

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

Sede Amministrativa del dottorato di ricerca

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE, DIPARTIMENTO DEI
MATERIALI E DELLE SOSTANZE NATURALI

XXII CICLO

SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE E TECNOLOGIE CHIMICHE E
FARMACEUTICHE

**STUDIO DELL'ATTIVITA' ANTINFIAMMATORIA ED
ANTIMICROBICA DI PRODOTTI VEGETALI DERIVATI DA
HIPPOPHAE RHAMNOIDES L. E DA *PLANTAGO MAJOR L.*
PER IL CONTROLLO DELLA MASTITE NEGLI
ALLEVAMENTI BIOLOGICI**

Settore scientifico-disciplinare: **BIO/15**

DOTTORANDO
MARIANGELA FAUDALE

RESPONSABILE DELLA SCUOLA
PROF. ENZO ALESSIO

RELATORE
PROF. ROBERTO DELLA LOGGIA

CORRELATORE
DOTT. SILVIO SOSA

Anno accademico 2008/2009

Riassunto

L'attività di ricerca svolta durante l'attività di dottorato si colloca nell'ambito del progetto *PhytoVet*, finanziato dalla Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia, volto ad individuare molecole ad attività antinfiammatoria ed antimicrobica, utili nel trattamento della mastite negli animali da reddito.

Sono state studiate le proprietà antinfiammatorie ed antimicrobiche dei frutti di *Hippophae rhamnoides* (olivello spinoso) e delle foglie di *Plantago major* (piantaggine maggiore), due piante presenti sul territorio regionale. Lo scopo è stato quello di individuare frazioni o composti dotati di tali proprietà da utilizzare nella preparazione di formulazioni per il trattamento della mastite bovina anche negli allevamenti biologici. Il regolamento comunitario CE 1804/99 ha, infatti, introdotto il divieto dell'utilizzo di farmaci allopatici e i successivi interventi sulla normativa hanno confermato il provvedimento. Da qui è nata la necessità di prendere in considerazione metodi alternativi di cura.

I frutti di olivello spinoso e le foglie di piantaggine maggiore sono stati sottoposti sia ad estrazioni con solventi organici a diversa polarità, che ad estrazioni acquose. Seguendo il metodo del frazionamento guidato dal saggio biologico, sono state analizzate le capacità antinfiammatorie ed antimicrobiche degli estratti ottenuti e solo quelli risultati attivi sono stati poi frazionati fino ad identificare i composti responsabili di tali attività. Nelle foglie di *P. major* è stato individuato l'acido ursolico, un triterpene dotato di notevoli proprietà antinfiammatorie ed antimicrobiche, evidenziate rispettivamente mediante il test di inibizione della dermatite da olio di Croton nel padiglione auricolare del topo e mediante saggi *in vitro* su ceppi microbici coinvolti nella mastite. Verificate tali proprietà, è stata messa a punto una formulazione per somministrazione intramammaria, contenente l'acido ursolico, da sperimentare *in vivo* negli ovini, a cui è stata indotta la mastite mediante un inoculo di *Staphylococcus epidermidis*, nei confronti del quale il triterpene ha mostrato una notevole attività battericida nel corso dei precedenti studi *in vitro*.

Lo studio *in vivo* negli ovini con mastite è tuttora in corso.

INTRODUZIONE	1
1. La mastite negli animali da reddito	1
1.1. Cause ed effetti della mastite	1
1.2. Incidenza e conseguenze economiche della mastite	3
1.3. Diagnosi, approcci terapeutici e nuove prospettive	4
2. Le piante e la fitoterapia	8
2.1. La fitoterapia in ambito veterinario	9
3. Piante nella tradizione popolare del Friuli Venezia Giulia	11
3.1. Olivello spinoso	12
3.1.1. Descrizione botanica	12
3.1.2. Costituenti chimici	14
3.1.3. Usi tradizionali e proprietà biologiche	15
3.2. Piantaggine maggiore	18
3.2.1. Descrizione botanica	18
3.2.2. Costituenti chimici	19
3.2.3. Usi tradizionali e proprietà biologiche	20
SCOPO DELLA TESI	23
MATERIALI E METODI	24
1. Materiali	24
2. Preparazione degli estratti	25
2.1. Preparazione degli estratti con solventi organici	25
2.2. Frazionamento degli estratti ottenuti con solventi organici	25
2.3. Preparazione degli estratti con solventi acquosi	26
2.4. Frazionamento degli estratti ottenuti con solventi acquosi	27
3. Analisi degli estratti e delle frazioni	30
3.1. Cromatografia su strato sottile (TLC)	30
3.2. Spettrometria e risonanza magnetica nucleare	31
4. Attività biologiche	31
4.1. Attività anti-infiammatoria <i>in vivo</i>	31
4.2. Attività antimicrobica <i>in vitro</i>	32

4.2.1. Determinazione della minima concentrazione inibente la crescita	32
4.2.2. Valutazione del sinergismo di attività antimicrobica mediante saggio di MIC di tipo <i>checkerboard</i>	32
4.2.3. Valutazione dell'attività sulla cinetica di crescita batterica	34
4.2.4. Valutazione della cinetica di uccisione	34
4.3. Attività citotossica	35
4.3.1. Valutazione della citotossicità mediante il saggio dell'MTT [(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro)]	35
4.3.2. Valutazione delle proprietà emolitiche	36
5. Preparazione della formulazione	36
6. Sperimentazione pre-clinica <i>in vivo</i>	37
7. Analisi statistica	37
RISULTATI E DISCUSSIONE	38
1. Olivello spinoso	38
1.1. Estrazione mediante solventi organici	38
1.1.1. Preparazione degli estratti	38
1.1.2. Attività antinfiammatoria degli estratti	39
1.1.3. Frazionamento "bioassay-oriented" dell'estratto esanico	41
1.1.4. Frazionamento "bioassay-oriented" dell'estratto etilacetico	44
1.1.5. Discussione	47
1.2. Estrazione mediante solventi acquosi	49
1.2.1. Estrazioni preliminari e <i>screening</i> di attività antibatterica	49
1.2.2. Preparazione degli estratti mediante solventi acquosi	53
1.2.3. Attività antimicrobica degli estratti e delle frazioni	55
1.2.4. Analisi chimica della frazione 4	57
1.2.5. Discussione	59
2. Piantaggine maggiore (PM)	60
2.1. Estrazione mediante solventi organici	60
2.1.1. Preparazione degli estratti	60
2.1.2. Attività antinfiammatoria degli estratti	60
2.1.3. Frazionamento "bioassay-oriented" dell'estratto cloroformico	62
2.1.4. Discussione	66

2.2. Estrazione mediante solventi acquosi	67
2.2.1. Preparazione degli estratti	67
2.2.2. Attività antimicrobica degli estratti	68
2.2.3. Discussione	69
2.3. Attività antimicrobica e citotossicità di componenti estratti con solventi organici finalizzata ad un potenziale impiego nel trattamento della mastite	70
2.3.1. Attività antimicrobica dell'estratto cloroformico	70
2.3.2. Attività antimicrobica dell'acido ursolico e dell'acido oleanolico	71
2.3.3. Citotossicità dell'acido ursolico e dell'acido oleanolico	74
2.3.4. Valutazione del potenziale impiego di aucubina ed aucubigenina per l'attività antimicrobica	74
2.3.5. Discussione	78
3. Ottimizzazione dei metodi di estrazione dell'acido ursolico da PM	79
3.1. Estrazione con etanolo o acetato di etile	79
3.1.1. Estrazione con etanolo: rese ed attività antinfiammatoria	79
3.1.2. Estrazione con acetato di etile: rese ed attività antimicrobica	81
3.1.3. Discussione	83
4. Valutazione dell'attività antimicrobica degli estratti di <i>P. major</i> arricchiti in acido ursolico nei confronti di ceppi microbici di isolamento clinico	84
4.1. Determinazione della MIC dell'estratto etilacetico purificato e dell'acido ursolico	84
4.2. Saggi di time killing sull'acido ursolico	85
4.3. Attività antimicrobiche dell'antibiotico scelto	89
4.4. Discussione	90
5. Studi di formulazione	91
5.1. Preparazione delle siringhe intramammarie	91
5.2. Saggi di time killing sulla formulazione	92
5.3. Discussione	93
6. Esperimento <i>in vivo</i> su pecore mastitiche	93
CONCLUSIONI	95
BIBLIOGRAFIA	97

INTRODUZIONE

1. LA MASTITE NEGLI ANIMALI DA REDDITO

1.1. Cause ed effetti della mastite

La mastite è una delle patologie più frequenti negli allevamenti dei bovini da latte che richiede trattamenti terapeutici e profilattici durante la lattazione e nel periodo di asciutta. Si tratta di un'infezione delle ghiandole mammarie (Figura 1) che, oltre ad essere una patologia dolorosa per il bovino, comporta una minore produzione di latte, un calo della sua qualità ed una notevole perdita economica derivante dalla ridotta commercializzazione dei prodotti caseari e dalle spese veterinarie per il controllo della patologia, ma anche possibili rischi sanitari per i consumatori. Va inoltre sottolineato che il danno economico non è associato solo alle forme mastitiche conclamate, ma anche a stati infiammatori delle ghiandole mammarie che spesso passano inosservati ad un'ispezione superficiale della mammella e del suo secreto. Infatti, la mastite viene distinta in clinica e subclinica. Nel primo caso sono presenti sintomi clinici come il rigonfiamento della mammella e l'innalzamento della temperatura corporea, mentre nel secondo caso i sintomi evidenti sono assenti e la diagnosi può essere effettuata solo mediante analisi di laboratorio. Di conseguenza, in caso di mastite clinica l'allevatore stesso è in grado di constatare la presenza della patologia, mentre è molto difficile per la forma subclinica e ciò comporta notevoli rischi per la salute dell'animale (Fitzpatrick, 2000).

L'infezione della ghiandola mammaria presenta una complessa eziologia, essenzialmente di natura infettiva. I principali batteri patogeni coinvolti sono *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *S. uberis* ed *Escherichia coli* (Viguier *et al.*, 2009). La maggior parte delle infezioni è di origine ambientale; è per questo motivo che l'igiene, soprattutto durante la mungitura, rappresenta un elemento fondamentale nella prevenzione. Inoltre, anche lo stato immunitario dell'animale contribuisce all'insorgenza della malattia.

I batteri, dopo aver superato la prima barriera di difesa meccanica ed aver raggiunto i dotti della ghiandola mammaria, sfuggono ai meccanismi di difesa cellulare ed umorale dell'organismo ospite e cominciano a moltiplicarsi (Sordillo & Streicher, 2002). L'infezione stimola i leucociti del torrente circolatorio a migrare, attraverso le

cellule della ghiandola mammaria, in direzione del lume alveolare. I leucociti e le cellule epiteliali, a loro volta liberano diversi mediatori dell'infiammazione, quali chemochine, componenti del sistema del complemento e metaboliti dell'acido arachidonico, stimolando l'infiltrazione di altre cellule infiammatorie (principalmente granulociti neutrofili) il cui ruolo è la neutralizzazione e distruzione dei microorganismi patogeni attraverso la loro fagocitosi e la produzione di molecole microbicide, come gli enzimi lisosomiali, le specie reattive dell'ossigeno e peptidi antimicrobici. Tali sostanze, altamente reattive e dall'azione aspecifica, oltre a distruggere i microorganismi nocivi, sono anche responsabili dell'amplificazione del danno tissutale e del processo flogistico già in corso. Tutto questo comporta un aumento delle cellule somatiche nel latte, che comprendono macrofagi, leucociti polimorfonucleati, linfociti e cellule epiteliali. In assenza di mastite, le cellule somatiche nel latte bovino normalmente sono inferiori a 10^5 cellule/ml e, nel corso di un'infezione batterica, possono aumentare rapidamente, arrivando a 10^6 cellule/ml entro solo 2 ore. I granulociti neutrofili, in particolare, possono aumentare da un valore basale del 5-25% rispetto alle cellule totali, fino al 90% (Zhao & Lacasse, 2008). E' per questo che il numero di cellule somatiche nel latte è indice di un'infezione batterica e viene considerato un valido parametro nella diagnosi della mastite. Un elevato numero di cellule somatiche sta ad indicare una risposta infiammatoria conseguente all'infezione batterica della ghiandola mammaria (Sordillo *et al.*, 1997).

