire la resistenza crociata a tutti i β -lattamici (anche se attivi in vitro) mostrano spesso resistenza ai chinoloni, macrolidi, aminoglicosidi, rifampicina, ecc. (10) (11).

Un terzo esempio è quello che riguarda mutazioni a carico delle girasi che rende i batteri resistenti ai chinoloni. Questo tipo di resistenza è dovuta ad una mutazione cromosomica che modifica la DNA girasi e rende l'enzima resistente a questa classe di farmaci (alterazione della sub-unità A della DNA-girasi); in questo caso è sufficiente la sostituzione di un aminoacido con un altro per rendere il microorganismo resistente (10).

Invece per i macrolidi e i lincosamidi si ha metilazione del residuo di adenina sull'RNA ribosomiale 12S della subunità 50S del ribosoma, che quindi impedisce all'antibiotico di interagire con il ribosoma stesso (10).

Alterazione della permeabilità dell'involucro

Per molti batteri si parla di resistenza intrinseca, cioè comune a tutti i microrganismi della stessa specie, per esempio i batteri Gram-negativi non sono sensibili ai glicopeptidi perché la loro membrana esterna è naturalmente impermeabile a questi antibiotici, mentre i batteri Gram-positivi, per simili motivi, non sono inibiti dall'acido nalidixico, dall'aztreonam e dalle polimixine (assenza membrana esterna). (9) (10)

Per quanto riguarda l'alterazione della permeabilità dell'involucro si deve considerare che una diminuzione di questa può essere dovuta a mutazioni che riguardano i geni codificanti le porine, proteine che formano dei canali nella membrana esterna dei Gram negativi. Mo-

dificazioni nelle dimensioni o carica di questi canali possono causare, ad esempio, in *Neisseria gonorrhoeae*, resistenza alla penicillina e tetraciclina. (11)

Aumentata eliminazione dell'antibiotico dalla cellula

I sistemi di efflusso attivo permettono ai microorganismi di espellere determinate classe di antibiotici. Un meccanismo di resistenza legato all'eliminazione del farmaco mediante pompe di efflusso è tipico dei ceppi resistenti alle tetracicline. Sono stati identificati dei geni a localizzazione plasmidica, denominati *tet*, presenti sia nei Gram-positivi, sia negli enterobatteri, che codificano sistemi di efflusso: le proteine Tet sono proteine transmembrana in grado di trasportare attivamente le tetracicline dall'interno all'esterno della cellula batterica, impedendone l'accumulo intracellulare. (9) (10) (11)

Un meccanismo simile è noto negli streptococchi, dove il gene *mef*, veicolato da trasposoni, conferisce resistenza ad eritromicina e ad altri macrolidi a 14-15 atomi ma non a macrolidi a 16 atomi, lincosamidi e streptogramine. Negli stafilococchi è stato identificato il gene *norA* che elabora una proteina che trasporta all'esterno i chinoloni. Studi recenti indicano che in ceppi come lo *Pseudomonas* questo meccanismo di resistenza è molto efficace. (8)

Un ulteriore esempio di efflusso sono le “multidrug resistance pumps”: pompe di efflusso non specifiche, ma in grado di espellere antibiotici di varie strutture chimiche, le quali sono presenti in importanti patogeni multiresistenti (*N. gonorrhoeae*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ecc.) (10)

Sviluppo di una via metabolica alternativa a quella inibita dall'antibiotico

I microrganismi sono in grado di sviluppare delle alternative alle consuete vie metaboliche in modo da evitare l'inibizione della reazione da parte del farmaco. Un esempio di meccanismo di resistenza è quello che viene attuato nei confronti dei sulfamidici e del trimetoprim. Il ceppo resistente è in grado di sintetizzare varianti degli enzimi diidropterato sintetasi o diidrofolato reductasi con affinità minore nei confronti dell'inibitore; questi enzimi sono codificati da determinati geni posti su plasmidi o trasposoni. (8) (10)

Effetti dell'associazione di antibiotici

L'associazione di due antibiotici, dal punto di vista dell'azione antibatterica, può produrre un effetto additivo, sinergico o antagonista. L'effetto è additivo quando l'effetto della combinazione è uguale alla somma degli effetti di ogni singolo composto. (11)

Nel caso in cui l'effetto terapeutico di due antibiotici somministrati contemporaneamente è maggiore della somma degli effetti che avrebbero i singoli farmaci se somministrati da soli si parla del fenomeno chiamato sinergismo. Per esempio nella cura delle endocarditi batteriche, la penicillina e la streptomina sono molto più efficaci somministrate insieme che assunte separatamente. Il danno alla parete cellulare batterica, causato dalle penicilline facilita l'ingresso della streptomina. (12)

Altre combinazioni di farmaci possono mostrare un antagonismo. Per esempio, l'uso simultaneo di penicilline e tetracicline è spesso meno efficace rispetto all'impiego separato dei due antibiotici. Bloccando la crescita dei batteri, l'antibiotico batteriostatico tetraciclina interferisce con l'azione della penicillina, che richiede che il batterio sia in fase di crescita per essere efficace. (12)

Nuovi approcci per trattare le infezioni batteriche

Gli antibiotici attualmente utilizzati in clinica derivano principalmente da sostanze naturali prodotte da batteri e funghi; queste sostanze vengono poi spesso modificate dagli scienziati per ottenere un incremento o un ampliamento dell'attività antimicrobica. A partire dal 1940 fino al 1980, seguendo l'onda del successo furono scoperte e modificate 20 nuove classi di antibiotici, ma negli ultimi anni la scoperta di nuove classi si è arrestata. Da allora la quasi totalità degli antibiotici che sono stati introdotti sul mercato è rappresentata da varianti di classi già conosciute. I fattori che hanno reso gli antibiotici naturali poco allettanti per lo sviluppo di farmaci sono la loro complessità e la stabilità chimica, la numerosità e la purificazione. Inoltre, circa il 99% dei microorganismi che sono possibili fonti per nuovi antibiotici non possono essere cresciuti in un laboratorio e quindi restano non coltivati. A causa di queste difficoltà, l'industria farmaceutica ha favorito la selezione di molecole sintetiche per l'attività antibiotica. Nuove strategie nella scoperta di antibiotici, quali l'inibizione della resistenza e della virulenza, nuovi bersagli, nuove tecniche colturali e nuove combinazioni farmaceutiche, dovrebbero preservare i prodotti naturali come continua risorsa per nuovi antibiotici. (16)

Lo sviluppo di antibiotici sintetici è però una sfida estremamente complicata per le case farmaceutiche. I costi di sviluppo (estremamente elevati), la lunghezza della sperimentazione e il limitato ritorno economico degli antibiotici sintetici hanno dirottato la ricerca allo screening di fonti naturali che potessero fornire molecole con attività antibiotica.

Si è sempre alla ricerca di nuove fonti per antibiotici naturali, potenzialmente isolabili da batteri marini, da foreste tropicali, dai mixobatteri o anche da batteri estremofili. Si valutano anche nuovi approcci per il trattamento delle infezioni che non richiedono l'uccisione del microrganismo; si mira a disarmare i patogeni così che non possano provocare la malattia (ad esempio inibendo la produzione dell'endotossina batterica), sottrarre gli elementi nutrienti ai microrganismi (ad esempio il ferro), modulare la risposta dell'ospite e usare probiotici per proteggere il microbioma dell'ospite. (16) (17)

Alcuni esempi di antibiotici di origine naturale sono: fenil propanoidi (cloramfenicolo), polichetidi (tetraciclina), aminoglicosidi (streptomina, gentamicina), macrolidi (eritromicina), glicopeptidi (vancomicina) e β -lattamici di seconda generazione (cefalosporine). Mentre sulfamidici, chinoloni e ossazolidinoni derivano da fonti sintetiche. A causa della ripetuta resistenza dei microrganismi patogeni agli antibiotici, nonché degli effetti collaterali presentati da questi antibiotici, sta prendendo piede l'indagine su altre fonti di antimicrobici, come le piante medicinali, note per le loro proprietà antimicrobiche. Le piante producono metaboliti secondari (fitochimici), che hanno dimostrato il loro potenziale come antibatterici se usati da soli e come sinergici o potenziatori di altri agenti antibatterici. I fitochimici agiscono spesso attraverso meccanismi diversi rispetto agli antibiotici convenzionali e potrebbero quindi essere utili nel trattamento di batteri resistenti. (16)

Un altro approccio è la combinazione di antibiotici con altri composti bioattivi quali i prodotti naturali. La combinazione di antibiotici e antibiotici (le cosiddette coppie congrue) è stata un pilastro della chemioterapia antinfettiva da oltre 60 anni. Le combinazioni di antibiotici hanno il potenziale non solo di aumentare lo spettro antibiotico in cui non è noto l'agente causale dell'infezione, ma anche, in molti casi, di agire in sinergia. Sono stati scoperti circa 16 500 prodotti naturali con attività antibiotica negli ultimi 60 anni: lo screening di queste molecole può permettere la scoperta di coppie congrue di prodotti naturali con attività sinergica contro agenti patogeni resistenti a più farmaci, che potrebbero arrivare in clinica. (17)

Piante medicinali

Secondo l'OMS le piante che forniscono farmaci sono definite "medicinali", esse possiedono sostanze con proprietà terapeutiche, che possono essere utilizzate tal quali o come precursori di sintesi di composti attivi. La pianta medicinale può essere reputata un contenitore di sostanze chimiche che possono essere isolate ed impiegate invariate in terapia,

oppure rappresentare la fonte primaria per ottenere farmaci di semisintesi, od essere la base per produrre i fitoterapici in cui l'attività farmacologica è dovuta alla presenza dei vari componenti contenuti all'interno della pianta stessa.

La droga vegetale è una complessa miscela di sostanze chimiche, a volte anche molto numerose, e che sono difformemente concentrate nella pianta o concentrate solo in un organo specifico. Da una stessa pianta possono essere raccolte parti diverse che rappresenteranno droghe differenti con una diversa composizione quali-quantitativa in principi attivi e con proprietà terapeutiche differenti. Morfologicamente si possono separare le droghe in “organizzate”, se contengono elementi cellulari rappresentati dall'intera pianta o da una parte di essa (radice, semi, foglie, fiori, rizomi) e “non organizzate” quando sono prive di elementi cellulari perché sono formate da un secreto oppure un estratto dei tessuti della pianta (essudato, lattice, succo, olio essenziale, resine). La droga vegetale, quindi, può essere costituita dalla parte della pianta (fresca o essiccata) con il maggior contenuto in principi attivi o un prodotto della pianta opportunamente trattato. (14)

L'utilizzo delle piante è alla base della medicina tradizionale, un termine usato per riferirsi a qualsiasi pratica medica non occidentale e alla pratica delle medicine tradizionali risalenti alla preistoria, sin da allora i reperti fossili ci indicano che gli esseri umani usavano le piante come fonte medicinale. La medicina tradizionale cinese, l'Ayurveda, la medicina tradizionale coreana, la medicina araba unani e la medicina tradizionale iraniana sono alcuni esempi di medicine tradizionali che sono state praticate in tutto il mondo. Sono costituiti da medicinali a base di foglie, radici, erbe, cortecce e minerali, che possono essere trovati in abbondanza in natura e lavorano in sinergia.

Le medicine tradizionali sono state poi usate come riferimento per isolare composti con valore medicinale dalle piante per poterli applicare nella medicina moderna. Una scoperta di tale genere è la morfina, dal succo di semi di papavero catramato, di Friedrich Sertürner, dal papavero da oppio vegetale. Oltre a questo, ci sono numerosi composti bioattivi, ad esempio gli alcaloidi come caffeina e nicotina, che sono stati estratti da prodotti naturali; dalle piante sono stati estratti anche farmaci anti-tumorali, anti-ipertensivi e anti-emicranici. Ad esempio, l'albero di tasso del Pacifico trovato nella regione nord-occidentale degli Stati Uniti d'America è stato usato dagli indigeni come medicinale. È stato scoperto che l'albero era fonte di taxolo che ha una significativa attività anticancro; utilizzato per il carcinoma mammario e ovarico. (20) In precedenza, la selezione dei prodotti naturali era stata quasi abbandonata, in parte perché non si identificavano più nuove piste, richiedeva tempo e non si adattava alla logistica in evoluzione della selezione ad alto rendimento. Tuttavia, oggi vi è una ripresa nell'uso di medicinali a base di erbe in tutto il mondo.