Oltre al danno tissutale, che può essere molto esteso, anche il latte subisce delle alterazioni, sia in termini di una ridotta produzione, sia in termini di un'alterata composizione: in esso è possibile trovare tracce di sangue, veri e propri flocculi o coaguli, nonché variazioni dei valori di conducibilità elettrica e di pH. Questi eventi, a loro volta, creano problemi di compatibilità della qualità del latte con le norme relative alla sua commercializzazione o, in ogni caso, una differente valutazione economica del prodotto (Green *et al.*, 2007; Halasa *et al.*, 2007; Zhao & Lacasse, 2008).

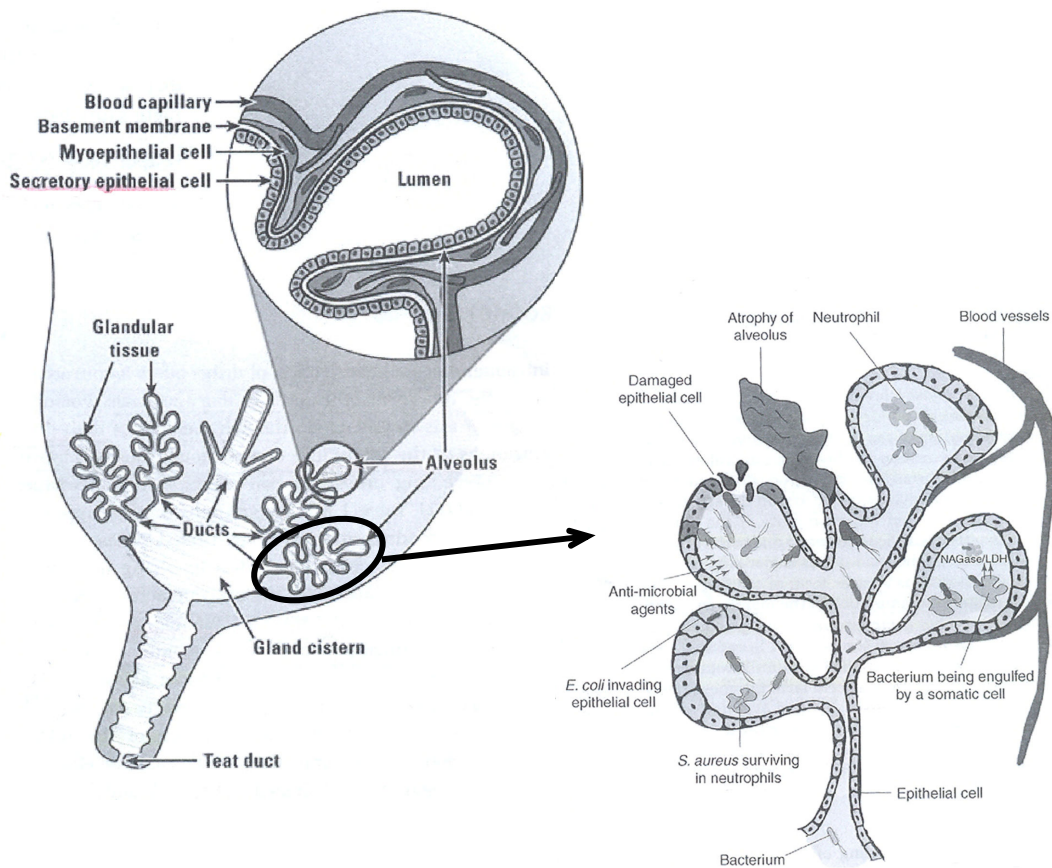


Figura 1. Struttura della ghiandola mammaria di bovino e schema generale del processo infiammatorio in seguito ad infezione batterica (mastite).

1.2. Incidenza e conseguenze economiche della mastite

La mastite rappresenta un vero e proprio problema per gli allevatori, essendo attualmente la malattia con maggiori ripercussioni economiche negli allevamenti. Infatti, essa comporta una perdita nella produzione di latte e un peggioramento della sua qualità. In un bilancio complessivo, questo aspetto rappresenta all'incirca il 70 % della perdita totale (Zhao & Lacasse, 2008). Le spese aggiuntive riguardano soprattutto il trattamento farmacologico degli animali e le misure necessarie alla prevenzione della malattia. Ulteriori perdite possono essere dovute alla presenza di residui di farmaci negli animali trattati, che comporta un'ulteriore perdita di prodotto. Questo aspetto è tenuto particolarmente monitorato perché eventuali residui rappresentano un rischio per la salute umana. Per questo motivo, durante il periodo della lattazione, la terapia farmacologica non è raccomandata. In questa ottica, è importante avere a disposizione

degli efficienti metodi di diagnosi, che permettano di individuare la malattia in tempi sufficientemente rapidi.

1.3. Diagnosi, approcci terapeutici e nuove prospettive

Uno dei primi sintomi associati alla mastite è l'innalzamento della temperatura corporea, che, però, rappresenta solo un indicatore della presenza di un'infezione. Un altro indicatore può essere il pH del latte, che aumenta per la presenza batterica, o l'aumento della conducibilità elettrica per la presenza di ioni come il sodio, il calcio, il potassio e il magnesio, che si ha durante l'infiammazione (Viguiet *et al.*, 2009).

Attualmente, la diagnosi è basata, oltre che sulla conta delle cellule somatiche, anche sull'impiego di saggi colorimetrici e fluorimetrici per la determinazione di enzimi che aumentano nel latte durante la mastite, come la N-acetil- β -D-glucosaminidasi (NAGasi) e la lattato deidrogenasi (LDH), presenti nel citoplasma di tutte le cellule e, che, in caso di mastite, sono liberati in seguito al danneggiamento della membrana cellulare (Kitchen *et al.*, 1980).

Uno dei metodi più utilizzati e meglio conosciuti per la diagnosi è il "California mastitis test" (CMT), che quantifica in maniera indiretta le cellule somatiche. Utilizzando un detergente vengono lisate le cellule somatiche e il materiale citoplasmatico rilasciato, tra cui gli acidi nucleici, forma un aggregato che ha una viscosità proporzionale al numero di leucociti presenti. Questo è un test piuttosto rapido, economico, ma ha una bassa sensibilità e l'interpretazione dei dati può essere difficoltosa. La ricerca sta sviluppando nuovi metodi che possano essere applicati anche "on-site" ed "on-line" durante la mungitura stessa, in modo da poter ridurre il tempo di diagnosi e di intervento. Ad esempio, l'automatizzazione della mungitura permette di misurare "on-line" la conducibilità elettrica, di valutare il numero delle cellule somatiche e di determinare le variazioni di colore. Sia il colore che il valore di conducibilità sono, però, solo degli indicatori e non dei parametri sensibili per una diagnosi certa. Attualmente, l'obiettivo è quello di sviluppare nuove metodiche analitiche che abbiano un'elevata sensibilità. Ad esempio, i saggi immunologici permettono di individuare in modo specifico i patogeni responsabili o determinati "biomarkers" indici di infiammazione. Inoltre, sono oggi possibili anche saggi basati su tecniche di biologia molecolare, essendo disponibile la sequenza genomica dei principali patogeni della mastite. Queste nuove tecniche analitiche stanno soppiantando

le metodiche classiche per favorire sempre di più la diagnosi in tempi ragionevoli. I progressi della genomica e proteomica forniscono un contributo significativo nella prevenzione della malattia. Una tempestiva diagnosi attraverso nuovi “biomarkers”, che siano più specifici e maggiormente sensibili, ad esempio, rispetto alla conduttività o al pH, permette un intervento più tempestivo ed efficace. I progressi fatti nelle tecniche di proteomica, ad esempio l'elettroforesi su gel bidimensionale, associati alla spettroscopia di massa permettono l'identificazione di proteine specifiche coinvolte nella mastite (Viguier *et al.*, 2009).

Il trattamento di elezione della mastite è basato sull'impiego di antibiotici, sia nella terapia che nella profilassi. L'utilizzo di antibiotici di sintesi nel campo zootecnico però, da un lato genera il problema di residui dei farmaci nei prodotti alimentari, dall'altro ha determinato lo sviluppo di ceppi batterici antibiotico-resistenti, con possibili rischi per la salute pubblica (Busani *et al.*, 2003). L'uso eccessivo e, a volte, improprio di antibiotici, in medicina umana e veterinaria, ha portato ad una progressiva diffusione della resistenza ai farmaci antibatterici e ad una conseguente riduzione della loro efficacia terapeutica. In particolare modo, gli antibiotici attualmente utilizzati per la cura della mastite destano preoccupazione per l'insorgenza di ceppi di *Salmonella* multiresistenti agli antibiotici, patogeni anche per l'uomo (Fey *et al.*, 2000).

Emerge pertanto la necessità di trovare metodi alternativi di terapia e/o profilassi della mastite negli animali da reddito. Recentemente, ad esempio, è stata rivolta un'attenzione particolare all'impiego di sostanze immunostimolanti, come ad esempio le citochine, per aumentare i sistemi di difesa endogeni (Erskine *et al.*, 1998).

Anche l'omeopatia trova applicazione in campo veterinario, ma l'efficacia dei prodotti omeopatici negli animali non è ancora stata dimostrata scientificamente (De Verdier *et al.*, 2003). Negli ultimi anni, un grande interesse è rivolto all'impiego delle piante e loro prodotti. Esso ha solidi fondamenti scientifici nella cura e nella prevenzione delle malattie, soprattutto nell'uomo, ma nel settore della medicina veterinaria è ancora piuttosto limitato. Tuttavia, un esempio dell'efficacia di estratti vegetali nel trattamento della mastite è dato da uno studio su *Tinospora cordifolia* (Menispermaceae). La somministrazione intramammaria dell'estratto idroalcolico dei fusti, risultato contenere polisaccaridi, fenoli, alcaloidi e proteine, ha mostrato un'azione immunostimolante, aumentando l'attività di fagocitosi delle cellule polimorfonucleate del latte, l'attività della mieloperossidasi, della fosfatasi acida presenti nei granuli lisosomiali, attive durante la fagocitosi, e aumentando i livelli di

interleuchina-8 (IL-8), ritenuta il principale fattore chemiotattico per i neutrofili nei processi infiammatori. Il trattamento intramammario con l'estratto di *Tinospora* ha inoltre diminuito, al quindicesimo giorno dopo la somministrazione, il numero di cellule somatiche e, al terzo giorno, la carica batterica presente (Mukherjee *et al.*, 2009).

Per quel che riguarda l'attività antimicrobica, le piante come gli insetti, gli anfibi e i mammiferi, sono dotate di efficaci sistemi di difesa endogeni pre- e post-infezione grazie alla presenza di proteine e peptidi antimicrobici (AMP), prodotti costitutivamente o indotti in seguito a danno o infezione. Pur variando considerevolmente nel numero di residui aminoacidici e nella struttura, i peptidi antimicrobici presentano una serie di caratteristiche comuni: 1) sono generalmente in forma cationica, con carica netta positiva dovuta ad un eccesso di amminoacidi basici, 2) sono di natura anfipatica ed assumendo strutture tridimensionali, espongono porzioni idrofobiche ed idrofile ben separate, 3) per queste caratteristiche, sono in grado di interagire con le membrane cellulari, alterandole o interferendo con le loro funzioni. Uno dei principali gruppi di AMP, isolate da piante ed animali, è rappresentato dalle defensine (Figura 2). Queste sono state isolate a partire dagli anni '90 dal grano, dall'orzo, dal sorgo e dai ravanelli e, successivamente, da altre specie appartenenti alla famiglia delle Brassicaceae. I membri del gruppo delle defensine di origine vegetale presentano alcune caratteristiche strutturali e biochimiche comuni: 1) sono peptidi di circa 5 kDa, costituiti da 45-50 aminoacidi; 2) hanno una carica netta positiva per un alto contenuto in residui basici; 3) sono presenti 8 residui di cisteina che formano 4 ponti disolfuro; 4) la struttura tridimensionale rivela un tipico β -foglietto a tre filamenti antiparalleli ed un singolo segmento ad α -elica parallela che lo sovrasta, in un motivo strutturale denominato " α -elica stabilizzato da cisteina"; 5) la struttura terziaria risulta conservata, mentre la struttura primaria è molto variabile e solo i residui di cisteina sono altamente conservati.

Una delle principali ipotesi sul meccanismo d'azione è che tali peptidi carichi positivamente interagiscano inizialmente con la membrana fosfolipidica carica negativamente, con conseguente alterazione della permeabilità della membrana stessa, comportando la dissipazione del potenziale transmembrana della cellula batterica, la perdita di metaboliti e la possibile traslocazione del peptide nel citoplasma. Anche l'ipotesi di un'interazione con un recettore specifico non è stata ancora scartata (Pelegriani & Franco, 2005).

<i>Aesculus hippocastanum</i>	PDEF1	-----lcnerspsqtwsqncgntah---cdkqcqdw---kashgachkrenhwkfcyfnc-
<i>Arabidopsis thaliana</i>	PDEF1	----qklc-erpsgtwsgvcgnsna---cknqcinle--karhgscnyvfpahkciyfpc-
	PDEF2	----aelc-kresetwsgrcvndyq---crdhcinnd--rgndgycaggyprscfcffsc-
	PDEF3	----artc-esqshrfkgtcvasn---canvchn-e--gfvgnrcrg-f-rrrcfctrh-
	PDEF4	----artc-asqsqrfgkcvsdtn---cenvchn-e--gfpggdcrg-f-rrrcfctrh-
<i>Beta vulgaris</i>	PDEF11	----aic-kkpskffkgacgrdadv---cekacdq-e--nwpggvc-vpf--lrkceqrsc-
	PDEF2	----atc-rkpsmyfkgacfsdtn---cqkacnr-e--dwpngkclvgf--qrkceqrpc-
<i>Brassica campestris</i>	BSD1	----qrsc-krqpsngsknckmdse---crevciya---kamratcdyfrprrcfchfpcq
<i>Brassica napus</i>	PDEF3	---eaklc-erssgtwsgvcgnna---cknqcirle--gaqhgscnyvfpahkciyfpc-
	PDEF1	----qklc-erpsgtwsgvcgnna---cknqcinle--karhgscnyvfpahk-----
<i>Brassica rapa</i>	PDEF3	----aqklc-erssgtwsgvcgnna---cknqrinle--garhgscnyvfpyhrcciyfpc-
<i>Cajanus cajan</i>	PDEF1	----aktc-enladkyrgpcfsq-----cdthcttke--havsgrcrddf---rcwctkrc-
<i>Capsicum annuum</i>	PDEF1	----kic-ealsgnfkgcllssrd---cgnvcrr-e--gftdgsicg-f-rlgcfctkpc-
	PDEF2	----rtc-esqshrfkglcfsksn---cgsvcht-e--gfnngghcrg-f-rrrcfctrh-
<i>Capsicum chinense</i>	CCD1	----qnic-ektskhfkgclsdtn---crkvcic-e--dkfedghcskl--qrkclctknc-
<i>Cassia fistula</i>	CFD1	----ktc-ekpskffsggcigtgtnkqcdylcrrge--gllsgackg---l-kcvctkac-
	CFD2	----ktc-evlsgkfggacstiingpkcdktcknqe--hyisgtcksdf---kwctknc-
<i>Clitoria ternatea</i>	PDEF1	----nlc-eraslwtgncgntgh---cdtqcrnwe--sakhgachkrainwkfcyfcd-
<i>Dahlia merckii</i>	PDEF1	----elceekasgtwsgvcgnna---cknqrinle--garhgscnyvfpyhrcciyfnc-
<i>Elaeis guineensis</i>	EGAD1	----rtc-esqshkfggtclresn---canvcqt-e--gfqggvcrgv--rrrcfctrlc-
<i>Glycine max</i>	SE60	----rvc-esqshghfhlcnrdhn---calvcrn-e--gfsggrcrg-f-rrrcfctric-
<i>Hardenbergia violacea</i>	HVAMP1	----ktc-eslantyrpccftdgs---cddhcknke--lislgrcrndv---rcwcttrnc-
<i>Helianthus annuus</i>	PDEFA	----rtc-esqshkfggtclsdtn---canvchs-e--rfsggkrcg-f-rrrcfctthc-
<i>Heuchera sanguinea</i>	PDEF1	--dgvklc-dvpsgtwsgvcgsssk---csqqckdreehfayggachyqfsvkcfckrqc-
<i>Hordeum vulgare</i>	PDEF	----ric-rrrsagfkgpcvsnkn---caqvcmq-e--gwggncdgv--plrckcmrrc-
<i>Lycopersicon esculentum</i>	TPP	----qic-kapsqtfpglcfmdss---crkycik-e--kftgghcskl--qrkclctkpc-
	TGAS118	----rtc-esqshrfkgtcvsekn---casvcet-e--gfsggdcrg-f-fffctctrpc-
<i>Medicago sativa</i>	PDEF1	----artc-enladkyrgpcfs-g---cdthcttke--navsgrcrddf---rcwctkrc-
<i>Nicotiana alata</i>	PDEF1	----rec-ktesntfpgicitkpp---crkacis-e--kftdghcski--lrrclctkpc-
<i>Nicotiana tabacum</i>	PDEF1	----rec-ktesntfpgicitkpp---crkacis-e--kftdghcski--lrrclctkpc-
	NTS13	----rtc-esqshrfkgtcvsekn---catvcit-e--gfsggrcpwi--pprcfctspc-
<i>Nicotiana excelsior</i>	NETHIO1	----rec-are-i-ftglcitnpq---crkaci-ke--kftdghcski--lrrclctkpc-
	NETHIO2	----kdc-ktesntfpgicitkpp---crkaci-ke--kftdghcski--lrrclctkpc-
<i>Nicotiana paniculata</i>	PDEF1	----kstc-kaesntfpglctkpp---crkacls-e--kftdghcski--lrrcicykpc-
<i>Oryza sativa</i>	PDEF1	----arhc-lsqshrfkgtcvssnn---canvcrt-e--sfpdgcshglerkcfckkv-
<i>Petunia inflata</i>	PDEF1	----rtc-esqshrfkgtcvresn---casvcqt-e--gfigncra-f-rrrcfctrh-
<i>Petunia hybrida</i>	PDEF1	----atc-kaeceptwsvoinkpp---cvackka---kfsdghcski--lrrclctkpc-
	PDEF2	----gtc-kaeceptwegicinkap---cvkckkaqpe--kftdghcski--lrrclctkpc-
<i>Picea abies</i>	SPI1	----rtc-ktpsgkfkgtcvssnn---cknvcqt-e--gfpsgscdfhvanrkcyckp-
<i>Picea glauca</i>	PDEF1	----artc-ktpsgkfkgtcvssnn---cknvcqt-e--gfpsgscdfhvanrkcyckp-
<i>Pisum sativum</i>	PDEF1	----ntc-ehladtyrgvcftnas---cddhcknka--hlisgtchd-w---kfcctqnc-
	PDEF2	----ntc-enlasykgtvcfgg---cdrhcrtqg--galsgrcrddf---rcwctknc-
	DRR230-C	----ntc-ehladtyrgvcftdas---cddhcknka--hlisgtchn-f---kfcctqnc-
	PDEF3	----ktc-ehladtyrgvcftnas---cddhcknka--hlisgtchn-w---kfcctqnc-
	PDEF4	----ktc-enlsgtfgkgtcvstnsn---cnkhcrnne--hlisgrcrddf---rcwcttrnc-
<i>Prunus persica</i>	PPDFN1	----rtc-esqsnrfkgtcvstnsn---casvcqt-e--gfpggghcrg-f-rrrcfctkpc-
<i>Pyrus pyrifolia</i>	PDN-1	----rtc-aaasgkfgkgtcvssnn---cantcar-e--kfdggkckg-f-rrrcmctkpc-
<i>Raphanus sativus</i>	PDEF1	----qklc-erpsgtwsgvcgnna---cknqcinle--karhgscnyvfpahkciyfpc-
	PDEF2	----qklc-qrpsgtwsgvcgnna---cknqcirle--karhgscnyvfpahkciyfpc-
	PDEF3	----klc-erssgtwsgvcgnna---cknqcirle--gaqhgscnyvfpahkciyfpc-
	PDEF4	----qklc-erpsgtwsgvcgnna---cknqcinle--garhgscnyvfpyhrcciyfpc-
<i>Sinapis alba</i>	PDEF1	----qklc-erpsgtwsgvcgnna---cknqcinle--karhgscnyvfpahkciyfpc-
	PDEF2A	----qklc-qrpsgtwsgvcgnna---crnqcinle--karhgscnyvfpahkciyfpc-
	PDEF2B	----qklcarpsgtwssgnrnna---crnfcikle--ksrhgscnlpfnsnkciyfpc-
<i>Solanum tuberosum</i>	PDEF1	----rhc-eslshrfkgtcvrdsn---casvcet-e--rfsggncrg-f-rrrcfctkpc-
<i>Sorghum bicolor</i>	PDEF1	----rvc-mgksqhsfpcisdrl---csnecvk-eeggwtagych---lryrcqkac-
	PDEF2	----rvc-mgksagfkgclmrdqn---caqvclq-e--gwggncdgv--mrqckcirqc-
	PDEF3	----rvc-rrrsagfkgclmrdhn---caqvclq-e--gwggncdgv--mrqckcirqc-
<i>Spinacia oleracea</i>	PDEF2	gifsrrkc-ktpsktfgkgtcvrdsn---cdtscry-e--gypagdckgi--rrrcmckpc-
<i>Triticum aestivum</i>	PDEF1	----kic-rrrsagfkgpcvsnkn---caqvccq-e--gwggncdgv--pfrckcirqc-
	PDEF2	----kvc-rqrsagfkgpcvsnkn---caqvclq-e--gwggncdgv--pfrckcirqc-
	TAD1	----rtc-lsqshkfkgtcvssnn---caavcrt-en--fpdgcenhlverkcyrctc-
<i>Wasabia japonica</i>	PDEF1	----aqklc-ekssgtwsgvcgnna---cknqcinle--garhgscnyvfpyhrcciyfpc-
<i>Vicia faba</i>	PDEF1	---llgrc-kvksnrfhgpcldth---cstvcrge--gykggdchgl--rrrcmc-lc-
	PDEF2	---llgrc-kvksnrfhgpcldth---cstvcrge--gykggdchgl--rrrcmc-lc-
<i>Vigna radiata</i>	PDEF1	----artc-mikkegw-gkclidtt---cahscknr--gylggnckgm--trtccylvnc-
<i>Vigna unguiculata</i>	PDEF1	----ktc-enlvdtyrgpcftdgs---cddhcknke--hlisgrcrddf---rcwcttrnc-
	THGC	----rvc-esqshghfkgactgdhn---calvcrn-e--gfsggncrg-f-rrrcfctkpc-
<i>Zea mays</i>	PDEF1	----rvc-rrrsagfkgvcmsdhn---caqvclq-e--gyggncdgv--mrqckcirqc-
	THZ2	----rvc-mgksqhsfpcisdrl---csnecvk-edggwtagyach---lryrcqkac-

Figura 2. Sequenze aminoacidiche di membri della famiglia delle defensine di piante (Antcheva *et al.*, 2006).