L'utilizzo di prodotti naturali in ambito medico è oggi una tendenza fiorente. I prodotti naturali sono visti come un gruppo privilegiato di strutture che si è evoluto per interagire con un'ampia varietà di target proteici per scopi specifici. Ci sono molti vantaggi nell'utilizzo di prodotti naturali come composti farmaceutici, come un minor numero di effetti avversi, una migliore tolleranza del paziente, sono relativamente economici e c'è un'ampia accettazione grazie alle loro applicazioni tradizionali, sono inoltre rinnovabili e hanno una migliore biodegradabilità. (19)

Piante come antibiotici

Negli ultimi anni, la crescente incidenza di agenti patogeni resistenti ai farmaci ha attirato l'attenzione delle società farmaceutiche e scientifiche verso studi sulla potenziale attività antimicrobica delle sostanze di origine vegetale. Ciò ha permesso una ripresa dell'uso di medicinali a base di erbe in tutto il mondo.

Le piante rappresentano una vasta fonte di composti interessanti. Il mondo delle piante superiori, in particolare le foreste pluviali, è stato esplorato solo in parte per l'isolamento di nuovi composti e si stima che solo il 6% circa delle circa 300.000 specie di piante superiori sia stato studiato farmacologicamente e solo il 15% fitochimicamente. Una potenziale fonte di composti bioattivi è anche la nuova ricerca di metaboliti precedentemente ritenuti inattivi, che rappresentano circa il 60% dei metaboliti noti.

Nel loro ecosistema, le piante sono continuamente esposte a una vasta gamma di stress ambientali e condizioni ostili. I fattori di stress che influenzano la forma fisica delle piante includono fattori ambientali (abiotici), come carenza di nutrienti, ipossia / anossia, siccità, salinità, mancanza di ossigeno, sbalzi di temperatura avversi, elevata intensità della luce e anche quei fattori derivati da attività antropogeniche, come i pesticidi, inquinanti e aumento delle radiazioni UV. Inoltre, diversi fattori viventi (biotici) sono anche fattori che inducono stress, tra cui batteri, funghi, virus, nematodi, insetti e parassiti erbivori. Le piante hanno affrontato la maggior parte dei loro aggressori per oltre 350 milioni di anni. Ciò ha permesso alle piante di co-evolversi con i loro nemici naturali in una reciproca interazione evolutiva e di imparare a resistere ai loro attacchi. Sebbene carenti di cellule difensive mobili e di un sistema immunitario adattativo somatico paragonabile a quello degli animali, le piante hanno la capacità di riconoscere i segnali patogeni o di stimolare e attivare le risposte immunitarie attraverso il rafforzamento della parete cellulare, la biosintesi degli enzimi litici e la produzione di metaboliti secondari e proteine correlate alla patogenesi. A causa

del loro stile di vita sessile e di questa corsa agli armamenti evolutiva, le piante hanno sviluppato una vasta gamma di difese chimiche precedentemente denominate metaboliti secondari. Questi composti possono essere costitutivi, immagazzinati come forme inattive o inducibili in risposta all'attacco patogeno; i primi sono noti come fitoanticipine e i secondi come fitoalexine. Le fitoanticipine (comprese saponine, glicosidi cianogenici e glucosinolati) sono presenti nella pianta prima dell'attacco di microrganismi o prodotte dopo l'infezione da precursori preesistenti. Alcune fitoanticipine si trovano sulla superficie della pianta mentre altre sono presenti nei vacuoli o negli organelli e vengono rilasciate attraverso un enzima idrolizzante dopo una sfida ai patogeni. Le fitoalexine (inclusi terpenoidi, glicosteroidi, flavonoidi e polifenoli) sono piccole molecole (peso molecolare <500) che sono entrambe sintetizzate e accumulate nella pianta dopo il riconoscimento degli elicitori derivati dall'esposizione agli aggressori. Oltre a migliorare la protezione da stress biotici e abiotici, i metaboliti secondari sono un'importante fonte di antitumorali, antiossidanti, antidiabetici, immunosoppressivi, antimicotici, antinfiammatori, antimalarici, antioomiceti, antibatterici, antipiretici, antidiabetici, insetticidi, nematicidi e antivirali. (15)

Le interazioni sinergiche sono di vitale importanza nella fitomedicina per spiegare l'efficacia di dosi apparentemente basse di componenti attivi in un prodotto a base di erbe. Questo concetto si basa sull'idea che un estratto di una pianta offre vantaggi rispetto a un singolo ingrediente isolato. Effetti sinergici possono essere ottenuti se l'interazione tra i componenti dell'estratto provoca una maggiore solubilità e, quindi, migliora la biodisponibilità dei composti attivi. L'interazione con obiettivi diversi da parte delle diverse componenti difensive dell'estratto promuove anche effetti sinergici e migliora il sistema difensivo delle piante. Ad esempio, nel pomodoro, gli alcaloidi, i fenolici, gli inibitori della proteinasi e gli enzimi ossidativi agiscono sinergicamente, influenzando gli insetti durante l'ingestione, la digestione e il metabolismo. La maggior parte dei composti che sono sintetizzati in risposta all'invasione di agenti patogeni non sono nemmeno necessariamente antimicrobici. Tali composti potrebbero avere una funzione regolatoria, aumentando indirettamente il livello di resistenza della pianta. Uno speciale effetto sinergico può quindi verificarsi quando gli antibiotici sono combinati con un agente che antagonizza i meccanismi di resistenza batterica. L'utilità dei prodotti vegetali come potenziatori di antibiotici e attenuatori di virulenza è stata studiata intensamente.

È stato ampiamente riportato che le piante sono in grado di produrre inibitori della resistenza ai farmaci al fine di garantire il rilascio dei composti antimicrobici. Poiché i meccanismi di resistenza sono ampiamente condivisi tra i contesti ambientali e clinici, questi composti possono trovare applicazioni dirette sulle infezioni cliniche.

Possono essere rinvenuti vari studi sugli estratti di piante grezze e il loro effetto sinergico con antibiotici convenzionali contro i patogeni MDR; (15) Ad esempio Darwish et al. hanno dimostrato che l'efficacia della gentamicina e del cloramfenicolo contro lo *S. aureus* è stata migliorata dall'uso di alcuni materiali vegetali giordani (21)(15). Ahmad et al. hanno riferito che estratti grezzi di piante medicinali indiane erano sinergici con tetraciclina e ciprofloxacina contro i batteri enterici MDR che producono ESBL (22)(15).

Componenti attive degli estratti delle piante

Gli effetti medicinali benefici dei materiali vegetali derivano in genere dalla combinazione di prodotti secondari presenti nelle piante. Questi composti sono principalmente metaboliti secondari, sintetizzati e depositati in parti specifiche o in tutte le parti della pianta. In generale, le foglie sono il sito di stoccaggio maggioritario per i composti desiderati. Anche i frutti contengono una notevole quantità di ingredienti attivi e quindi vengono spesso consumati sotto forma di succo oralmente per ottenere i composti desiderati. Altre parti di piante che possono essere estratte per ottenere i composti terapeutici sono radici, fiori, semi, corteccia di gambo, ecc.(18)

Questi metaboliti secondari, molti dei quali sono polifenoli o loro derivati sostituiti con ossigeno, presentano vari benefici, tra cui proprietà antimicrobiche contro microbi patogeni e deterioranti. I principali gruppi di composti responsabili dell'attività antimicrobica delle piante includono fenoli, chinoni, saponine, flavonoidi, tannini, cumarine, terpenoidi e alcaloidi. Le variazioni nella struttura e nella composizione chimica di questi composti si manifestano poi con le differenze nella loro azione antimicrobica. La diversità strutturale dei composti di origine vegetale è immensa e l'impatto dell'azione antimicrobica che producono contro i microrganismi dipende dalla loro configurazione strutturale. (23)

I polifenoli presentano grandi variazioni strutturali e sono uno dei gruppi più diversificati di metaboliti secondari. Si ritiene che i gruppi idrossilici (-OH) nei composti fenolici abbiano un'azione inibitoria, poiché questi gruppi possono interagire con la membrana cellulare dei batteri per interrompere le strutture e causare la fuoriuscita dei componenti cellulari. Un gruppo attivo come -OH promuove la delocalizzazione di elettroni che fungono quindi da scambiatori di protoni e riducono il gradiente delle cellule batteriche attraverso la membrana citoplasmatica. Ciò causerà il collasso della forza motrice del protone e l'esaurimento del pool di ATP e alla fine porterà alla morte cellulare. Questi gruppi -OH possono facilmente legare il sito attivo degli enzimi alterando il metabolismo cellulare dei microrganismi; questo meccanismo dimostra l'importanza di questi gruppi nell'attività antimicrobica.

crobica. I composti fenolici fungono anche da antiossidanti, infatti la presenza di un gruppo -OH libero nei composti fenolici da proprietà antiossidanti, questa proprietà inibisce la generazione di specie reattive dell'ossigeno, così come l'eliminazione dei radicali liberi, riducendo così il potenziale redox del mezzo di crescita. Questo abbassamento del potenziale redox può ulteriormente limitare la crescita di microrganismi indesiderati. La posizione del gruppo -OH influenza anche l'efficacia antimicrobica dei componenti. Ad esempio, la struttura del timolo è simile a quella del carvacrolo; tuttavia, è stata osservata una differenza nell'efficacia antimicrobica tra timolo e carvacrolo contro batteri Gram-positivi e Gram-negativi, quando testata su terreno di agar. Questa differenza è stata attribuita al gruppo -OH situato nella posizione meta nel timolo rispetto alla posizione orto del carvacrolo. È stato riportato l'importanza del gruppo -OH nella posizione 5 dei flavanoni e dei flavoni per l'attività contro i ceppi di *S. aureus* resistenti alla meticillina. (23)

L'alta attività antimicrobica dei composti fenolici dipende anche dalle dimensioni del gruppo alchilico o alchenilico aggiunto. È stata riscontrata una maggiore attività antimicrobica con la presenza di maggiori dimensioni di gruppi alchilici o alchenilici aggiunti. L'elevata attività dei composti fenolici potrebbe quindi essere dovuta alla sostituzione alchilica nel nucleo fenolico. Questa attività antimicrobica dei derivati vegetali potrebbe anche variare a seconda del tipo di microrganismi, metodo di estrazione, terreno di coltura, dimensioni dell'inoculo e metodo di determinazione. (23)

Il gruppo fenolico preso in considerazione ai fini di questo elaborato sono i tannini.

Tannini

I tannini sono composti organici non azotati, dal sapore fortemente amaro, dotati di attività astringente e tannante: sono cioè in grado di trasformare le pelli in cuoio precipitando le proteine e formando con esse dei composti insolubili. (13) I tannini sono composti polifenolici comuni nelle piante vascolari; sono prodotti in quasi tutte le parti della pianta, in particolare semi, radici, corteccia, legno e foglie, la localizzazione è data dal loro ruolo fondamentale nella difesa della pianta contro insetti, infezioni alimentari, funghi o batteri. Il meccanismo di difesa si basa sulla capacità dei tannini di legarsi irreversibilmente alle proteine. Sono anche considerati uno dei componenti contribuenti alla diminuzione del rischio di soffrire di malattie cardiovascolari e alcune forme di cancro che si può avere scegliendo diete ricche di frutta e verdura. (24)

In natura i tannini si trovano in forma complessa (tannoidi) e a volte in combinazione con gli zuccheri (tannosidi). Dal punto di vista chimico possono essere classificati in tre gruppi: tannini idrolizzabili, tannini condensati e tannoidi. I primi sono costituiti da varie molecole di acido gallico (gallitannini) o di acido ellagico (ellagitannini): i più semplici, detti anche depsidi, sono esteri di acidi polifenolici (acido gallico); i più complessi, per idrolisi danno uno zucchero (o un polialcol) ed acidi polifenolici e sono anche detti tannini glicosidici. I tannini condensati sono polimeri del catecolo, non sono idrolizzabili con acidi diluiti né con tannasi, sono privi di zucchero e poco solubili in acqua. Se trattati a caldo con acidi forti e con ossidanti vengono trasformati in flobafeni (o rossi di tannino). I tannini condensati sono molto diffusi nel regno vegetale ed anche i più utilizzati nell'industria conciaria. I tannoidi, chiamati anche tannini del caffè, sono derivati dell'acido clorogenico (estere dell'acido caffeico con acido chinico). Sono molto diffusi nel caffè, noce vomica, tabacco, tè, matè. (13)

I tannini hanno varie applicazioni in ambito medico/farmaceutico, alcune già conosciute molte altre sono ancora in fase di studio. Somministrati per via topica hanno effetto vaso-costrittore, sono usati nella rigenerazione dei tessuti affetti da piccole ferite e ustioni, e anche nel trattamento della dermatite (25). Sono note le funzioni battericide, in quanto reagiscono in modo irreversibile con le proteine, complessandosi all'interno delle membrane batteriche, neutralizzando la loro attività. Di conseguenza, i farmaci a base di tannino sono stati a lungo commercializzati per curare le infezioni intestinali, per le proprietà anticaria e inoltre in letteratura possiamo trovare numerosi studi sperimentali sull'uso farmaceutico dei tannini con attività antitumorali e antioncogeniche.

La minima concentrazione inibitoria del tannino (MIC) necessaria per ridurre del 50% la citopatogenicità indotta da un numero di virus è stata utilizzata come valutazione della loro efficacia; valori MIC più bassi danno un miglior comportamento antivirale. È stata anche determinata la concentrazione minima citotossica (MCC) dei diversi tannini necessaria per rilevare l'alterazione microscopica della morfologia cellulare normale. Meno tossico è il tannino testato nelle cellule del paziente, maggiore è il suo valore MCC e più è accettabile come composto antivirale. L'efficacia di diversi tannini, a causa della loro natura polifenolica, può essere molto elevata contro un vario numero di virus, per la loro reazione irreversibile e alla combinazione con le proteine del capsido del virus. Pertanto, sono stati testati numerosi tannini disponibili in commercio su svariati virus: HIV-1 e HIV2, Herpes simplex 1 e 2, influenza A H3-N2, influenza B, coronavirus umano, ... Gli effetti inibitori di questi tannini sono stati anche testati sulla proliferazione di cellule di leucemia murina, cellule di carcinoma mammario murino e cellule T umane. (24)

Il vino, la birra e i succhi di frutta contengono naturalmente tannini. In realtà è la loro presenza che dà il loro gusto caratteristico. In breve, il livello di tannino in uno di questi prodotti deve essere compreso in un intervallo definito / intervallo di concentrazione affinché la bevanda sia organoletticamente piacevole. Una quantità troppo bassa di tannino e la bevanda sarà insipida e senza gusto. Una percentuale troppo alta di tannini nella bevanda e la bevanda risulterà sgradevole, troppo "astringente" per la bocca del consumatore. Molti vini, alcune birre e diversi succhi di frutta contengono tuttavia una concentrazione troppo bassa di tannino e quindi insufficiente ad avere una qualche efficacia medica. (24)

Le droghe vegetali più utilizzate come fonte di tannini sono l'amamelide, la ratania, l'ippocastano e le galle di noce. (13)

Amamelide



Figura 2 *Hamamelis virginiana* : pianta e foglie

Farmacognosia , Botanica, chimica e farmacologia delle piante medicinali. F. Capasso

L'amamelide è data dalle foglie di *Hamamelis virginiana* L. (Fam. Amamelidiaceae) o Witch Hazel (WH). L'amamelide è stata per secoli utilizzata in America per la cura delle

distorsioni e contro le emorragie uterine. All'inizio del XX secolo la droga è stata introdotta in Europa.

Habitat. Foreste umide dell'America settentrionale (Virginia, Carolina del nord, New Brunswick, Tennessee, Minnesota) e del Canada. È diffusa anche in Florida e Texas.

Descrizione della pianta Arbusto o piccolo albero di 3-6 m, con fusto tortuoso, ramificato. I rami, flessibili, recano foglie alterne picciolate¹, pubescenti² (Fig. 2). I fiori sono raggruppati in fascetti ascellari, il frutto è una piccola capsula loculicida³.

Parti usate. foglie, corteccia e ramoscelli.

Raccolta e preparazione della droga. In estate si raccolgono le foglie che vengono essiccate all'aria evitando di esporle ai raggi del sole; in questo modo la droga secca conserva il colore verde.

Descrizione della droga. La foglia mostra un lembo obovato, ottuso o acuto all'apice; lunga 10-12 cm e larga 7-8 cm, presenta un margine sinuato-dentato⁴ ed una nervatura mediana ben evidente dalla quale partono, ad angolo acuto, nervature secondarie che terminano sui denti del margine. Le nervature terziarie si anastomizzano formando un reticolo irregolare. La pagina superiore è di colore bruno-verdastro mentre quella inferiore, rivestita di peli unicellulari, è di colore verde chiaro. La droga ha sapore leggermente amaro ed astringente. L'estratto idroalcolico è il più utilizzato in quanto contiene quantità considerevoli di tannini. In commercio si trova anche l'acqua distillata di amamelide che si prepara lasciando macerare i rametti d'amamelide, parzialmente essiccati, ed aggiungendo, dopo filtrazione, alcol in modo da avere un estratto finale al 14-15% di alcol. (13)

Componenti principali. Tannini (circa l'8%) come amamelitannino, derivati dell'acido gallico, flavonoli (kaempferolo, quercetina ecc.) ed i loro glicosidi, un olio volatile (0,5%) contenente safrolo (0,2%), β -ionone (1%), α -ionone (3-5%), acetaldeide (3,2%), α -esenolo (9,7%), eugenolo e sesquiterpeni. Altri componenti sono: olio fisso (0,6%), resina (amemelina, amamelitannino), cera, saponine, colina, sostanze amare. (13)

¹ con picciolo più o meno lungo, opposto a foglia sessile che non presenta gambo o picciolo.

² coperto di peli

³ detto di capsula che a maturità si spacca lungo la linea mediana dorsale

⁴ sinuato-dentato: con rientranze poco profonde ed arrotondate e dentatura

Usi tradizionali

L'amamelide è tradizionalmente utilizzata esternamente per trattare irritazioni della pelle di bassa entità, infiammazioni e secchezza. L'estratto, da foglia o corteccia, è considerato un astringente, e viene usato per il trattamento di emorroidi, vene varicose, ematomi, abrasioni di entità minore e per ridurre il fastidio perianale dopo il parto. L'acqua di amamelide è usata anche per alleviare le irritazioni oculari causate da secchezza o esposizione a vento e sole. Sono state attribuite funzioni di anestetico locale ed emostatico. In Germania, l'infusione di corteccia e foglie di amamelide è approvata per l'utilizzo come gargarismo per l'infiammazione gengivale e delle mucose. Storicamente veniva assunta oralmente per trattare la diarrea, la menorragia e la dismenorrea, ma non è più raccomandato perché può causare irritazioni dello stomaco e danni epatici . (26)

Evidenze cliniche

Gli studi clinici a supporto degli usi terapeutici dell'amamelide sono limitati.

Infiammazione della pelle:

In uno studio condotto su volontari sani, si è osservata l'efficacia nella soppressione dell'eritema cutaneo indotto dai raggi UV, maggiorata dall'associazione del distillato di hamamelis a basso dosaggio con un veicolo di olio in emulsione acquosa con fosfatidilcolina, rispetto alla crema di hamamelis senza fosfatidilcolina. Sebbene lo studio abbia dimostrato l'attività anti-infiammatoria , la crema all'idrocortisone all'1% sembrava essere comunque superiore, sopprimendo l'eritema indotto dai raggi UV rispetto ai preparati di hamamelis. (26)(27)

In uno studio randomizzato in doppio cieco su pazienti con eczema atopico, la crema di distillato di hamamelis ha ridotto il prurito la desquamazione e l'eritema dopo 1 settimana. Tuttavia, si è scoperto che non era più efficace della preparazione di base (26)(28).

Una lozione dopo sole contenente il 10% di distillato di hamamelis è stata valutata in volontari sani e si è scoperto che sopprimeva l'eritema indotto dai raggi UV tra il 20% e il 27% entro 48 ore (29). Lo stesso gruppo ha confrontato l'efficacia antinfiammatoria (utilizzando un test eritematico UV modificato) di diversi preparati topici, tra cui tre diverse lozioni contenenti il 10% di distillato di hamamelis, due veicoli, un antistaminico (dimetindene maleato) 0,1% di gel, una crema all'idrocortisone 1% e lozione allo 0,25% di idrocortisone. Tutti i preparati hanno mostrato effetti antinfiammatori, ma i preparati di idrocorti-

sone erano più efficaci. Una lozione di hamamelis ha soppresso l'eritema significativamente più dei veicoli alla dose UV di 1,4 dose minima di eritema (MED) (30)(26).

In uno studio osservazionale condotto su 309 bambini di età compresa tra 27 giorni e 11 anni con lievi lesioni cutanee, "dermatite da pannolino" o infiammazione cutanea localizzata, il trattamento consisteva in pomata di hamamelis (n = 231) o pomata di dexpanthenol (n = 78). L'unguento all'amamelide è risultato efficace e ben tollerato, con effetti osservati simili al despantenolo (31)(26).

In uno studio pilota condotto su volontari sani, una formulazione semisolida contenente l'1% di procianidina di *H. virginiana* ("ProcyanoPlus") si è dimostrata efficace nel ridurre la perdita d'acqua transepidermica e la formazione di eritema indotta dal sodio lauril solfato (32)(26).

Emorroidi:

Esistono alcune prove cliniche a supporto dell'uso dell'amamelide negli unguenti rettali per il trattamento delle emorroidi. Gli studi hanno scoperto che l'unguento di hamamelis ha ridotto significativamente prurito, sanguinamento, sensazione di bruciore e dolore associati a disturbi anorettali (26).

Trauma perineale:

Una recensione di Cochrane ha riportato una mancanza di efficacia dell'acqua amamelide nell'alleviare il dolore causato dal trauma perineale durante il parto. Nessuna differenza è stata trovata nel numero di donne che hanno riferito di nessuna o lieve sollievo dal dolore dal trattamento con impacchi di ghiaccio rispetto all'acqua di hamamelis, con un'incidenza <5% di infezione della ferita perineale in entrambi i gruppi (33)(26).

Effetti antinfiammatori e correlati:

Sono state segnalate attività antiossidanti, antinfiammatorie e chemiopreventive degli estratti di amamelide. I preparati dermici topici di amamelide hanno dimostrato di avere un effetto protettivo contro i danni dei radicali dell'ossigeno nei fibroblasti cutanei murini coltivati (34). L'amamelitannina, che ha dimostrato di avere una potente attività antiossidante, inibisce anche la morte delle cellule endoteliali indotta dal TNF α in vitro. Ciò può spiegare l'uso tradizionale dell'amamelide come antiemorragico e il suo uso noto come agente protettivo per le radiazioni UV (35)(26).

Effetti antivirali:

Un estratto di corteccia di amamelide, costituita principalmente da proantocianadine, ha mostrato una significativa attività antivirale contro il virus dell'herpes simplex di tipo 1, oltre a contrastare l'azione dei radicali liberi e ai forti effetti antinfiammatori (36). Una debole attività antimicrobica è stata osservata anche in vitro per un preparato topico contenente il 90% di distillato di amamelide con il 5% di urea (37) (26).

Inibizione della mutagenesi e proliferazione delle cellule tumorali:

Le proantocianidine costituenti hanno mostrato di agire direttamente come desmutageni (cioè inattivando agenti cancerogeni), con una forte inibizione dose-dipendente dei danni al DNA indotti da cancerogeni, dimostrata in vitro nelle cellule di epatocarcinoma umano (Hep G2). È stato scoperto che il grado di polimerizzazione delle proantocianidine influenza l'effetto antimutagenico (38). Studi in vitro hanno dimostrato che gli estratti di corteccia di amamelide, in particolare le frazioni polifenoliche, inibiscono la proliferazione cellulare nelle linee cellulari di cancro del colon umano, con la hamamelitannin che risulta essere più efficace (39)(26).

Effetti collaterali: Sono state riportate dermatiti da contatto ; il Safrole, un componente dell'olio volatile, è un noto cancerogeno, ma si trova in quantità troppo piccole per destare preoccupazione. Non è raccomandato per l'uso orale, poiché può causare irritazione allo stomaco e danni al fegato. (26)

WH come strategia contro i biofilm batterici

In molti batteri, la patogenicità e/o la virulenza sono controllate e coordinate da un processo di comunicazione intercellulare chiamato quorum sensing (QS). Diversi batteri Gram-positivi e Gram-negativi usano il QS per coordinare l'espressione di fenotipi benefici del gruppo e regolare le attività fisiologiche, che promuovono la patogenesi e consentono ai batteri di resistere agli antibiotici. Includono, tra gli altri, la produzione di fattori di virulenza, metaboliti secondari e la formazione di comunità microbiche strutturate come biofilm. In effetti, i sistemi di controllo qualità sono integrati in alcuni processi importanti per la formazione e la differenziazione dei biofilm . Pertanto, gli inibitori del QS sono anche una possibile chiave per superare i limiti degli antibiotici in uso per il trattamento delle infezioni da biofilm. I vantaggi proposti per il controllo dell'infezione mediante l'inibizione del QS si basano sul fatto che l'inibitore non sopprime la crescita delle cellule e quindi non eserciterà una pressione selettiva per sviluppare resistenza.