2. LE PIANTE E LA FITOTERAPIA

L'uso delle piante nella medicina è conosciuto dall'antichità, prima ancora di quanto documentato dalle testimonianze scritte. Negli ultimi decenni, l'interesse per le piante medicinali è aumentato significativamente. Negli Stati Uniti, ad esempio, i fitoterapici venivano impiegati appena dal 3% della popolazione nel 1991 per poi passare ad oltre il 37% entro il 1998 (Brevoort P., 1998). Infatti, vista l'ampia varietà di molecole biologicamente attive presenti nel regno vegetale, spesso dalle strutture originali e dai meccanismi d'azione multipli, numerosi sono stati gli studi in questo settore. Le principali aree di interesse riguardano la fitochimica, la farmacognosia e la coltivazione. In primo luogo per caratterizzare chimicamente i composti attivi, in secondo luogo per studiarne le relative attività biologiche e identificare i possibili meccanismi d'azione ed in ultimo per poter ottimizzare le coltivazioni a scopo produttivo.

Le molecole bioattive di origine vegetale, alla base dell'impiego terapeutico dei fitoterapici, sono derivate solitamente dal metabolismo secondario delle piante. I diversi gruppi di metaboliti secondari presenti negli organismi vegetali, come ad esempio i derivati fenolici, i flavonoidi, i terpeni, gli steroidi, gli antrachinoni, gli alcaloidi ed i polisaccaridi, sono spesso caratteristici di una specie o di un determinato gruppo tassonomico. L'effetto terapeutico dei prodotti di origine vegetale, tuttavia, è spesso il risultato dell'azione di diversi costituenti chimici presenti nella pianta. Infatti, in essa sono presenti, oltre ai principi attivi, anche sostanze inerti e sostanze che modulano l'effetto dei principi attivi. Se si pensa all'applicazione delle piante medicinali, quest'aspetto è positivo perché potrebbe comportare un numero minore di effetti collaterali, visto che spesso non vi è la predominanza di un solo composto nell'organismo vegetale (Tyler, 1999). Inoltre, ciò potrebbe diminuire la possibilità di sviluppare resistenza o risposte adattive, nel caso di azione contro microrganismi (Kaufman *et al.*, 1999).

Va infine ricordato che, nonostante i progressi nella chimica combinatoriale e nelle tecniche di sintesi chimica, le piante medicinali continuano ad essere un'importante fonte di nuovi composti utili nella sintesi di molecole farmacologicamente attive. Al fine di individuare le molecole farmacologicamente attive, di interesse terapeutico, un approccio razionale è rappresentato dal frazionamento "bioassay-oriented" che permette di selezionare le piante di maggiore interesse,

attraverso uno screening dell'attività dei loro estratti, e di concentrare il lavoro separativo dei fitochimici solo nei confronti degli estratti e delle frazioni in cui si concentra l'attività dell'estratto di partenza, fino ad individuare i principi responsabili dell'effetto studiato (Balunas & Kinghorn, 2005).

2.1. La fitoterapia in ambito veterinario

L'impiego di fitoterapici nel campo della medicina veterinaria è ancora piuttosto limitato, ma anche nell'ottica delle recenti norme europee, rappresenta una buona alternativa ai farmaci di sintesi negli allevamenti convenzionali, e soprattutto un valido metodo nel trattamento delle malattie negli allevamenti biologici, in cui il regolamento comunitario 1804/99 ha proibito l'utilizzo degli antibiotici di sintesi. Questo ha comportato un incremento della ricerca di sostanze naturali e di approcci terapeutici alternativi.

In ambito veterinario, alcune piante sono indicate già dalla tradizione popolare. Nella tradizione italiana, ad esempio, ben oltre 280 piante sono o sono state impiegate per il trattamento di bovini, ovini, pollame ed equini. Le famiglie più numerose per le specie utilizzate sono quella delle Asteraceae (11%) seguita da quella delle Lamiaceae (7.1%) e dalle Ranunculaceae (5.2%), mentre le forme di impiego maggiormente usate sono i decotti o come supplementi alimentari. I disturbi maggiormente trattati risultano essere quelli del sistema digerente o della pelle, seguiti dal trattamento di ferite o di stati infiammatori (Viegi *et al.*, 2003).

Negli ultimi decenni, studi scientifici hanno confermato alcune proprietà terapeutiche di numerose piante utilizzate nella medicina tradizionale ed hanno individuato diverse classi di composti biologicamente attivi di origine vegetale. Ad esempio, numerosi composti hanno rivelato proprietà antimicrobiche, immunostimolanti e/o antinfiammatorie, sia *in vitro*, sia *in vivo*, ed a volte meccanismi d'azione multipli (Calixto *et al.*, 2003; Calixto *et al.*, 2004; Mahady, 2005; Rios & Recio, 2005). Di conseguenza, sfruttando il basso costo e la rinnovabilità degli organismi vegetali, è possibile derivare preparati fitoterapici economicamente accessibili per il trattamento di malattie in ambito veterinario, come ad esempio la mastite. Oltre all'utilizzo terapeutico, va considerata anche la possibilità di un impiego nella prevenzione delle malattie, come ad esempio per controllare la carica microbica definita "ambientale" e ridurre l'esposizione a specie batteriche o fungine. In quest'ottica appare

particolarmente vantaggioso l'impiego di prodotti naturali che abbiano un'azione antimicrobica e che potenzino le difese dell'animale.

3. PIANTE MEDICINALI NELLA TRADIZIONE POPOLARE DEL FRIULI VENEZIA GIULIA

Il Friuli Venezia Giulia è una regione piuttosto particolare, se si considera come l'insieme di aree geografiche molto differenti tra loro dal punto di vista storico, etnico e geobotanico. Analizzando il territorio, la vegetazione ha carattere prevalentemente continentale nel nord, per poi diventare sempre più xerofita con carattere sub-mediterraneo e mediterraneo nel sud. Chiaramente questa varietà è dovuta alle differenze climatiche e pedologiche che contraddistinguono le diverse aree.

Le famiglie vegetali che hanno un maggiore numero di specie utilizzate nella medicina tradizionale della regione sono anche quelle più diffuse: Labiatae, Umbelliferae, Compositae, Rosaceae e Liliaceae. Generalmente, esse venivano utilizzate dalla popolazione per la cura dei disturbi più comuni e minori, come tosse, febbre, problemi gastro-intestinali, cefalea, piccole ferite ed affezioni cutanee. La tradizione ci insegna che la maggior parte delle piante veniva usata fresca, per la preparazione di decotti, infusi, impiastri, macerati in alcool, in vino o in aceto ed unguenti (Lokar & Poldini, 1988).

A causa della diffusione dei farmaci di sintesi e delle nuove conoscenze in campo farmaceutico, l'uso tradizionale delle piante medicinali è molto diminuito o addirittura scomparso. Ad oggi, infatti, i rimedi della medicina tradizionale sono utilizzati solamente nelle piccole realtà: nelle aree sviluppatesi indipendentemente dalle altre, conservando tradizioni culturali, linguistiche e sociali proprie, si sono mantenute pratiche della medicina tradizionale, mentre nelle aree maggiormente influenzate dallo sviluppo economico e sociale, si sono perse (Lokar & Poldini, 1988).

Considerando il basso costo e la rinnovabilità degli organismi vegetali, allo scopo di derivare agenti antinfettivi, antinfiammatori ed immunostimolanti economicamente accessibili per l'uso in ambito veterinario, negli animali da reddito, la Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia ha finanziato il progetto *PhytoVet*. Esso è stato rivolto allo studio di due piante presenti nella Regione, in particolare l'olivello spinoso (*Hippophae rhamnoides* L.) e la piantaggine maggiore (*Plantago major* L.), già impiegate nella medicina tradizionale per le proprietà antinfiammatorie, antimicrobiche ed immunostimolanti (Figura 3).

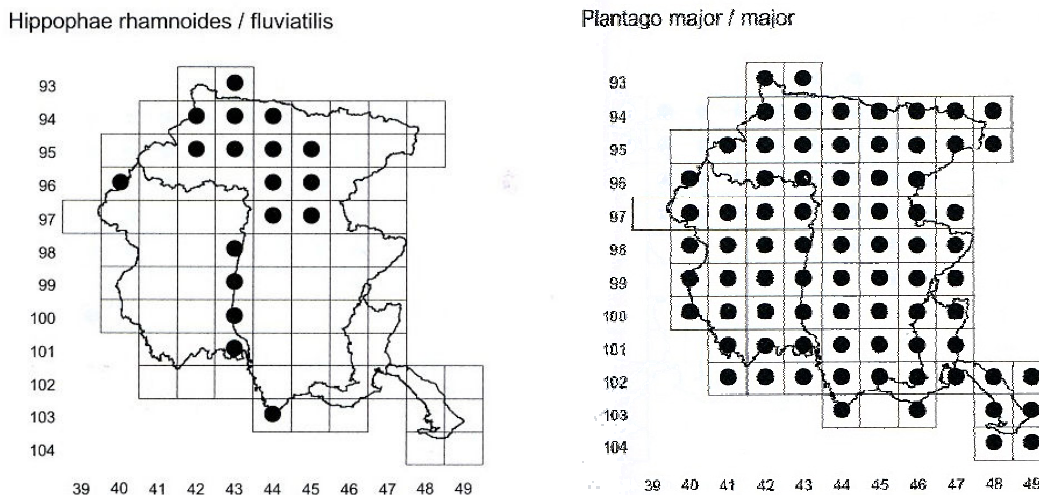


Figura 3. Carte di distribuzione in Friuli Venezia Giulia di *Hippophae rhamnoides* L. e *Plantago major* L.

3.1. Olivello spinoso

3.1.1. Descrizione botanica

L'olivello spinoso (*Hippophae rhamnoides* L.; Figura 4) è un arbusto appartenente alla famiglia delle Elaeagnaceae, naturalmente distribuito in Asia centrale ed in Europa. La specie è suddivisa in nove sottospecie (Rousi, 1971), delle quali *sinensis*, *mongolica* e *rhamnoides* sono le più abbondanti e con un maggiore interesse commerciale. L'arbusto, generalmente di media dimensione e molto ramificato, presenta un tronco principale con una spessa e ruvida corteccia ed i rami spinosi. Le foglie, che ricordano vagamente quelle dell'ulivo (*Olea europea*), sono alterne, oblunghe, verdi sulla pagina superiore e verde argento su quella inferiore, presentano un breve picciolo, un lembo di lunghezza fino a 8 cm e di larghezza inferiore a 7 mm, con margine intero. Si tratta di una specie dioica, ossia con individui che producono o fiori femminili o fiori maschili. I fiori maschili, provvisti di quattro stami, sono raggruppati in piccoli amenti sessili all'ascella di brattee caduche; quelli femminili, provvisti di un ovario supero, sono pedicellati e solitari. La fioritura avviene in aprile su rami nudi e l'impollinazione è affidata al vento. I frutti sono drupe sferiche o generalmente ellittico-

ovoidali con diametro di circa 6-9 mm, di un colore giallo-arancio, la cui raccolta avviene tra agosto ed ottobre (Guliyev *et al.*, 2004).