Tutti i sistemi QS condividono un meccanismo che comprende la produzione, l'accumulo e il rilevamento del segnale. Qualunque siano gli sforzi impiegati per interrompere questo fenomeno, tutte le strategie saranno basate sull'inibizione di uno di questi passaggi. L'inibizione del QS funziona allo stesso modo nei batteri planctonici e sessili. Nei batteri sessili, il QS è un componente chiave della comunicazione collegato a diversi eventi. L'interruzione delle vie di segnalazione del QS può impedire la formazione iniziale di biofilm e alterarne la progressione attraverso l'inibizione della secrezione di adesine o appendici cellulari, che influenzano la motilità batterica, l'adesione alle superfici, l'auto e la coaggregazione cellulare, la formazione di microcolonie e l'inibizione della produzione di pompe di efflusso. Alcuni segnali inibitori e QS possono anche essere utilizzati per indurre la dispersione del biofilm. In effetti, è stato documentato che le molecole di segnalazione mediano diversi aspetti della dinamica del biofilm (ad es. Eterogeneità, architettura, resistenza alle sollecitazioni, manutenzione e degradazione). Il loro blocco può aumentare la suscettibilità del biofilm agli antibiotici e alle difese dell'ospite e quindi favorire l'uso di basse dosi di antibiotici, portando a una più facile eradicazione. Inoltre, evitano l'uso indiscriminato di antibiotici ad ampio spettro che sono spesso più tossici e costosi.

La ricerca attuale mira quindi a scoprire nuovi inibitori del QS con effetti collaterali ridotti sulla salute umana. In questo senso, i criteri principali utilizzati per la selezione di un inibitore efficace si basano sulla sua specificità per un determinato regolatore QS con pochi o nessun effetto avverso sui batteri o sull'ospite.

Numerose osservazioni hanno dimostrato che i prodotti naturali, in particolare i fitochimici, sono una fonte interessante di inibitori, per la numerosità, la vasta diversità chimica con complessità strutturale e attività biologica. In effetti, assomigliano a quello che è considerato un inibitore del QS "ideale", che include essere molecole chimicamente stabili, altamente efficaci, a bassa massa molecolare ed essere innocui per la salute. Pertanto, i fitochimici con attività di inibizione del QS possono essere strumenti promettenti per aiutare il trattamento delle infezioni batteriche, comprese quelle legate al biofilm, in un'era in cui la disponibilità di antibiotici efficaci non è più garantita. (15)

Un buon esempio sono gli estratti di Amamelide o Witch Hazel. In un recente studio è stata presa in considerazione l'amamelitannina, un composto fenolico, componente attivo naturale di amamelide, che ha dimostrato di essere un inibitore del QS, interferendo con la patogenesi stafilococcica inibendo i meccanismi molecolari chiave responsabili della risposta allo stress batterico, della produzione di tossine e della formazione di biofilm. In presenza di hamamelitannin, gli stafilococchi diventano così più vulnerabili ai meccanismi di difesa dell'ospite e agli antibiotici, rendendo più facile il trattamento delle infezioni bat-

teriche con antibiotici o germicidi comunemente usati. Le specie che formano i biofilm, come la *S. epidermidis* e la *S. aureus* produttrice di tossine, sono notoriamente difficili da trattare con antibiotici in quanto facilitano la loro persistenza nell'ospite, sfuggono alle difese dell'ospite e consentono la sopravvivenza batterica anche ad alte concentrazioni di antimicrobici.

In questo studio si è associato a tettarella contenente iodio, utilizzate prima e dopo la mungitura per prevenire le infezioni, l'estratto di amamelide che contiene alti livelli di hamamelitannin (HAMA), a causa delle sue note proprietà anti-biofilm. L'estratto di amamelide utilizzato (whISOBAX, StaphOff Biotech Inc) (WH) contiene 50 mg / mL di peso secco totale (il 35% è dovuto a HAMA) e un contenuto fenolico totale di 12,66 mg / mL di equivalente di acido gallico GAE (76% di quello è dovuto a HAMA). I risultati hanno mostrato che WH è efficace contro i biofilm preformati e impedisce alle cellule aderenti di crescere ulteriormente, ha quindi inibito la patogenesi stafilococcica (formazione di biofilm e produzione di tossine) interferendo con le risposte allo stress e la regolazione genica basata sul quorum sensing, portando a un collasso del biofilm. I batteri possono quindi essere presi di mira più facilmente dal sistema immunitario dell'ospite e / o dagli antibiotici, portando a tassi ridotti di infezione.

SCOPO DELLA TESI

Considerata la letteratura fin qui esposta, possiamo affermare che l'estratto di Witch Hazel (WH) ha dimostrato avere molte proprietà nel trattamento farmacologico. Quello che ci siamo proposti nell'ambito di questa tesi è di andare a verificare se oltre ad avere le proprietà già scoperte (antivirale, antitumorale, antinfiammatoria, ...) abbia anche attività antimicrobiche nei confronti di un pannello di microorganismi comuni a livello clinico.

Una volta confermata tale attività, andare a valutare se grazie alla combinazione con antibiotici si possano ottenere effetti sinergici.

MATERIALI E METODI

Ceppi batterici

Per questo studio sono stati utilizzati batteri Gram positivi:

- *Staphylococcus epidermidis* RP62A
- *Staphylococcus aureus* ATCC 43300
- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- *Enterococcus faecium* 64/3
- *Streptococcus agalactiae* 1357
- *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619

e Gram negativi:

- *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Escherichia coli* ATCC 25922

Farmaci

In associazioni all'estratto di WH si è utilizzato Rifampicina, Cloramfenicolo, Levofloxacina, Colistina, Meropenem e Amikacina per quel che riguarda *E. coli*; Rifampicina, Levofloxacina, Amikacina, Cloramfenicolo, Vancomicina e Linezolid per lo *S. aureus*.

Le soluzioni vengono create lo stesso giorno del test o possono essere conservate per brevi periodi, al buio, a una temperatura di -80 °C.

Determinazione della sensibilità

La sensibilità dei ceppi agli antibiotici è stata valutata mediante la determinazione delle concentrazioni minime inibenti (MIC) eseguendo microdiluizioni in brodo secondo le procedure indicate dal Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) e dall'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

Viene utilizzata una piastra microtitre, con 12 colonne (numerate da 1 a 12) e 8 righe (da A a H).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Si procede siglando sulla base, non sul coperchio per evitare possibili errori, il tipo di antibiotico da testare. Utilizzando una pipetta multicanale vengono prelevati 50µL di brodo Mueller-Hinton (MHB) che verrà inoculato in tutti i pozzetti, ad eccezione della colonna 1. In questa fase è importante controllare che il volume aspirato dalla multicanale sia omogeneo e privo di bolle d'aria.

L'antibiotico viene fornito ad una concentrazione di 10000 µg/mL e le concentrazioni che ci interessa saggiare (in µg/mL) sono:

256 – 128 – 64 – 32 – 16 – 8 – 4 – 2 – 1 – 0,5 – 0,25.

Per terminare con l'ultima colonna che costituisce il controllo positivo, controllo di crescita (C+) e che, in quanto tale, non deve contenere l'antibiotico.

Viene preparata una soluzione dell'antibiotico in esame ad una concentrazione doppia (512 µg/mL) rispetto alla massima che si vuole saggiare (256 µg/mL) procedendo alla diluizione della soluzione madre in brodo.

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

Per conoscere il volume da prelevare (mL) si moltiplica la concentrazione finale (µg/mL) per il volume finale (mL), diviso per la concentrazione della soluzione madre (µg/mL):

$$V1 = \frac{C2 \cdot V2}{C1}$$

Il volume così ottenuto è il volume che è necessario prelevare dalla soluzione madre per inocularlo nella provetta contenente 2mL di brodo, in modo che la concentrazione finale sia di 512 µg/mL.

Ai pozzetti contenenti 50 µL di brodo vengono aggiunti 50 µL della soluzione di antibiotico appena preparata nelle colonne 1 e 2.

A questo punto si procede con la diluizione scalare in micropiastra, con la micropipetta multicanale si mescola il contenuto presente nella colonna 2, vengono prelevati 50 µL per passarli nella colonna 3. Si procede così fino alla colonna 11, gli ultimi 50 µL vengono scartati, perché la colonna 12 deve mantenersi priva di farmaco per fungere da controllo di crescita e quindi preparata solamente con il ceppo batterico.

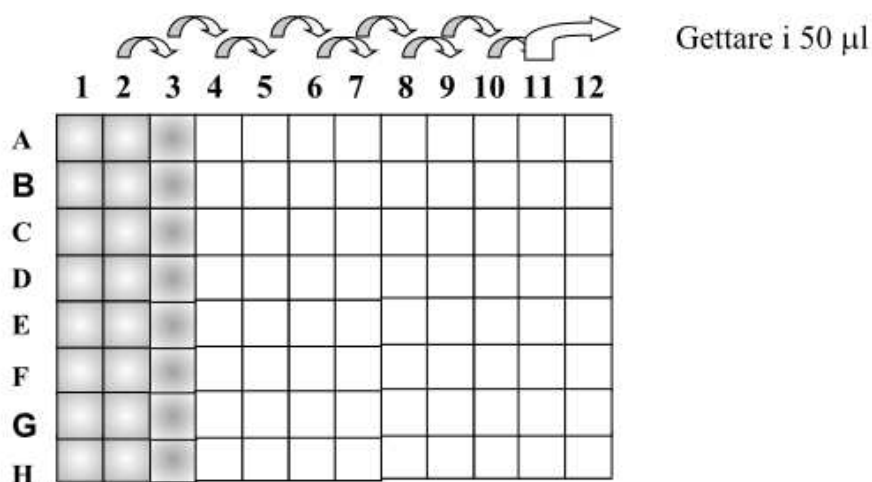


Figura 3: Diluizione su micropiastra

Al termine della procedura, tutte le colonne contengono una concentrazione doppia rispetto a quella che vogliamo saggiare e un volume di 50 µL. La concentrazione di antibiotico desiderata verrà raggiunta nel momento in cui verranno aggiunti 50 µL di inoculo batterico standardizzato.

La sospensione batterica da dispensare deve possedere una concentrazione di 1×10^6 UFC/mL, per questo è importante eseguire una misurazione della torbidità allo spettrofotometro (assorbanza o densità ottica).

Viene eseguita una lettura iniziale che riguarda solo il brodo, questa rappresenterà il bianco, misurando l'assorbanza del brodo e azzerando quindi lo strumento. In seguito viene

aggiunta una data quantità di battere prelevato dal terreno di coltura, si preleva 1 mL della brodocultura diluita che verrà valutata attraverso lo spettrofotometro, misurando la densità ottica.

Un valore di OD₆₂₅ di 0,100 corrisponde a 1×10^8 UFC/mL. Se l'assorbanza del campione risultasse il valore richiesto si procede con la diluizione della sospensione utilizzando brodo sterile, nel caso contrario si aggiunge brodo o campione batterico fino ad arrivare la concentrazione richiesta.

Una volta raggiunta si procede con la diluizione della sospensione (1:100), mescolando 50 µL della sospensione batterica con 5 mL di brodo, in questo modo la concentrazione finale del battere è pari a 1×10^6 CFU/mL. Ad ognuna delle righe orizzontali corrisponde un ceppo batterico, in ogni pozzetto vengono depositati 50 µL di brodocultura raggiungendo una concentrazione finale di 5×10^5 CFU/mL.

A questo punto la piastra può essere incubata ad una temperatura di 37 °C per 18-24 ore. Trascorso questo tempo si potrà procedere con la lettura dei risultati, si determina per ogni campione la più bassa concentrazione di antibiotico alla quale non si osserva crescita visibile, questa rappresenta la MIC.

Checkerboard

L'interazione tra WH e gli antibiotici è stata studiata con il metodo “checkerboard titration” utilizzando piastre per microtitoli al polipropilene multipozzetti con brodo MHB. In tutti i pozzetti sono stati versati 50µl di brodo.

Nella prima colonna si trova la MIC degli antibiotici da solo e nell'ultima riga si trova il WH da solo. Nella prima riga sono stati distribuiti 50 µl del WH a una concentrazione quadrupla alla massima da saggiare, ad eccezione dell'ultimo pozzetto in cui la concentrazione è 8 volte superiore. A questo punto può essere eseguita una diluizione scalare dalla prima riga alla penultima, lasciando l'ultima riga come controllo per il secondo farmaco.

È stato eseguito lo stesso procedimento con l'antibiotico (Rifampicina, Levofloxacin, Amikacin,...) , posto nell'ultima colonna della piastra ad una concentrazione 4X, è stata effettuata anche in questo caso una diluizione scalare a partire dall'ultima colonna fino alla seconda. In questo modo la prima colonna funge da controllo per il primo farmaco, mentre l'ultima riga per il secondo.

Infine, sono stati versati 50 µl di inoculo batterico in tutti i pozzetti, ad una concentrazione di 1×10^6 UFC/ml. La piastra viene quindi incubata per 18-24 ore a 37°C.

Dopo l'incubazione, all'osservazione è possibile valutare nella prima colonna la MIC del primo antibiotico, nell'ultima riga la MIC del WH, e nell'ultimo pozzetto dell'ultima riga il controllo di crescita positivo del ceppo.

A questo punto può essere calcolata la FICI (Indice di Concentrazione Inibitoria Frazionata) sommando la FIC dei due farmaci (Concentrazione di Inibizione Frazionata):

$$FICI = \frac{MIC(A, B)}{MICA} + \frac{MIC(B, A)}{MICB}$$

Il valore FICI viene interpretato come di seguito:

- se <0,5 parliamo di sinergia
- se compreso tra 0,5 e 1,0 parliamo di additività
- se compreso tra 1,0 e 4,0 parliamo di indifferenza
- se > 4,0 parliamo di antagonismo

RISULTATI

MIC del WH

Per saggiare le proprietà antimicrobiche del WH, è stata determinata la MIC del WH nei confronti dei più comuni batteri Gram positivi (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*) e Gram negativi (*Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) responsabili di infezioni. I batteri sono stati esposti a concentrazioni crescenti di WH e le MIC sono state determinate mediante microdiluizioni in brodo. Nella Tabella 1 si possono osservare i risultati dei test di sensibilità delle specie batteriche al WH; la MIC è espressa sia in µg/mL che in diluizione dall'estratto iniziale. I germi più sensibili sono risultati essere gli stafilococchi e gli enterococchi, con MIC che andavano dai 19 ai 52 µg/mL.

Bacteria	MIC Mean (µg/mL)	MIC Range (µg/mL) *	Mean Dilutions of WH (50 mg/mL) that Inhibit Growth
Gram Positives			
<i>S. epidermidis</i> RP62A	26	26	1/1920
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	45	26–78	1/1120
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	104	104	1/460
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	45	39–52	1/1120
<i>E. faecium</i> 64/3	34	19–52	1/1000
<i>S. agalactiae</i> 1357	3958	1250–6667	1/23
<i>S. pneumoniae</i> ATCC49619	4583	2500–6667	1/13
Gram Negatives			
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	182	156–208	1/280
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	572	312–833	1/110
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	2916	1667–5000	1/30
<i>E. coli</i> ATCC25922	3657	1250–10,000	1/25

Tabella 1 Concentrazioni minime inibenti (MIC) di WH e rispettivi fattori di diluizione contro vari batteri. * L'intervallo MIC rappresenta i valori MIC minimo e massimo ottenuti nelle diverse ripetizioni.

Combinazione WH e antibiotici

Ai fini di valutare come il WH agisca in combinazione ad antibiotici di comune utilizzo clinico sono stati considerati i ceppi batterici *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Sono state fatte 6 combinazioni ciascuno, utilizzando gli antibiotici comunemente usati in pratica clinica. I risultati sono rappresentati tramite tabelle che

simulano le piastre multipozzeto. Le caselle verdi indicano i pozzetti in cui era osservabile una crescita mentre le caselle rosse identificano la mancanza di crescita. Le concentrazioni di WH sono espresse come diluizione dall'estratto iniziale mentre la concentrazione di antibiotici è espressa in $\mu\text{g/mL}$.

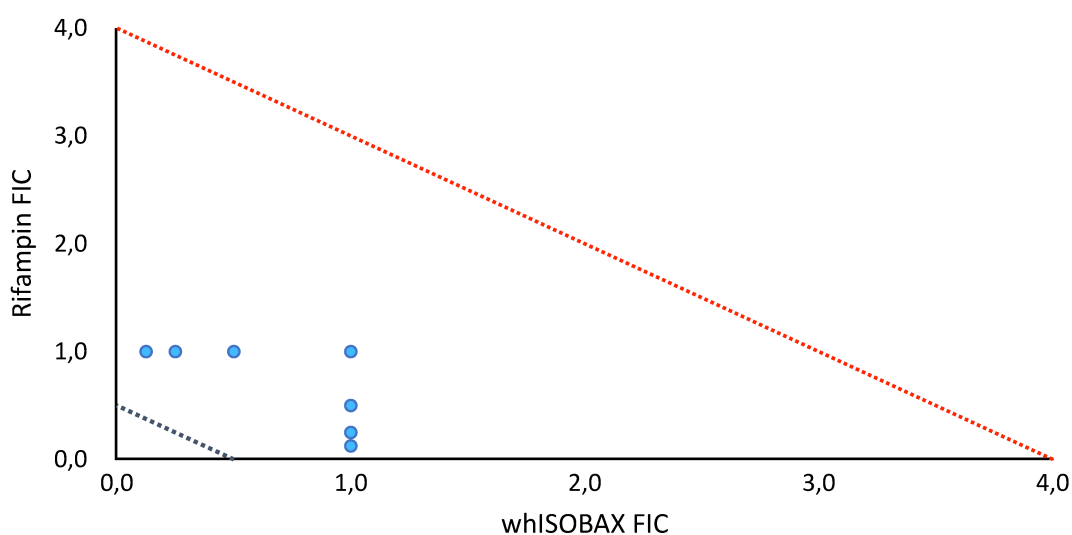
Per ogni combinazione è stata calcolata sia la FIC relativa a WH e antibiotici, che la FICI risultante della combinazione delle due FIC. Negli isobologrammi (grafici di dispersione) la FIC del WH è riportata sull'asse delle x, mentre la FIC degli antibiotici sull'asse delle y. La linea nera tratteggiata rappresenta il valore di $\text{FICI}=0.5$ al di sotto del quale si può considerare una combinazione sinergica, mentre la linea tratteggiata rossa rappresenta il valore di $\text{FICI}=4$, al di sopra del quale la combinazione è antagonista.

Associazioni contro *Escherichia coli* ATCC 25922

I risultati della combinazione tra WH e antibiotici nei confronti di *E. coli* ATCC 25922 ha mostrato che molte combinazioni risultavano antagoniste. Questa particolare situazione potrebbe essere dovuta all'elevata concentrazione di WH necessaria per avere un effetto antimicrobico nei confronti di *E. coli*.

WH (colonne) + Rifampicina (righe)

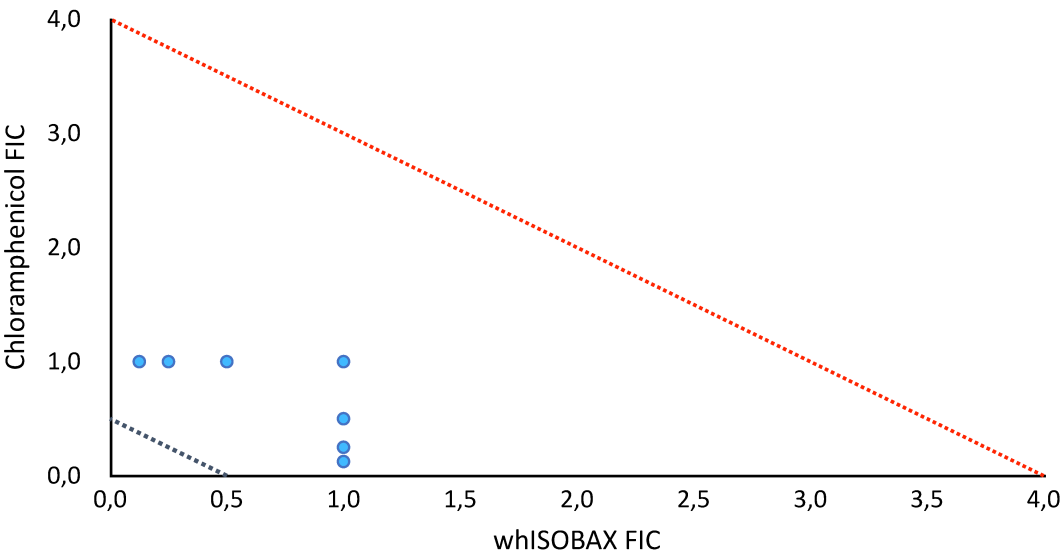
	C+	1/3840	1/1920	1/960	1/480	1/240	01/160	1/80	1/40	1/20	1/10	1/5
16												
8												
4												
2												
1												
0.5												
0.25												
C+												



L'associazione di Rifampicina e WH è risultata avere valori della FICI compresi tra 1 e 2, evidenziando un rapporto di indifferenza fra le due molecole.

WH (colonne) + Cloramfenicolo (righe)

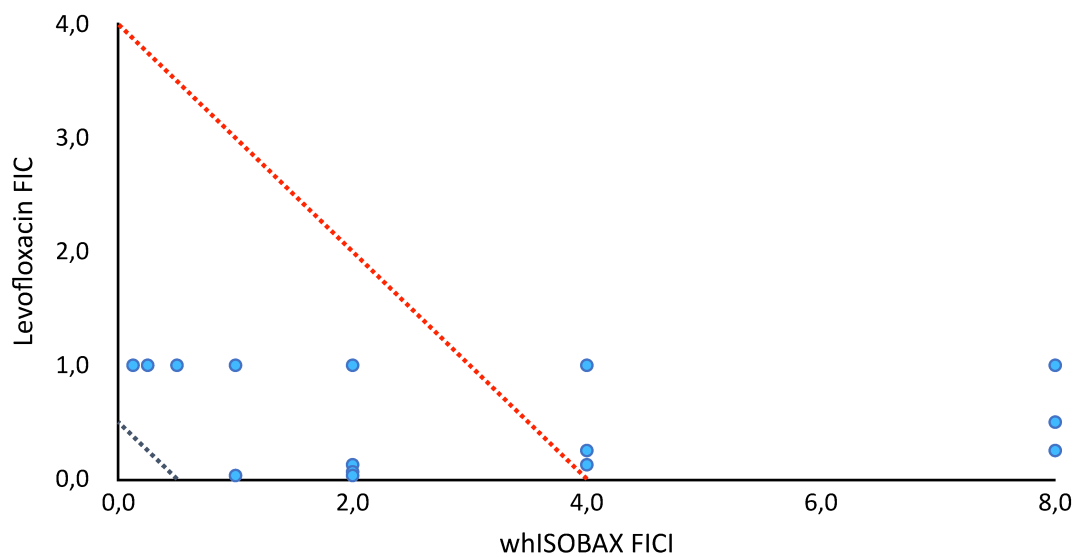
	C+	1/3840	1/1920	1/960	1/480	1/240	01/160	1/80	1/40	1/20	1/10	1/5
8												
4												
2												
1												
0.5												
0.25												
0.12												
C+												



Chekerboard e isobologramma mostrano un rapporto di indifferenza nell'associazione di Cloramfenicolo e WH contro l'*E. coli*.

WH (colonne) + Levofloxacina (righe)

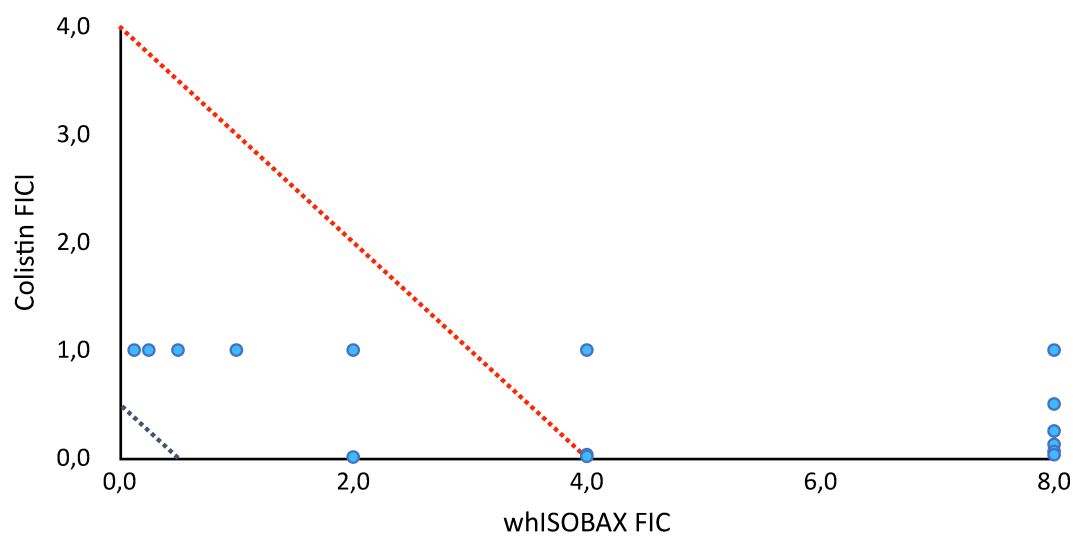
	C+	1/3840	1/1920	1/960	1/480	1/240	01/160	1/80	1/40	1/20	1/10	1/5
0.016												
0.008												
0.004												
0.002												
0.001												
0.0005												
0.00025												
C+												



La combinazione di levofloxacina e WH raggiunge valori di FICI risultanti in un antagonismo, superiori a 4.