Hippophae rhamnoides è originario della Cina occidentale e di zone limitrofe dell'Asia centrale, come l'Himalaya. Nelle zone di origine preferisce zone montuose, con un clima temperato freddo e cresce su terreni aridi e sabbiosi. Diffusasi poi anche in Medio Oriente ed in Europa, comprese l'Italia centro-settentrionale, è diventata specie nativa anche in ambiente salmastro, sulle dune sabbiose vicino al mare o lungo i fiumi su terreno ghiaioso, non oltre i 1800 metri di altitudine. Grazie alla sua robustezza e ad un complesso sistema di radici capaci di fissare l'azoto del terreno (Kallio *et al.*, 2002), l'olivello spinoso è in grado di consolidare ed arricchire terreni poveri e instabili su cui cresce spontaneamente.

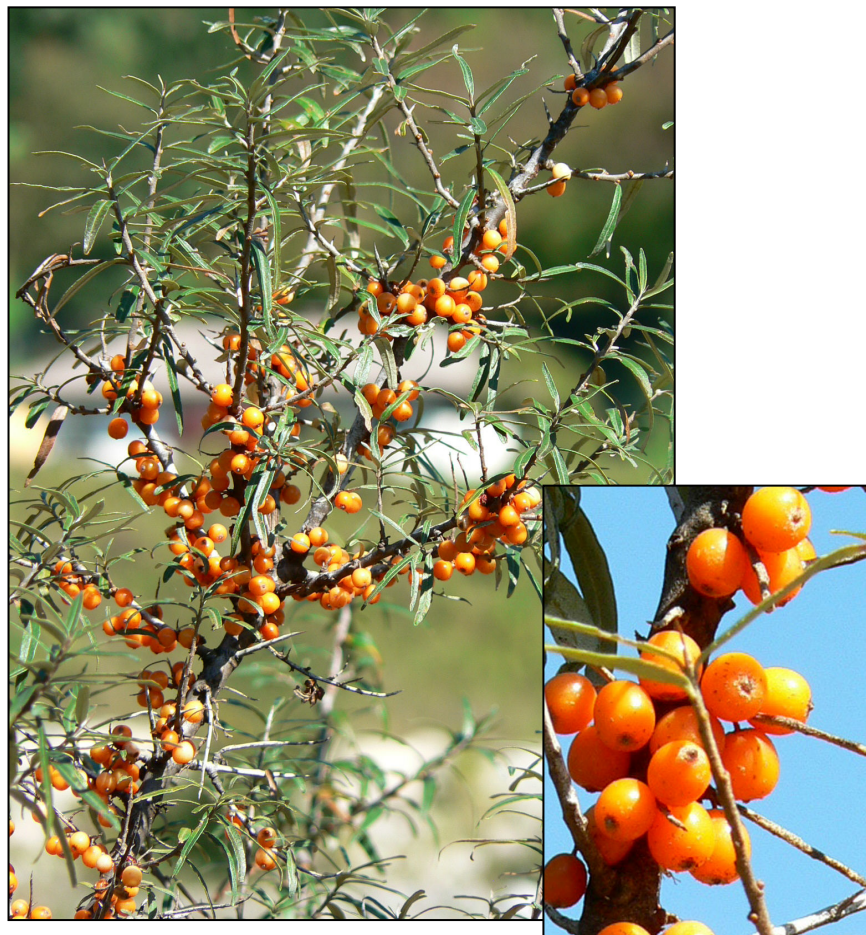


Figura 4. Pianta e frutti di Olivello spinoso

3.1.2. Costituenti chimici

Hippophae rhamnoides contiene diversi tipi di costituenti chimici e le parti maggiormente studiate sono rappresentate dai semi e dai frutti (Arimboor *et al.*, 2006). La lavorazione delle drupe è piuttosto laboriosa ma permette di ottenere differenti prodotti, che presentano una diversa composizione fitochimica, in funzione del luogo di raccolta, delle condizioni climatiche e geologiche di crescita (Kallio *et al.*, 2000).

I frutti sono particolarmente ricchi in vitamina C, polifenoli, acidi organici, trigliceridi, acidi grassi, tocoferoli, steroli, zuccheri e sali minerali. La vitamina C (acido ascorbico) rappresenta il nutriente di maggiore importanza nel succo dei frutti, ottenuto per spremitura ed è presente in una percentuale compresa tra il 65-85% del peso totale. Infatti, la sua concentrazione può raggiungere i 2.5 g/100 ml, risultando maggiore a quella del succo di arancia. Il succo è ricco in acidi organici, come dimostrato dal pH piuttosto basso (circa 2.7). Quantitativamente il più rappresentativo di questi è l'acido chinico, ma sono presenti anche l'acido malico, l'acido citrico, l'acido tartarico e l'acido ossalico (Beveridge *et al.*, 2002).

L'opalescenza del succo può essere dovuta alla presenza di proteine, che variano, a seconda della varietà e dell'origine geografica, da 0.79 a 3.11% del peso fresco (Bekker & Glushenkova, 2001). Sono presenti anche aminoacidi liberi, dei quali l'acido aspartico è di gran lunga il maggiore, come determinato nella pianta cinese in cui si trovano 426.6 mg/100 g (Li *et al.*, 2003).

Sia i semi che la polpa costituiscono una fonte importante di sostanze oleose. I semi contengono una percentuale compresa tra il 6 e il 20% di lipidi e quella parte di polpa che circonda principalmente il seme (pulp oil) ha un contenuto lipidico che varia tra il 10 e il 15% (Li *et al.*, 2003). L'olio contenuto nei semi è prevalentemente costituito da acidi grassi insaturi, presenti principalmente sotto forma di trigliceridi, fosfolipidi e glicerofosfolipidi. Gli acidi grassi più abbondanti sono insaturi, come l'acido linoleico (30-40%), l'acido α -linolenico (20-35%) e l'acido oleico (13-30%). La polpa ha una differente composizione lipidica, caratterizzata da un'alta percentuale di acido palmitoleico (16-54%), dato piuttosto inusuale per il regno vegetale (Yang & Kallio, 2002).

Sia i semi che la polpa sono una fonte ricca di tocoferoli. Il contenuto totale di tocoferoli e tocotrienoli varia nel range di 100-300 mg/kg nei semi e 10-150 mg/kg nei frutti (Kallio *et al.*, 2002). Nella polpa, l' α -tocoferolo rappresenta il 90% dei tocoferoli

totali, mentre nei semi troviamo sia l'isomero α che γ , al 30-50% del totale. Tra gli steroli, il β -sitosterolo e lo stigmasterolo sono quelli più presenti nella polpa del frutto. Il β -sitosterolo, per esempio, costituisce il 61-83% dei fitosteroli presenti nel frutto proveniente dalla Cina. Nella polpa si trovano anche i carotenoidi, principalmente β -carotene (15-55% dei carotenoidi totali), che conferiscono ai frutti il tipico colore giallo-arancio (Yang *et al.*, 2001).

Molto rappresentata è la classe dei composti fenolici, quali flavonoli, flavoni, acidi fenolici, protoantocianidine e tannini (Arimboor *et al.*, 2006). Quercetina, kempferolo, e isoramnetina sono i principali flavonoidi contenuti nelle drupe (Gao *et al.*, 2000). Tra gli acidi fenolici, sono presenti principalmente l'acido gallico, l'acido protocatechico, l'acido p-idrossibenzoico, l'acido vanillico, l'acido caffeico e l'acido ferulico. I polifenoli dei frutti sono concentrati per la maggior parte (65%) all'interno del seme (Arimboor *et al.*, 2008).

3.1.3. Usi tradizionali e proprietà biologiche

Diverse parti di *Hippophae rhamnoides* sono state utilizzate nella medicina tradizionale di Paesi asiatici, ma la parte maggiormente usata è da sempre rappresentata dai frutti. Nella *medicina tradizionale cinese* essi venivano utilizzati per alleviare la tosse, aiutare la digestione, invigorire la circolazione sanguigna e diminuire dolori di varia origine. Nella *medicina tradizionale indiana e tibetana*, i frutti sono stati impiegati in preparazioni per le proprietà antinfiammatorie ed emostatiche, per la cura di malattie polmonari, gastrointestinali, cardiache e per disturbi metabolici. È inoltre riportato l'uso dell'olio, di sciroppi e di succhi ottenuti dai frutti: l'olio è stato usato nella cura di malattie del fegato, di processi infiammatori, di problemi gastrointestinali; il succo e lo sciroppo nella cura del dolore, di ferite e come regolatore intestinale. È ben nota anche l'efficacia dell'olio nella cura di affezioni cutanee, quali eczemi e la dermatite atopica (Guliyev *et al.*, 2004).

Le foglie ed i giovani rami erano inoltre utilizzati fin dai tempi degli antichi Greci come integratori della dieta dei cavalli da corsa, per rendere sano e lucente il mantello e per farli aumentare di peso (il nome botanico significa, infatti, "cavallo splendente") (Li *et al.*, 2003).

In Friuli Venezia Giulia, a partire dalla fine degli anni '40 fino agli inizi degli anni '60, gli abitanti di Bordano (UD) e dei paesi vicini raccoglievano le drupe di olivello nel greto del Tagliamento per venderlo alle industrie farmaceutiche tedesche che ne ricavano vitamina C o ne facevano sciroppi contro il raffreddore. La raccolta veniva fatta a mano; i frutti venivano staccati dai rami con appositi pettini, poi accuratamente setacciati per eliminare le foglie rimaste nel cesto e venduti a peso (Figura 5). La raccolta e la vendita dell'olivello ha rappresentato, infatti, per questi paesi una fonte di reddito molto importante, soprattutto in quegli anni, che seguivano di poco la fine della guerra. Si racconta di uno sciopero organizzato per aumentare la paga, che passò da 120 lire fino a 350, che per quei tempi erano molti (Costantini E., 1998).



Figura 5. Raccolta dei frutti di olivello spinoso a Bordano (UD), negli anni '50.

L'olivello veniva utilizzato inoltre dagli abitanti della regione per preparare marmellate e sciroppi dalla polpa dei frutti maturi; generalmente, dopo averli schiacciati e macerati, erano bolliti in zucchero e poi raffreddati. Queste preparazioni venivano impiegate contro malattie da raffreddamento, inappetenza, stanchezza da super lavoro e nelle convalescenze (ERSA, 2002).

Diversi studi hanno invece dimostrato alcune proprietà farmacologiche dei frutti ed individuato i principi responsabili di tali attività. Ad esempio, è stata osservata

un'attività antimicrobica nei confronti di batteri Gram-negativi, attribuita al contenuto in fenoli (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2001).