WH (colonne) + Colistina (righe)

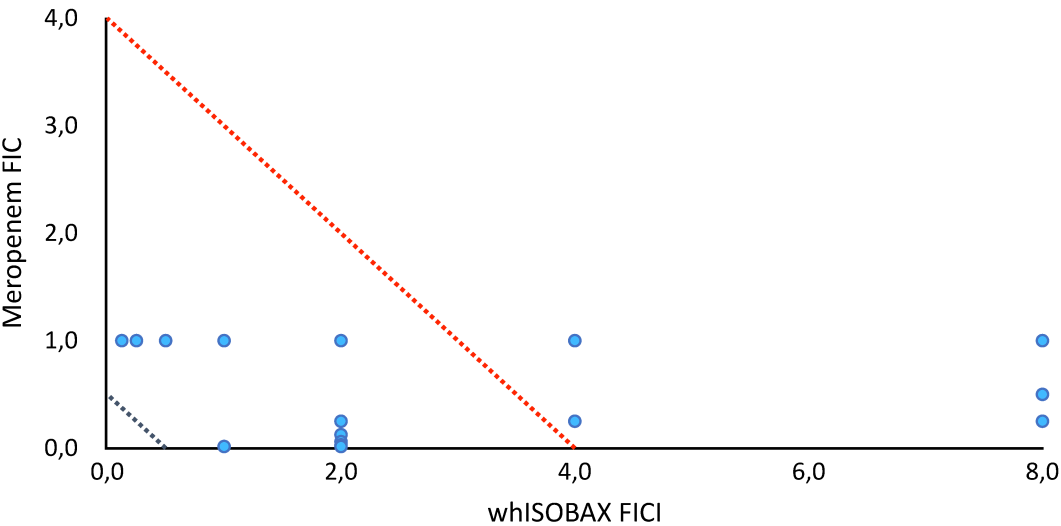
	C+	1/3840	1/1920	1/960	1/480	1/240	01/160	1/80	1/40	1/20	1/10	1/5
2												
1												
0.5												
0.25												
0.12												
0.06												
0.03												
C+												



Anche dall'associazione di Colistina e WH si ottengono valori di FICI superiori a 4, quindi anche in questo caso abbiamo un'interazione antagonistica.

WH (colonne) + Meropenem (righe)

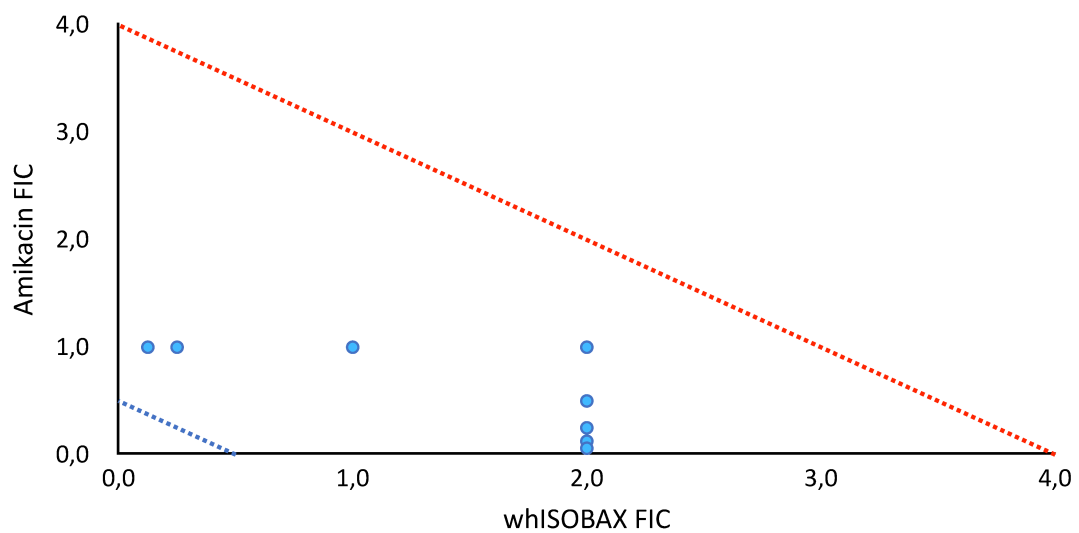
	C+	1/3840	1/1920	1/960	1/480	1/240	01/160	1/80	1/40	1/20	1/10	1/5
0.06												
0.03												
0.016												
0.008												
0.004												
0.002												
0.001												
C+												



Meropenem e WH mostrano valori di FICI superiori a 4, denotando un'interazione antagonistica.

WH (colonne) + Amikacina (righe)

	C+	1/3840	1/1920	1/960	1/480	1/240	01/160	1/80	1/40	1/20	1/10	1/5
0.016												
0.008												
0.004												
0.002												
0.001												
0.0005												
0.00025												
C+												



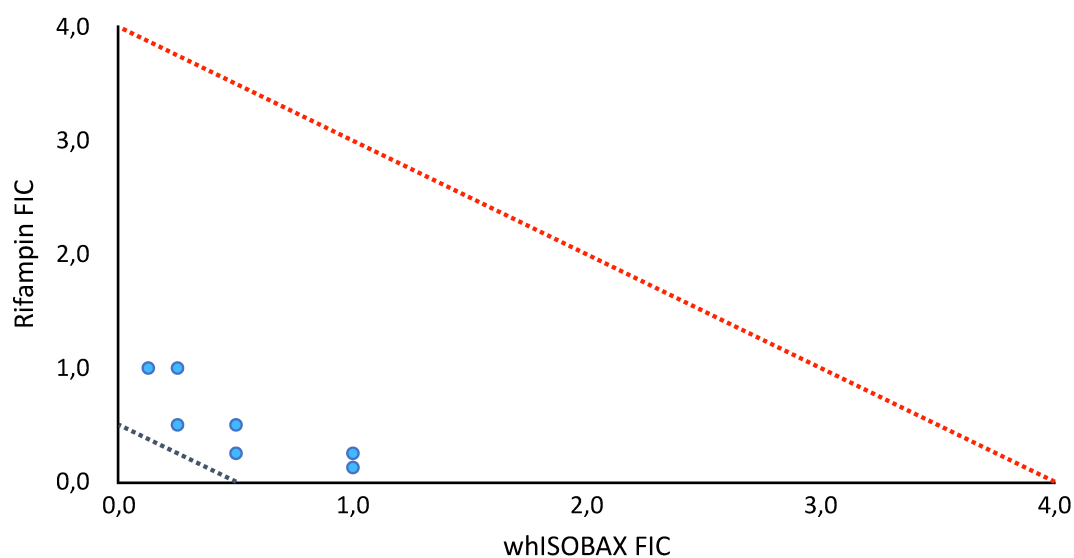
Amikacina e WH mostrano valori di FICI compresi tra 1 e 3, denotando un'indifferenza fra le due molecole.

Associazioni contro *S. aureus* ATCC 29213

Nelle associazioni per *S. aureus* tutte le FICI calcolate mostravano valori inferiori a 4, quindi nessun antagonismo. Ben 2 combinazioni risultavano essere sinergiche (con Linezolid e Cloramfenicolo), mentre tutte le altre mostravano additività o indifferenza.

WH (colonne) + Rifampicina (righe)

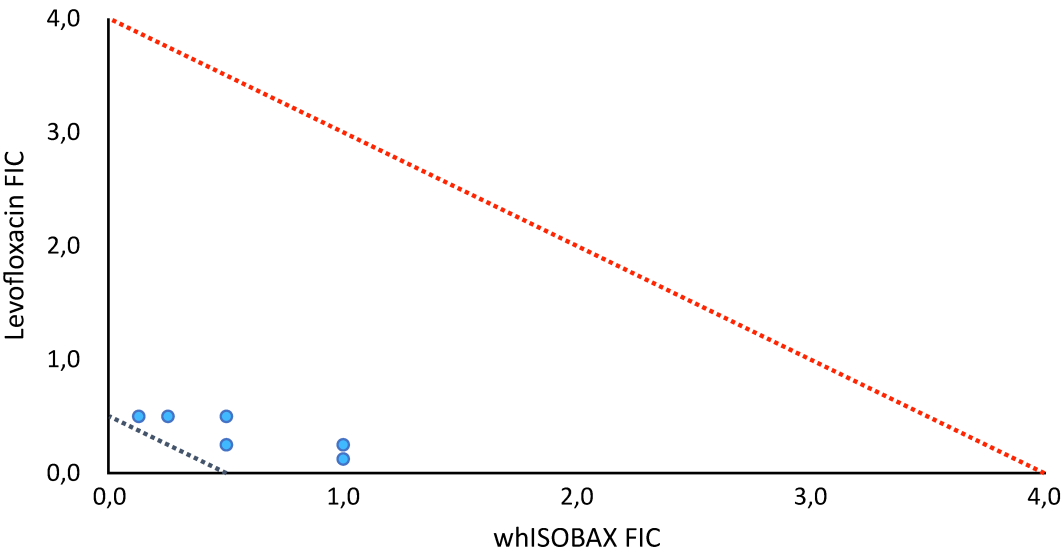
	C+	1/61440	1/30720	1/15360	01/7860	1/3840	1/1920	1/960	1/480	1/240
0.016										
0.008										
0.004										
0.002										
0.001										
0.0005										
0.00025										
C+										



Nell'associazione di WH e Rifampicina per *S. aureus* i valori delle FICI sono compresi fra 0,5 e 1, con una interazione di tipo additivo.

WH (colonne) + Levofloxacin (righe)

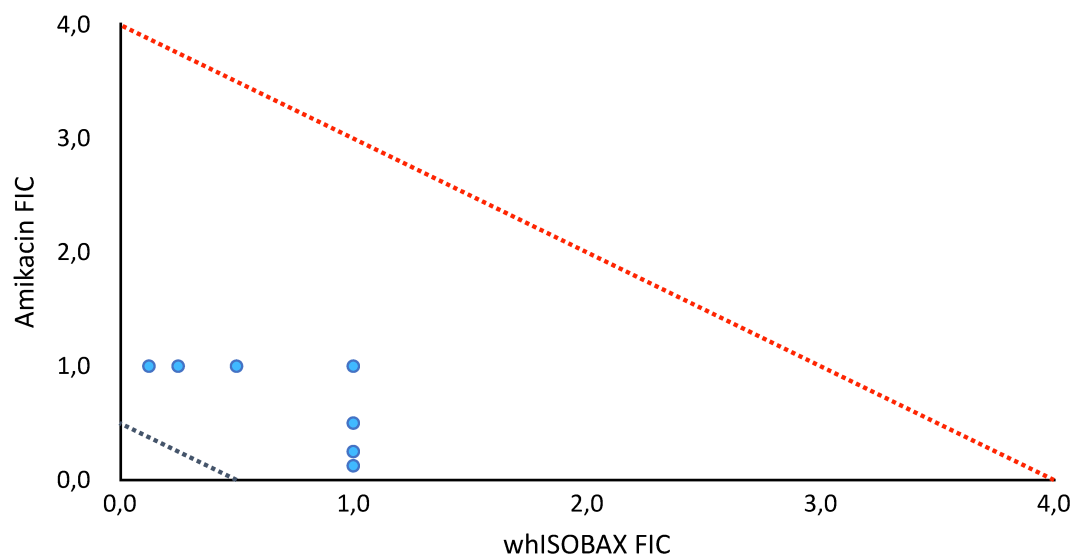
	C+	1/61440	1/30720	1/15360	01/7860	1/3840	1/1920	1/960	1/480	1/240
0.5										
0.25										
0.12										
0.06										
0.03										
0.015										
0.008										
C+										



Anche con Levofloxacin e WH hanno mostrato interazioni additive, con valori di FICI tra 0,625 e 1,5.

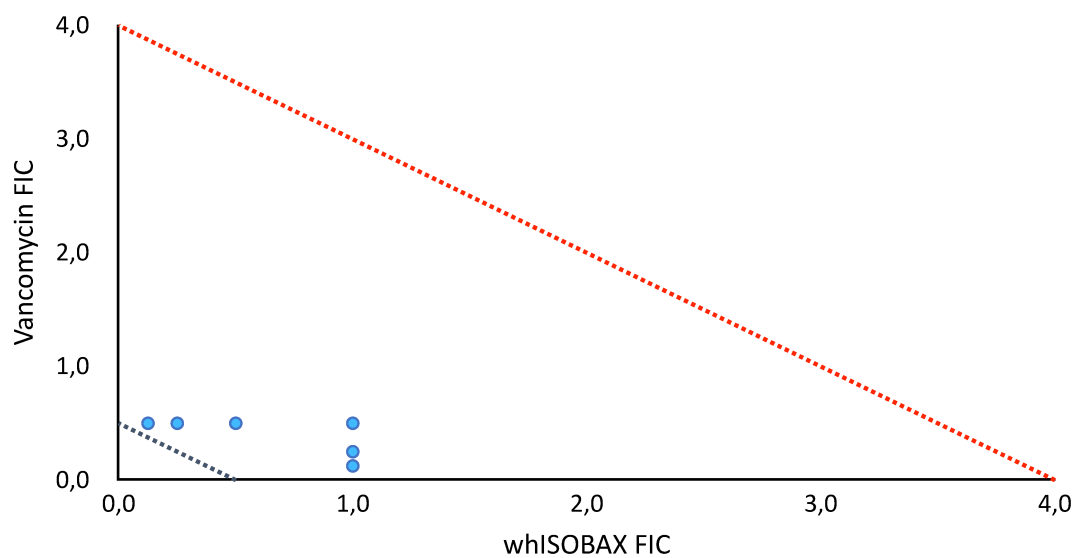
WH (colonne) + Amikacina (righe)

	C+	1/61440	1/30720	1/15360	01/7860	1/3840	1/1920	1/960	1/480	1/240
0.016										
0.008										
0.004										
0.002										
0.001										
0.0005										
0.00025										
C+										



Nel caso dell'associazione di Amikacina e WH contro lo *S. aureus*, così come per l'*E. coli*, il rapporto è di indifferenza.

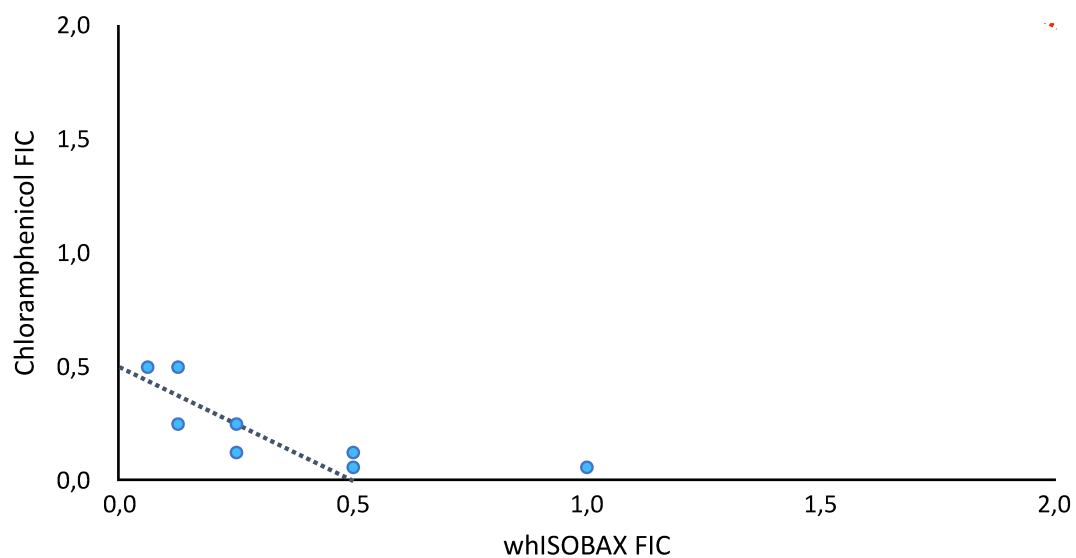
WH (colonne) + Vancomicina (righe)

[illegible]

L'analisi dell'isobologramma e del checkerboard mostrano un rapporto di indifferenza fra Vancomicina e WH.

WH (colonne) + Cloramfenicolo (righe)

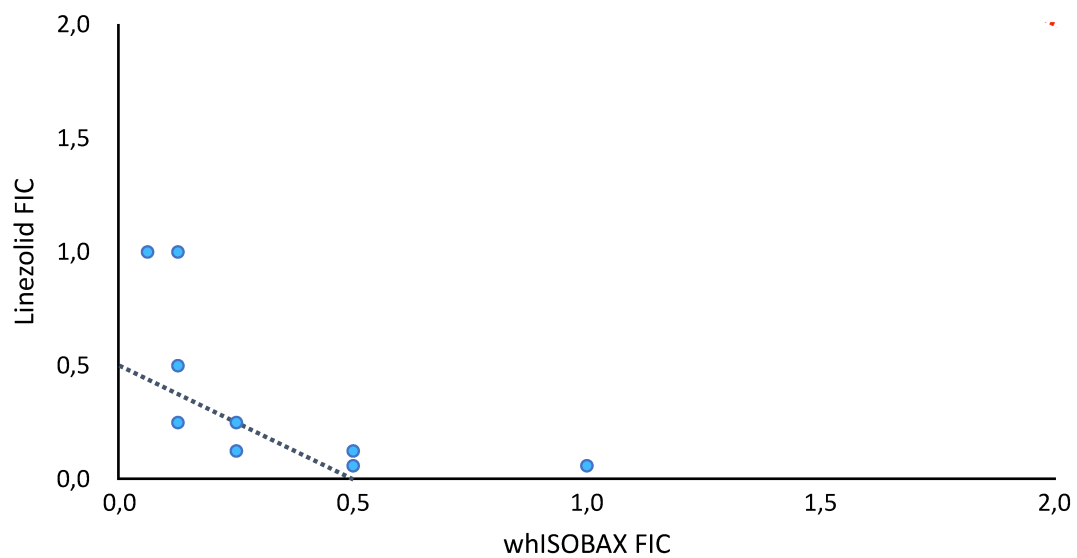
	C+	1/61440	1/30720	1/15360	01/7860	1/3840	1/1920	1/960	1/480	1/240
16										
8										
4										
2										
1										
0.5										
0.25										
C+										



L'associazione di Cloramfenicolo e WH per lo *S. aureus* è risultata sinergica. Diverse combinazioni hanno mostrato valori di FICI $\leq 0,5$.

WH (colonne) + Linezolid (righe)

	C+	1/61440	1/30720	1/15360	01/7860	1/3840	1/1920	1/960	1/480	1/240
4										
2										
1										
0.5										
0.25										
0.12										
0.06										
C+										



Anche l'associazione di Linezolid e WH è sinergica, anche in questo caso diverse combinazioni mostravano $FICI \leq 0,5$.

DISCUSSIONE

Il numero di agenti antimicrobici che possono essere utilizzati per trattare le infezioni batteriche si sta riducendo con il costante aumento della resistenza antimicrobica. Sono necessarie nuove strategie di sviluppo di farmaci per combattere la resistenza antimicrobica. Questo studio è finalizzato alla valutazione di due di queste nuove strategie: l'utilizzo di composti naturali come farmaci antimicrobici e il trattamento delle infezioni con combinazioni di farmaci (anche di provenienza naturale) piuttosto che con singoli farmaci.

Le terapie di combinazioni permettono un ampliamento dello spettro antibatterico, e garantiscono una maggiore efficacia; permettono di trattare infezioni polimicrobiche che richiedono più di un antibiotico per coprire tutti i patogeni batterici; nel caso di utilizzo di combinazioni di farmaci con attività sinergica, l'effetto combinato di due agenti sarà maggiore della somma delle loro singole attività; (41) inoltre i costi e le tempistiche di sviluppo di nuovi antibiotici sono lunghe, mentre le terapie di combinazione permettono di fornire con una tempistica ridotta opzioni di trattamento convenienti. Considerati tutti questi vantaggi e la facilità di reperire nuove molecole dalla natura, il lavoro di tesi si è concentrato sulla valutazione a questo scopo l'uso di estratti vegetali o composti naturali puri in combinazione con antibiotici convenzionali. (43)

In letteratura sono state trovate numerose combinazioni con estratti naturali sinergiche. L'esempio più noto di sinergia antibiotica è la combinazione di acido clavulanico (un inibitore degli enzimi β -lattamasi derivato da funghi) con antibiotici β -lattamici (43) (44): in questo caso i due farmaci lavorano in combinazione, con la prima molecola utilizzata per bloccare quegli enzimi che possono inattivare gli antibiotici β -lattamici. Altro esempio è la pianta endemica siciliana *Berberis aetnensis* C. Presl. che interagisce sinergicamente con ciprofloxacina: gli estratti di cloroformio derivati dalle foglie di *B. aetnensis* riducono significativamente la MIC della ciprofloxacina contro *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. (45) Una combinazione di antibiotici ed estratti di chiodi di garofano, jambolan, melograno e timo ha dimostrato una significativa attività sinergica contro un ceppo multi-resistente di *P. aeruginosa*. (45) (48) Allo stesso modo, è stata osservata una maggiore attività antimicrobica in combinazioni di chiodi di garofano-ampicillina e chiodi di garofano-tetraciclina contro *K. pneumoniae* e *Proteus spp.* rispettivamente. (43) Gli estratti di *Mezoneuron benthamianum* Baill. e *Securinega virosa* (Roxb.) Baill. agiscono come inibitori della pompa di efflusso (EPI) per fluorochinoloni, tetraciclina ed eritromicina nei ceppi meticillino-resistenti di *S. aureus* (MRSA). (46)

Le piante sintetizzano una vasta gamma di metaboliti secondari noti per essere coinvolti nei meccanismi di difesa e alcune di queste molecole hanno proprietà antimicrobiche. (42) La corteccia di amamelide (*Hamamelis virginiana*) contiene alti livelli di composti fenolici come l'amamelitannina (HAMA, 2 ", 5-di-O-galloil-d-hamamelose), che è un tannino a basso peso molecolare. HAMA ha dimostrato di agire come inibitore del quorum sensing

negli stafilococchi, inibendo la virulenza batterica (produzione di tossine e formazione di biofilm) (47), per queste sue qualità è stata selezionata per utilizzarla in associazione ad antibiotici convenzionali.

Dai risultati dello studio possiamo evincere che vi è sinergismo tra l'estratto di WH e alcuni degli antibiotici utilizzati. Già dai risultati iniziali delle MIC si è potuto osservare come l'estratto di WH inibisca la crescita sia dei Gram-positivi che dei Gram-negativi, in particolare degli Stafilococchi ed Enterococchi per i positivi; *Acinetobacter*, *Klebsiella* ed *Escherichia* per i negativi. L'attività di questo estratto varia in maniera molto grande a seconda della specie batterica verso cui è diretta. WH è molto efficace nei confronti dei Gram-positivi dei generi *Staphylococcus* e *Streptococcus*, mentre è meno efficace nei confronti degli streptococchi: questa differenza potrebbe essere dovuta anche alla metodica utilizzata nei test. Per gli streptococchi infatti, la MIC viene eseguita in presenza di sangue lisato, che potrebbe interferire con l'attività antibatterica dell'estratto di ammamelide.

Considerate le MIC, si sono valutate le associazioni per *S. aureus* ed *E. coli*. Questi due ceppi rappresentano due delle specie maggiormente coinvolte nelle infezioni ospedaliere e sono state inserite dal WHO nelle specie per le quali la ricerca di nuovi antibiotici è prioritaria (https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1). L'estratto WH ha mostrato una buona attività nei confronti di *S. aureus* e nel caso di combinazioni con antibiotici anche relazioni sinergiche. Le combinazioni risultate sinergiche sono Cloramfenicolo-WH e Linezolid-WH, come si può apprezzare dai rispettivi isobologrammi basati sui checkerboard. Si può affermare che l'associazione con l'estratto di WH incrementa l'attività antibiotica di Cloramfenicolo e Linezolid. La sinergia tra Cloramfenicolo e composti naturali è stata ampiamente dimostrata anche in altri lavori (49) (50), suggerendo che il cloramfenicolo, pur se non molto utilizzato in pratica clinica, ha proprietà sinergiche con molte molecole di origine naturale. Allo stesso modo, anche per il Linezolid sono state descritte associazioni sinergiche quando usato in combinazione con altri composti naturali (51).

Nel caso invece dell'*E. coli*, l'utilizzo del WH in combinazione con antibiotici di uso clinico non ha prodotto interazioni di tipo sinergico. Questa mancanza di sinergia potrebbe essere spiegata dalla natura intrinsecamente resistente dell'*E. coli*. I risultati di MIC dimostrano che il WH non ha un'elevata attività nei confronti di questa specie: sono infatti necessarie dosi abbastanza elevate dell'estratto affinché questo eserciti un'azione antibatterica. Queste dosi elevate potrebbero interferire con l'attività dei comuni antibiotici, andando a inibire l'azione dell'antibiotico stesso e a generare una combinazione di tipo antagonistico, come successo nel caso delle combinazioni con meropenem, colistina e levofloxacina.