Un estratto esanico da frutti ha, invece, mostrato un effetto antiulcera nel ratto: la somministrazione orale dell'estratto è stata in grado di ridurre l'estensione ed il numero di ulcere indotte dall'indometacina, da stress o da etanolo, in maniera paragonabile ai farmaci di sintesi omeprazolo, famotidina e misoprostolo (Süleyman *et al.*, 2001). Un'azione antiulcera è stata correlata anche con l'attività inibitoria nei confronti di *Helicobacter pylori*, batterio coinvolto nell'insorgenza di gastriti ed ulcere gastriche. Li *et al.* (2005), in particolare, hanno riscontrato che gli estratti etanolic ed acquosi delle foglie di *Hippophae rhamnoides* presentano un'attività antibatterica nei confronti di questo microorganismo.

La frazione flavonoidica dei frutti, dopo somministrazione endovenosa nel topo, è stata in grado di prolungare il tempo di occlusione trombotica nell'arteria femorale, mentre *in vitro* è stata in grado di inibire in maniera concentrazione-dipendente l'aggregazione piastrinica indotta da collagene (Cheng *et al.*, 2003).

Diversi estratti, sia quelli di natura idrofila che di natura idrofobica, hanno mostrato *in vitro* una buona attività antiossidante, come ad esempio l'estratto alcolico delle foglie e dei frutti, in grado di ridurre il danno ossidativo indotto da cromo (VI) (Geetha *et al.*, 2002).

Ganju *et al.* (2005) hanno evidenziato un'attività antinfiammatoria per l'estratto etanolic delle foglie, impiegando il modello dell'artrite da adiuvante di Freund nel ratto: la somministrazione intraperitoneale dell'estratto (50-400 mg/kg), è stata in grado di ridurre in maniera significativa l'edema indotto dall'adiuvante. Mishra *et al.* (2008) hanno invece studiato una frazione flavonica dei frutti, valutando alcuni effetti *in vitro* coinvolti nella risposta infiammatoria ed immunitaria. Utilizzando colture di cellule mononucleate periferiche di sangue umano, è stato osservato che la frazione era in grado di stimolare la produzione di interleuchina-6 e del fattore di necrosi tumorale- α nelle cellule esaminate, un effetto che potrebbe determinare una stimolazione del sistema immunitario ed esercitare una protezione nei confronti di infezioni batteriche.

3.2. Piantaggine maggiore

3.2.1. Descrizione botanica

Plantago major L. (Figure 7-8) è una pianta perenne appartenente alla famiglia delle Plantaginaceae. Può essere alta all'incirca 15 cm, ma le dimensioni dipendono dall'habitat in cui cresce. Le foglie sono disposte a rosetta e hanno forma ovata o ellittica con nervature parallele, che possono variare da 5 a 9. Le foglie sono glabre e hanno il margine intero o irregolare. I fiori sono piccoli, verde-marrone e raccolti su una spiga. Ogni fiore da origine ad una capsula contenente da 10 a 20 semi di forma ovale, che vengono liberati a maturazione. Ogni individuo produce fino a 20.000 semi di piccole dimensioni (0.4-0.8 x 0.8-1.5 mm) e dal sapore leggermente amaro (Samuelsen, 2000).



Figura 7. Pianta di *Plantago major* L.

Plantago major è originaria del nord Europa e dell'Asia centrale, ma è ampiamente distribuita in tutto il mondo, sia a livello del mare che nelle zone di alta montagna.



Figura 8. Stampa rappresentante piantaggine maggiore.

3.2.2. Costituenti chimici

Studi fitochimici sulle foglie e sui semi di *P. major* hanno evidenziato la presenza di diversi costituenti chimici, tra cui carboidrati, lipidi, alcaloidi, derivati fenil propanici, flavonoidi, iridoidi, terpeni e vitamine (Samuelsen, 2000).

Dai semi e dalle foglie sono stati isolati i monosaccaridi glucosio, fruttosio, xilosio e ramnosio, il disaccaride saccarosio ed il trisaccaride planteosio. La parte esterna del tegumento dei semi contiene inoltre polisaccaridi mucillaginosi di tipo eteroxilanico e di natura acida che, a contatto con l'acqua, formano una massa vischiosa. Dalle foglie sono stati inoltre isolati il trisaccaride raffiniosio ed il tetrasaccaride stachiosio, che sembra essere utile alla pianta come riserva temporanea di carboidrati (Samuelsen, 2000). Inoltre, sempre dalle foglie, è stata isolata una pectina, denominata PMII, che

rappresenta il 37% in peso dei carboidrati presenti in un estratto grezzo di tale materiale vegetale (Samuelsen *et al.*, 1996). Tra i carboidrati presenti nelle foglie, è stato infine individuato un arabinogalattano, denominato PM1a, avente un peso molecolare di 77-80 kDa (Samuelsen *et al.*, 1998).

Dai semi di *P. major* sono stati isolati numerosi acidi grassi, tra cui l'acido palmitico, l'acido stearico, l'acido oleico, l'acido linoleico, l'acido linolenico e l'acido arachidico, quest'ultimo ritrovato solo in questa specie di *Plantago*. Alcuni acidi grassi sono stati isolati anche dalle foglie fresche, in quantità inferiore rispetto ai semi. Tra essi, vanno ricordati l'acido miristico, l'acido palmitico, l'acido stearico, e l'acido arachidico (Ringbom *et al.*, 2001; Samuelsen, 2000).

I derivati fenil propanici individuati in *P. major* sono rappresentati dall'acido caffeico e dai suoi derivati. Dalle foglie sono stati isolati gli esteri etilici e metilici dell'acido caffeico, l'acido clorogenico e neoclorogenico. Il principale derivato dell'acido caffeico è plantamajoside, seguito da acteoside. Il primo presenta un sostituente glucosio sul glucosio centrale della molecola, mentre il secondo presenta un ramnosio nella stessa posizione. Numerosi sono anche i flavonoidi, tra cui quelli più abbondanti sono la baicaleina, l'ispidulina e la plantaginina. Le foglie contengono iridoidi in forma di glucosidi e quello principale è rappresentato dall'aucubina. Altri iridoidi individuati in questa pianta sono l'asperuloside, il catalpolo, l'acido gentiposidico, il majoroside, il 10-idrossimaioroside, il 10-acetossimaioroside ed il melittoside (Samuelsen, 2000).

I maggiori componenti isolati dalla cera delle foglie sono i triterpeni acido ursolico, acido oleanolico ed acido 18 β -glicirretinico, nonché il derivato steroideo β -sitosterolo. *P. major* contiene anche due alcaloidi, l'indicaina e la plantagonina. Indagini fitochimiche su *P. major* hanno rivelato la presenza di vitamine appartenenti a vari gruppi. In particolare, le foglie fresche contengono β -carotene, acido ascorbico e deidroascorbico e la vitamina K, la cui quantità sembra avere un ruolo importante per la resistenza ad alcuni pesticidi (Ringbom *et al.*, 1998; Samuelsen, 2000).

3.2.2. Usi tradizionali e proprietà biologiche

Plantago major è stata spesso considerata solo come un'erbaccia, ma in realtà è una pianta medicinale, le cui proprietà sono riconosciute da secoli. Le foglie di piantaggine sono state utilizzate nella medicina tradizionale dell'Europa, dell'Asia,

dell’Africa e del Sud America nel trattamento di infiammazioni e ferite cutanee. Le prime citazioni risalgono all’epoca del fisico Dioscoride nella Grecia del I secolo in “De materia medica”. È stata utilizzata anche nel trattamento di diverse altre patologie, come infezioni della pelle, disturbi del sistema digerente, di quello respiratorio, di quello circolatorio, per ridurre la febbre e attenuare il dolore (Samuelsen, 2000).

Nella tradizione del Friuli Venezia Giulia, le foglie di *Plantago major* erano conosciute come disinfettanti e cicatrizzanti e il macerato in alcool veniva impiegato come antinfiammatorio e antibatterico (Lokar & Poldini, 1988).

Studi su estratti e composti di *P. major* hanno rivelato interessanti proprietà antibatteriche ed antifungine. Un estratto idroalcolico delle foglie ha dimostrato un lieve effetto antibatterico nei confronti di *Staphylococcus aureus* ed un’azione antifungina nei confronti di *Candida krusei*, ma è risultato praticamente inattivo nei confronti di altre specie batteriche Gram-positive e Gram-negative o di altre specie di *Candida* (Holetz *et al.*, 2002). Al contrario, Velasco-Lezama *et al.* (2006) hanno osservato che l’estratto acquoso è in grado di ridurre la crescita di *Bacillus subtilis*, mentre l’estratto esanico era in grado di inibire la crescita di *Escherichia coli*. L’estratto metanolico e quello cloroformico, invece, hanno rivelato una lieve inibizione della crescita di entrambe le specie batteriche. Gli autori hanno osservato che gli estratti ottenuti con solventi polari siano più attivi nei confronti di *B. subtilis* (Gram-positivo), mentre gli estratti ottenuti con solventi apolari sono più attivi su *E. coli* (Gram-negativo). La differente azione potrebbe essere correlata al diverso grado di polarità dei principi attivi degli estratti: i composti più polari riuscirebbero a penetrare più facilmente nella parete dei gram-positivi, relativamente idrofila, mentre quelli apolari avrebbero una maggiore affinità per l’involucro lipofilo dei batteri gram-negativi (Velasco-Lezama *et al.*, 2006). Hetland *et al.* (2000) hanno invece testato l’effetto di un polisaccaride isolato dalle foglie che, inoculato per via intraperitoneale in topi infettati da *Streptococcus pneumoniae*, era in grado di esercitare un effetto protettivo attribuito alla stimolazione dell’immunità innata. Anche per alcuni costituenti della pianta, quali il plantamaioside e l’acetoside è stata dimostrata una discreta attività antibatterica. E’ stata inoltre osservata un’attività antiulcerogena (Turchia) per un estratto metanolico e per uno acquoso che, in associazione, sono stati in grado di ridurre del 40% la formazione di ulcere gastriche nel topo. L’attività antiparassitaria è stata dimostrata per un decotto nei confronti di *Giardia duodenalis*. La percentuale di mortalità del trofozoide indotta dal decotto di *P. major* era confrontabile con quella del farmaco di riferimento, il tinidazolo (Samuelsen, 2000).

Si è visto inoltre che l'estratto metanolico è in grado di aumentare la produzione di ossido nitrico e stimolare la proliferazione dei linfociti, mostrando quindi un'azione immunostimolante (Gomez-Flores *et al.*, 2000), in relazione al contenuto in acido ursolico ed oleanolico (Hsu *et al.*, 1997).

Ringbom *et al.* (2001), nel corso della ricerca di sostanze ad attività antinfiammatoria in grado di inibire selettivamente la cicloossigenasi-2, hanno osservato che l'inibitore più selettivo dell'enzima era il derivato semisintetico acido 5-tia-8,11,14,17-eicosatetraenoico, seguito dagli acidi eicosapentaenoico, docoesaenoico, α -linolenico e linoleico. In uno studio analogo, era stato dimostrato lo stesso effetto per i triterpeni acido ursolico ed oleanolico. Si era visto che l'acido ursolico inibiva *in vitro* la biosintesi delle prostaglandine agendo selettivamente sulla COX-2, così come l'acido oleanolico ma in minor misura; l'acido 18 β -glicirretinico non mostrava invece alcuna azione (Ringbom *et al.*, 1998).

Il principale iridoide glicoside contenuto in *P. major*, l'aucubina, è nota soprattutto per l'elevata attività antibatterica del suo aglicone, l'aucubigenina (Samuelsen, 2000).

SCOPO DELLA TESI

Attualmente, il metodo biologico nell'allevamento bovino sta suscitando sempre più interesse. Tuttavia, la normativa che lo regola impone una serie di limitazioni per quanto riguarda l'approvvigionamento degli alimenti e il controllo delle malattie negli animali. La normativa comunitaria, infatti, proibisce l'utilizzo dei farmaci allopatici sia nella prevenzione che nel trattamento delle malattie degli animali da reddito.

Lo scopo della tesi è pertanto quello di valutare prodotti vegetali dai frutti di *Hippophae rhamnoides* L. (Elaeagnaceae) e dalle foglie di *Plantago major* L. (Plantaginaceae), in grado di combinare l'attività antimicrobica con quella antinfiammatoria ed immunostimolante, utili per il potenziamento delle difese immunitarie ed il trattamento di malattie negli animali da reddito, anche nell'allevamento biologico. Inoltre, l'interesse verso l'utilizzo di piante autoctone è anche di tipo economico, nell'ottica di poterle addomesticare e coltivare, ad esempio, nelle aree di pascolo o in zone marginali per il recupero del territorio e lo sviluppo di attività alternative.

Per individuare frazioni ad attività antinfiammatoria ed antimicrobica, è stata seguita la tecnica del frazionamento "bioassay-oriented", impiegando un modello sperimentale di attività antinfiammatoria *in vivo* (inibizione della dermatite da olio di Croton nel padiglione auricolare del topo) ed uno *in vitro* per lo studio dell'attività antimicrobica (determinazione dell'attività nei confronti di ceppi batterici e funghi standard e di fresco isolamento). In modo particolare, per lo studio delle frazioni ad attività antinfiammatoria sono state eseguite estrazioni sequenziali mediante macerazione con solventi organici a grado crescente di polarità, al fine di ottenere degli estratti contenenti sostanze a diverso grado di lipofilia. Per quel che riguarda l'attività antimicrobica, si sono studiate frazioni idrofiliche, con particolare attenzione rivolta alla presenza di peptidi antimicrobici, come le defensine, ma anche agli estratti e ai composti ottenuti da *P. major* mediante l'impiego di solventi organici, dotati di attività antinfiammatoria.

MATERIALI E METODI

1. MATERIALI

Olivello spinoso. I frutti di *Hippophae rhamnoides* L. sono stati raccolti lungo le rive del torrente But, in località Zuglio (UD), nel mese di settembre 2007-2008, a piena maturazione. Dopo la raccolta, sono stati congelati a -80°C fino all'utilizzo. Per poter eseguire le estrazioni, sono stati preventivamente liofilizzati per alcuni giorni, al fine di eliminare l'acqua contenuta.

Piantaggine maggiore. Le foglie di *Plantago major* L. sono state raccolte in località Monrupino (TS), sull'altipiano carsico, nel mese di luglio 2007-2008. Prima delle estrazioni, le foglie sono state essiccate a temperatura ambiente. Un campione è depositato presso l'erbario del dipartimento di Biologia dell'Università di Trieste (TSB/165-4).

Animali ed altri materiali. Gli animali utilizzati per la sperimentazione sono topi maschi, di ceppo CD-1, del peso medio di 28÷30 g, forniti dalla Harlan Italy (San Pietro al Natisone, Udine). Gli animali sono stati stabulati in gruppi di 5 e mantenuti per almeno una settimana nello stesso ambiente dove successivamente è stata eseguita la sperimentazione, a temperatura (23±1°C) ed umidità relativa (50-60%) costanti, in presenza di un ciclo fisso di illuminazione artificiale (07.00-19.00).

Per i test di attività antimicrobica sono stati utilizzati ceppi standard di laboratorio di *Staphylococcus aureus* ATCC, 710A e 305A; *Staphylococcus epidermidis* 19; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC e 12989; *E. coli* ATCC e ML35; *Streptococcus faecalis* 2903; *Salmonella enteritidis* H₂; *Candida albicans* ATCC. Inoltre sono stati condotti studi di attività su ceppi da isolato clinico di mastite ovina, quali *Staphylococcus aureus* 569, *Staphylococcus epidermidis* 41718-80 e *Staphylococcus haemolyticus* 41718-111, provenienti dall'istituto zooprofilattico sardo. I primi sono stati mantenuti su terreno agar-MH (Mueller-Hinton), mentre i secondi su piastre agar-sangue.

L'olio di Croton e l'indometacina sono stati acquistati presso la Sigma-Aldrich (Milano). La ketamina cloridrato è stata acquistata presso la Virbac (Milano). Gli acidi ursolico ed oleanolico sono stati acquistati presso la Roth (Karlshue, Germania). Il Mueller-Hinton medium è stato acquistato presso i Difco Laboratories (Detroit, USA).

Le lastre in gel di silice utilizzate per la cromatografia su strato sottile (40-63 µm) sono state fornite dalla Merck (Francoforte, Germania).

I solventi organici di estrazione di grado analitico sono prodotti della Carlo Erba, (Milano, Italia), mentre quelli utilizzati in HPLC sono distribuiti dalla Romil (Cambridge, Gran Bretagna).

2. PREPARAZIONE DEGLI ESTRATTI

Allo scopo di individuare frazioni ad attività antinfiammatoria ed antimicrobica è stato seguito il metodo del frazionamento guidato dal saggio biologico, sia per i frutti di *H. rhamnoides* L. (HR) sia per le foglie di *P. major* L. (PM).

2.1. Preparazione degli estratti con solventi organici

Per entrambe le piante, si sono eseguite estrazioni sequenziali mediante macerazione con solventi a grado crescente di polarità, al fine di ottenere degli estratti contenenti sostanze a diverso grado di lipofilia.

Olivello spinoso. I frutti liofilizzati di HR (50-150 g) sono stati sottoposti ad estrazioni con 1-3 l di n-esano (Hex), acetato di etile (AcOEt) e metanolo (MeOH), a temperatura ambiente per 48 ore, sotto agitazione. Le soluzioni estrattive sono state filtrate e, dopo allontanamento dei solventi sotto vuoto, mediante evaporatore rotante a 35°C, si sono ottenuti gli estratti esanico, etilacetico e metanolico.

Piantaggine maggiore. Le foglie essiccate di PM (50-250 g) sono state sottoposte ad estrazioni sequenziali con 1-3 l di n-esano, cloroformio e metanolo, a temperatura ambiente per 48 ore. Le soluzioni estrattive sono state filtrate e, dopo allontanamento dei solventi sotto vuoto, mediante evaporatore rotante a 35°C, si sono ottenuti gli estratti esanico, cloroformico e metanolico.

2.2. Frazionamento degli estratti ottenuti con solventi organici

Gli estratti ottenuti sia da HR che da PM sono stati frazionati in colonna cromatografica di gel di silice, in fase diretta. Le frazioni così ottenute sono state portate a secco in rotavapor, sotto vuoto, ad una temperatura inferiore a 40°C e successivamente conservate a -20°C.

Olivello spinoso. Dall'estratto esanico, utilizzando come fase mobile una miscela di esano ed acetato di etile (8:2, v/v), si sono ottenute inizialmente 5 frazioni (fr. a-e). Utilizzando, invece, come fase mobile, una miscela di esano e dietilere (8:2, v/v), è stata ulteriormente purificata la b, dalla quale si sono ottenute tre subfrazioni (subfr. b1-b3).

L'estratto etilacetico è stato purificato in due passaggi cromatografici. Nel primo passaggio si sono ottenute 3 frazioni (fr. 1-3), con una miscela di eluizione costituita da esano ed acetato di etile (7:3, v/v). Nel secondo step, la frazione 3 è stata ulteriormente esaminata e si sono ottenute 4 subfrazioni (subfr. 3a-3d), con una fase mobile data da cloroformio e metanolo, in rapporto di 1:1 (v/v).

Piantaggine maggiore. L'estratto cloroformico è stato purificato utilizzando come eluente una miscela di cloroformio e metanolo (10:1, v/v), ottenendo 5 frazioni (fr.A-E). La frazione b è stata poi scomposta in 3 subfrazioni (subfr. B1-B3), con la stessa fase mobile. Dall'unione delle due sottofrazioni B2 e B3 è stata ottenuta la frazione β . Quest'ultima è stata sottoposta ad analisi cromatografica in fase inversa (RP-HPLC) al fine di quantificare gli acidi triterpenici presenti, sulla base delle rette di taratura ottenute utilizzando i composti di riferimento acido ursolico ed oleanolico (Zacchigna *et al.*, 2009). La colonna cromatografica era una LiChrosorb RP18 (5 μ m, 250 x 6 mm i.d., Perkin-Elmer), mentre la fase mobile era costituita da metanolo-acqua-tetraidrofurano (94:5:1, v/v), a pH 5 con acido acetico, con un flusso di 1 ml/min. L'analisi è avvenuta in condizioni isocratiche.

L'estratto metanolico di piantaggine è stato frazionato in colonna cromatografica Waters Symmetry C18 (3.5 μ m, 4.6 x 7,5 mm), con un flusso di 0.5 ml/min; la fase mobile era costituita da una soluzione di metanolo acquoso al 2%. L'analisi è avvenuta in condizioni isocratiche.

2.3. Preparazione degli estratti con solventi acquosi

Allo scopo di individuare frazioni polari ad attività antimicrobica sono state eseguite estrazioni in ambiente acquoso. Sia i frutti di HR che le foglie di PM sono stati sottoposti a diversi protocolli estrattivi, mirati principalmente alla ricerca di peptidi antimicrobici. Si è cercato quindi di sfruttare le caratteristiche principali di queste sostanze: le piccole dimensioni, la carica positiva netta, la tolleranza agli acidi ed ai solventi organici e la termostabilità.

Olivello spinoso. Per separare la porzione lipidica, i frutti liofilizzati di HR (100-400 g, peso fresco) sono stati estratti con etere di petrolio, per 3 volte e solo successivamente, sono stati sottoposti ad estrazione con soluzioni acquose, seguendo tre diversi approcci. In particolare, il residuo vegetale è stato estratto con:

- a) una soluzione acquosa di acido acetico allo 0.5% (0.1-1 l) prima a 4°C e poi a 50°C, per 1 h ciascuno; gli estratti ottenuti alle diverse temperature sono stati successivamente uniti;
- b) tampone sodio fosfato (SPB) (0.1-1 l a 4°C e successivamente a 50°C, per 3 h);
- c) tampone Tris-HCl 0.1 M pH 7.5 (per 1 h).

Le soluzioni estrattive sono state filtrate e liofilizzate, ottenendo gli estratti: a) OS-CH₃COOH, b) OS-SPB4C; OS-SPB50W, c) OS-TrisHCl.

Piantaggine maggiore. Analogamente, 1 Kg (peso secco) di foglie è stato sottoposto ad estrazione organica con etere di petrolio, per 3 volte, per evitare eventuali interferenze di sostanze lipofile presenti con la successiva estrazione di tipo acquoso. Il residuo è stato quindi estratto prima in tampone sodio fosfato (SPB) 10 mM, a 50°C (P_SPB) ed in seguito con una soluzione di acido acetico all'1%, sempre alla temperatura di 50°C (P_CH₃COOH).

2.4. Frazionamento degli estratti ottenuti con solventi acquosi

Gli estratti così ottenuti sono stati frazionati mediante tecniche cromatografiche, come lo scambio cationico (IEX), la gel filtrazione (GP) e la cromatografia liquida ad alta prestazione in fase inversa (RP-HPLC).