In conclusione il WH rappresenta un estratto naturale con una buona attività antibiotica. Pur presentando anche interazioni sinergiche con differenti antibiotici nei confronti di *S. aureus*, lo studio ha rilevato anche antagonismi nei confronti di *E. coli*. Ulteriori studi sono

necessari per determinare l'effettivo comportamento di questo estratto quando combinato con antibiotici, i meccanismi molecolari e le singole molecole coinvolte nell'attività antibatterica e l'efficacia nei confronti di germi MDR.

Tenuto conto delle limitazioni dello studio e delle problematiche emerse, il WH rappresenta comunque un estratto dalla promettente attività antibatterica, con caratteristiche che meritano di essere approfondite con ulteriori studi.

BIBLIOGRAFIA

1. **Antibiotics and antibiotic resistance** - Ola Skořld, M.D., Ph.D. Wiley 2011
2. **The changing epidemiology of resistance** - Peter M. Hawkey and Annie M. Jones
Health Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2009) 64, Suppl. 1, i3–i10
3. **The Antibiotic Resistance Crisis Part 1: Causes and Threats** - C. Lee Ventola, MS.
Vol. 40 No. 4 • April 2015 • P&T®
4. **Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis-** Review Bilal Aslam, wei wang, Muhammad Imran Arshad, Mohsin Khurshid, Saima Muzammil, Muhammad Hidayat Rasool, Muhammad Atif Nisar, Ruman Farooq Alvi, Muhammad Aamir Aslam, Muhammad Usman Qamar, Muhammad Khalid Farooq Salamat, Zulqarnain Baloch . Infect Drug Resist. 2018; 11: 1645–1658.
5. **Basic & Clinical Pharmacology**, Fourteenth Edition - Edited by Bertram G. Katzung - McGraw-Hill Education.
6. **Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance**. WHO Geneva, 2014,
7. **Principi di microbiologia medica** 14 edizione - Michele La Placa, Edises
8. **Enciclopedia medica italiana**. terzo aggiornamento della seconda edizione , Volume 2- editore Luciano Vella, USES Edizioni Scientifiche
9. **Antibiotics, Targets, Mechanisms and Resistance** - Claudio O. Gualerzi, Letizia Brandi, Attilio Fabbretti, Cynthia L. Pon - Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
10. **Patogeni emergenti e resistenze batteriche** - Daniela L. Rocca, Barbara Repetto, Anna Marchese, Eugenio A. Debbia - Caleidoscopio Italia, Medical system Spa 183
11. **Microbiologia Medica: Batteriologia e Virologia** - Maria Pia Conte, Paola Mastro-marino, società editrice Esculapio
12. **Elementi di microbiologia** Di G. J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case. Edizione italiana a cura di Salvatore Massa - Pearson Benjamin Cummings
13. **Farmacognosia Botanica, chimica e farmacologia delle piante medicinali**. Seconda edizione. Francesco Capasso. In collaborazione con Rita De Pasquale e Giuliano Grاندolini- Springer
14. **Terapie complementari e alternative in gravidanza: uno studio clinico**. L. Ciuffreda Tesi di Dottorato di ricerca in Scienze e tecnologie biomediche, Foggia

15. **New Perspectives on the Use of Phytochemicals as an Emergent Strategy to Control Bacterial Infections Including Biofilms**, Review - Anabela Borges, Ana Cristina Abreu, Carla Dias, Maria José Saavedra, Fernanda Borges and Manuel Simões,- *Molecules*. 2016 Jul; 21(7): 877.
16. **The Antibiotic Resistance Crisis Part 2: Management Strategies and New Agents**. C. Lee Ventola, MS- P T. 2015 May; 40(5): 344–352.
17. **Something old, something new: revisiting natural products in antibiotic drug discovery**. Gerard D. Wright. - *Canadian Journal of Microbiology*, 2014, 60(3): 147-154,
18. **Antimicrobial activity of some medicinal plant extracts against bacteria causing diarrhea**. Naomi Tope Komolafe . Master of science, university of South Africa ,Supervisor: Dr MA Nyila Co-supervisors: Dr FT Tabit , Dr TE Tshikalange . 2014
19. **Essential Oils, A New Horizon in Combating Bacterial Antibiotic Resistance**. Polly Soo Xi Yap, Beow Chin Yiap,Hu Cai Ping, and Swee Hua Erin Lim.*Open Microbiol J*. 2014; 8: 6–14.
20. **Middle Eastern Plant Extracts: An Alternative to Modern Medicine Problems**. Disha Varijakzhan, Chou-Min Chong,Aisha Abushelaibi, Kok-Song Lai, and Swee-Hua Erin Lim. *Molecules*. 2020 Mar; 25(5): 1126.
21. **Screening of antibiotic resistant inhibitors from local plant materials against two different strains of Staphylococcus aureus**. Darwish,R.M.;Aburjai,T.;Al-Khalil,S.;Mahafzah,A. J. *Ethnopharmacol*. 2002, 79, 359–364.
22. **In vitro efficacy of bioactive extracts of 15 medicinal plants against ESβL-producing multidrug-resistant enteric bacteria** Ahmad, I.; Aqil, F. - *Microbiol. Res*. 2007, 162, 264–275.
23. **Natural products as antimicrobial agents** . Rabin Gyawali, Salam A. Ibrahim. *Elsevier Food Control* 46 (2014) 412 e 429
24. **Tannins: Prospectives and Actual Industrial Applications**. Antonio Pizzi. *Biomolecules*. 2019 Aug; 9(8): 344.
25. **Encyclopaedia Britannica**. Michele Metych,
26. **Phytopharmacy an evidence-based guide to herbal medicinal products**. Sarah E Edwards, Inês da Costa Rocha, Elizabeth M. Williamson, Michael Heinrich (2015) Wiley Blackwell

27. **Anti-inflammatory activity of hamamelis distillate applied topically to the skin. Influence of vehicle and dose.** Korting HC, Schäfer-Korting M, Hart H, Laux P, Schmid M. (1993) *European Journal of Clinical Pharmacology* 44(4): 315–318.
28. **Comparative efficacy of hamamelis distillate and hydrocortisone cream in atopic eczema.** Korting HC, Schäfer-Korting M, Klövekorn W, Klövekorn G, Martin C, Laux P. (1995) *European Journal of Clinical Pharmacology* 48(6): 461–465.
29. **Anti-inflammatory effect of hamamelis lotion in a UVB erythema test.** Hughes-Formella BJ, Bohnsack K, Rippke F, Benner G, Rudolph M, Tausch I, Gassmueller J. (1998) *Dermatology* 196(3): 316–322.
30. **Anti-inflammatory efficacy of topical preparations with 10% hamamelis distillate in a UV erythema test.** Hughes-Formella BJ, Filbry A, Gassmueller J, Rippke F. (2002) *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology* 15(2): 125–132.
31. **Hamamelis in children with skin disorders and skin injuries: results of an observational study.** Wolff HH, Kaiser M. (2007) *European Journal of Paediatrics* 166(9): 943–948.
32. **High molecular compounds (polysaccharides and proanthocyanidins) from Hamamelis virginiana bark: influence on human skin keratinocyte proliferation and differentiation and influence on irritated skin.** Deters A, Dauer A, Schnetz E, Fartsch M, Hensel A. (2001) *Phytochemistry* 58: 949–958.
33. **Local cooling for relieving pain from perineal trauma sustained during childbirth.** East CE, Begg L, Henshall NE, Marchant PR, Wallace K. (2012) *Cochrane Database of Systematic Reviews* (5): CD006304.
34. **Protective activity of hamamelitannin on cell damage of murine skin fibroblasts induced by UVB radiation.** Masaki H, Atsumi T, Sakurai H. (1995) *Journal of Dermatological Science* 10(1): 25–34.
35. **Hamamelitannin from Hamamelis virginiana inhibits the tumour necrosis factor- α (TNF)-induced endothelial cell death in vitro.** Habtemariam S. (2002) *Toxicon* 40(1): 83–88.
36. **Antiviral and antiphlogistic activities of Hamamelis virginiana bark.** Erdelmeier CAJ, Cinatl Jr. J, Rabenau H, Doerr HW, Biber A, Kock E. (1996) *Planta Medica* 62(3): 241–245

37. **Antiseptic effect of a topical dermatological formulation that contains Hamamelis distillate and urea.** Gloor M, Reichling J, Wasik B, Holzgang HE. (2002) *Forschende Komplementärmedizin und Klassische Naturheilkunde* 9(3): 153–159.
38. **Genotoxic and antigenotoxic effects of catechin and tannins from the bark of Hamamelis virginiana L. in metabolically competent, human hepatoma cells (Hep G2) using single cell gel electrophoresis.** Dauer A, Hensel A, Lhoste E, Knasmüller S, Mersch-Sundermann V. (2003) *Phytochemistry* 63(2): 199–207
39. **Hamamelitannin from witch hazel (Hamamelis virginiana) displays specific cytotoxic activity against colon cancer cells.** Sánchez-Tena S, Fernández-Cachón ML, Carreras A, Mateis-Martín ML, Costoya N, Moyer MP, Nuñez MJ, Torres JL, Cascante M. (2012) *Journal of Natural Products* 75(1): 26–33.
40. **Witch Hazel Significantly Improves the Efficacy of Commercially Available Teat Dips.** Reuven Rasooly, Adel Molnar, Paula Do, Gianluca Morroni, Lucia Brescini, Oscar Cirioni, Andrea Giacometti, and Emmanouil Apostolidis. *Pathogens*. 2020 Feb; 9(2): 92.
41. **Current concepts in combination antibiotic therapy for critically ill patients.** Armin Ahmed, Afzal Azim, Mohan Gurjar, and Arvind Kumar Baronía. *Indian J Crit Care Med*. 2014 May; 18(5): 310–314.
42. **Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria.** Anabela Borges , Carla Ferreira, Maria J Saavedra, Manuel Simões. *Microb Drug Resist actions*. 2013 Aug;19(4):256-65. doi: 10.1089/mdr.2012.0244. Epub 2013 Mar 12.
43. **Developing New Antimicrobial Therapies: Are Synergistic Combinations of Plant Extracts/Compounds with Conventional Antibiotics the Solution?** Matthew J. Cheesman, Aishwarya Ilanko, Baxter Blonk, and Ian E. Cock . *Pharmacogn Rev*. 2017 Jul-Dec; 11(22): 57–72.
44. **Clavulanic acid, a novel inhibitor of β -lactamases.** Neu HC, Fu KP. *Antimicrob Agents Chemother*. 1978;14:650–5.
45. **Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria.** Nascimento GG, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. *Braz J Microbiol*. 2000;31:247–56.
46. **Antimicrobial, resistance-modifying effects, antioxidant and free radical scavenging activities of Mezoneuron benthamianum Baill. Securinega virosa Roxb. and**

- Wlld. and *Microglossa pyrifolia* Lam.** Dickson RA, Houghton PJ, Hylands PJ, Gibbons S. *Phytother Res.* 2006;20:41–5.
47. **Discovery of a quorum-sensing inhibitor of drug-resistant staphylococcal infections by structure-based virtual screening.** Kiran M.D., Adikesavan N.V., Cirioni O., Giacometti A., Silvestri C., Scalise G., Ghiselli R., Saba V., Orlando F., Shoham M., et al. *Mol. Pharmacol.* 2008;73:1578–1586. doi: 10.1124/mol.107.044164.
 48. **Antibacterial activities of some plant extracts alone and in combination with different antimicrobials against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains** Adwan G, Abu-Shanab B, Adwan K.. *Asian Pac J Trop Med.* 2010;3:266–69.
 49. **Antimicrobial Peptides and Chloramphenicol Against Bacterial Cells.** *Biochim Biophys Acta* 2006 Jan;1764(1):24-32. Synergism of Leu-Lys Rich Yoonkyung Park 1, Soon Nang Park, Seong-Cheol Park, Sun Oh Shin, Jin-Young Kim, Sung-Jin Kang, Mi-Hyun Kim, Chan-Young Jeong, Kyung-Soo Hahm
 50. **Antibacterial Synergism of Novel Antibiotic Peptides With Chloramphenicol.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004 Aug 13;321(1):109-15. Yoonkyung Park 1, Hyo Jeong Kim, Kyung-Soo Hahm
 51. **Synergistic Microbicidal Effect of Auranofin and Antibiotics Against Planktonic and Biofilm-Encased *S. Aureus* and *E. faecalis*.** *Front Microbiol.* 2019 Oct 24;10:2453. Pengfei She 1, Linying Zhou 1, Shijia Li 1, Yiqing Liu 1, Lanlan Xu 1, Lihua Chen 1, Zhen Luo 1, Yong Wu 1