La cromatografia a *scambio ionico* è stata effettuata utilizzando una resina cationica (weak cation exchange; Biorad Cellex-CM), in una colonna di 1x10 cm; la fase mobile era composta per tutte le analisi dal solvente A, costituito da sodio fosfato (NaH₂PO₄ 20 mM, pH 4.5) e dal solvente B, una soluzione contenente A e sodio cloruro (NaCl 1M). Il gradiente di eluizione della fase mobile è stato specifico per ogni analisi. La velocità del flusso è sempre stata pari a 0.8 ml/min.

La separazione cromatografica mediante *gel filtrazione* è stata effettuata utilizzando la resina Sephadex G-50, che consente la separazione delle molecole con un peso compreso tra 1500-30000 D, in una colonna di 1x10 cm. Come eluente è stato utilizzato tampone sodio fosfato (SPB) 10 mM, con un flusso di 5 ml/min.

Olivello spinoso. OS-CH₃COOH. Parte dell'estratto è stato eluito su colonna cromatografica a *scambio ionico*, ottenendo 3 frazioni (fr. 1-3), secondo un gradiente di eluizione che variava da 0 a 50% di B in 60 minuti. Ciascuna di queste è stata analizzata in cromatografia RP-HPLC, in colonna Waters Symmetry C18 (3.5 µm, 4.6 x 75 mm) ad una velocità di flusso di 0.8 ml/min. Per ogni frazione è stato utilizzato un gradiente specifico, dato dalla miscela di solvente A, costituito da una soluzione acquosa di acido trifluoroacetico allo 0.05% e di solvente B, costituito da acetonitrile contenente acido trifluoroacetico allo 0.05%): per la frazione 1, il gradiente prevedeva il passaggio in colonna dello 0.7% del solvente B al minuto, invece, per le frazioni 2 e 3, un 3% di B al minuto. Per ognuna delle 3 frazioni sono state raccolte 5 subfrazioni.

Una seconda aliquota è stata invece analizzata in cromatografia a *gel filtrazione*, eluendo 4 frazioni diverse (fr. I-IV). Solamente la frazione II, la più abbondante, è stata sottoposta ad ulteriore cromatografia RP-HPLC, ottenendo 6 subfrazioni (subfr. IIA-IIF) (Tabella 1). Le condizioni di analisi cromatografica in fase inversa erano le medesime, come già riportato ed il gradiente utilizzato prevedeva un 3% del solvente B al minuto.

Tabella 1. Schema di frazionamento dell'estratto ottenuto con acido acetico allo 0.5% (4°C, 50°C).

	IEX	RP-HPLC	GP	RP-HPLC
OS-CH ₃ COOH	fr. 1-3	fr. 1 → subfr. 1A-1D fr. 2 → subfr. 2A-2D fr. 3 → subfr. 3A-3D	fr. I-IV	fr. II → subfr. IIA-IIF

OS-SPB4C; OS-SPB50W. Entrambi gli estratti sono stati analizzati con la stessa procedura. Parte dell'estratto SPB4C è stato eluito su colonna cromatografica a *scambio ionico*, ottenendo 2 frazioni (fr. 1-2), secondo un gradiente di eluizione che variava da 15 a 50% di B in 60 minuti. Ciascuna di queste è stata analizzata in cromatografia RP-HPLC (Waters Symmetry C18, 3.5 µm, 4.6 x 75 mm) ad velocità di flusso di 0.8 ml/min, con un gradiente di 3% di B al minuto. Per la frazione 1 sono state raccolte 3 subfrazioni (subfr. 1A-1C), mentre per la 2, ne sono state eluite 2 (subfr. 2A-2B). Una seconda aliquota è stata invece analizzata in cromatografia a *gel filtrazione*, eluendo 2 frazioni diverse (fr. I-II). Entrambe le frazioni sono state sottoposte a cromatografia RP-

HPLC (Waters Symmetry C18, 3.5 μm , 4.6 x 75 mm, velocità di flusso di 0.8 ml/min, gradiente di 3% di B al minuto), ottenendo per la I una sola subfrazione (subfr. IA) e per la II, 6 (subfr. IIA-IIF).

Parte dell'estratto SPB50W è stato eluito su colonna cromatografica a *scambio ionico*, ottenendo una sola frazione (fr. 1), secondo un gradiente di eluizione che variava da 15 a 50% di B in 60 minuti. Questa è stata analizzata in cromatografia RP-HPLC (Waters Symmetry C18, 3.5 μm , 4.6 x 75 mm, velocità di flusso di 0.8 ml/min, gradiente di 3% di B al minuto). Per la frazione 1 sono state raccolte 4 subfrazioni (subfr. 1A-1D). Una seconda aliquota è stata invece analizzata in cromatografia a *gel filtrazione*, eluendo 2 frazioni diverse (fr. I-II) (Tabella 2).

Tabella 2. Schema di frazionamento dell'estratto ottenuto con tampone sodio fosfato 10 mM (4°C, 50°C).

	IEX	RP-HPLC	GP	RP-HPLC
OS-SPB4C	fr. 1-2	fr.1 \rightarrow subfr. 1A-1C fr.2 \rightarrow subfr. 2A-2B	fr. I-II	fr. I \rightarrow subfr. IA fr. II \rightarrow subfr. IIA-IIF
	IEX	RP-HPLC	GP	RP-HPLC
OS-SPB50W	fr. 1	fr. 1 \rightarrow subfr. 1A-1D	fr. I-II	/

OS-TrisHCl. Dopo un paio di lavaggi con acqua, il residuo di estrazione è stato ulteriormente estratto con una soluzione di litio cloruro 1.5M (LiCl), per un'ora sotto agitazione. Per eliminare il sale, che avrebbe interferito nei test antimicrobici, è stato necessario dializzare contro acqua per 3 giorni, utilizzando una membrana Spectra-Por da 1000 MWCO. La soluzione dializzata è stata poi ultracentrifugata (13000 rpm, per 15 minuti), filtrata (0.45 μm) e liofilizzata. Dopo risospensione, sono stati aggiunti due volumi di acetone, per ottenere la precipitazione delle proteine eventualmente presenti. Il precipitato ottenuto, di aspetto gelatinoso, è stato analizzato in cromatografia RP-HPLC (Waters Symmetry C18, 0.5x7.5 cm, velocità di flusso di 0.8 ml/min, gradiente di 3% di B al minuto), da cui sono state raccolte 2 frazioni (fr. 1-2).

Piantaggine maggiore. Sia l'estratto in tampone sodio fosfato, P_SPB, che quello in acido acetico all'1%, P_CH₃COOH, sono stati analizzati prima in scambio cationico e poi in fase inversa.

La cromatografia a scambio cationico di entrambi gli estratti ha portato all'eluizione di una sola frazione (SPB_B, CH₃COOH_B), secondo un gradiente di eluizione che variava da 0 a 100% di B in 20 minuti. Successivamente sia le frazioni eluite in A (SPB_A, CH₃COOH_A) che quelle eluite in B sono state analizzate in colonna cromatografica a fase inversa (Xterra RP18, 7µm, 19x300 mm) secondo un gradiente di eluizione che variava da 0 a 90%B in 30 minuti, con una velocità di flusso di 5 ml/min. Dalla frazione SPB_A sono state ottenute 2 subfrazioni (SPB_A1-A2) e dalla frazione SPB_B, 5 subfrazioni (SPB_B1-B5). Per quel che riguarda CH₃COOH_A, sono state separate 2 subfrazioni (CH₃COOH_A1-A2) così come per CH₃COOH_B (CH₃COOH_B1-B2).

3. ANALISI DEGLI ESTRATTI E DELLE FRAZIONI

3.1. Cromatografia su strato sottile (TLC)

Gli estratti e le relative frazioni sono stati ridisciolti nei relativi solventi di purificazione alla concentrazione di 10 mg/ml. Successivamente, con l'aiuto di un capillare, sono stati depositati 10 µl di ciascuna soluzione sulla lastra in gel di silice per TLC (3x10 cm), a 1 cm dal bordo inferiore. La lastra è stata quindi inserita nella camera di sviluppo, contenente 10 ml di eluente ed opportunamente saturata.

Nel caso di HR sono stati utilizzati i seguenti eluenti: esano ed acetato di etile in rapporto 8:2 (v/v) per l'estratto esanico e le corrispondenti frazioni; esano e acetato di etile in rapporto 7:3 (v/v) per l'estratto etilacetico e le relative frazioni.

Nel caso degli estratti di PM ottenuti mediante solventi organici e delle relative frazioni, l'eluente impiegato era costituito da una miscela di cloroformio e metanolo in rapporto 10:1 (v/v).

Dopo la separazione cromatografica, la lastra è stata rimossa, asciugata e immersa in una soluzione di acido solforico in miscela cromica o in una miscela di permanganato di potassio in H₂SO₄ concentrato e successivamente riscaldata a 120°C per la rivelazione delle bande cromatografiche.

3.2. Spettrometria e risonanza magnetica nucleare

Le tecniche di spettrometria sono state utilizzate per l'identificazione di composti puri, isolati dalle frazioni attive. Le tecniche e gli strumenti utilizzati sono:

- Spettrofotometria UV: Ultraspec 2100 pro UV/Visible spectrophotometer, Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK),
- Spettrometria di massa: Esquire 4000, Bruker Daltonics (Billerica, USA),
- Spettrometria IR: Vertex 70 FTIR, Bruker Optics (Billerica, USA),
- Risonanza magnetica nucleare ($^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$): Varian Gemini 200 MHz (Palo Alto, USA).

4. ATTIVITA' BIOLOGICHE

4.1. Attività antinfiammatoria *in vivo*

La sperimentazione è stata condotta in conformità alla normativa vigente che regola l'impiego di animali a scopi scientifici (DL 116 del 27 gennaio 1992) e con le direttive dell'European Communities Council del 24 novembre 1986 (86/609/ECC).

L'attività antinfiammatoria topica è stata valutata mediante il test di inibizione della dermatite da Olio di Croton nel padiglione auricolare del topo, come descritto da Tubaro et al. (1985). Gli animali sono stati tabulati in gruppi da 5 e mantenuti per almeno una settimana nello stesso ambiente dove è stata eseguita la sperimentazione, a temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e d'umidità relativa (50-60%) costanti, in presenza di un ciclo fisso di illuminazione artificiale (07.00-19.00). Tutti gli esperimenti sono stati iniziati sempre in tarda mattinata (10.00–12.00).

Gli animali sono stati anestetizzati con ketamina cloridrato (145 mg/kg, per via intraperitoneale) e il processo infiammatorio è stato indotto sulla superficie interna del padiglione auricolare (superficie: 1 cm^2) dell'orecchio destro applicando 80 μg di olio di Croton, disciolti in 15 μl di acetone o di una soluzione acquosa di etanolo al 42%. Il padiglione auricolare sinistro non è stato trattato. Gli animali di controllo sono stati trattati con la soluzione (15 μl) contenente il solo irritante. Dopo 6 ore dall'induzione della flogosi, quando l'edema degli animali di controllo è massimo, i topi sono stati sacrificati mediante dislocazione cervicale. Da entrambi padiglioni auricolari, è stato prelevato un dischetto del diametro di 6 mm per quantificare l'edema, indice dell'entità della risposta flogistica. L'edema è stato misurato come variazione in peso tra il

dischetto prelevato dal padiglione auricolare infiammato e quello controlaterale, non trattato. L'attività antinfiammatoria è stata espressa come percentuale di riduzione dell'edema nei topi trattati con le sostanze da testare, rispetto ai topi di controllo.

4.2. Attività antimicrobica *in vitro*

4.2.1. Determinazione della minima concentrazione inibente la crescita (MIC)

L'attività antimicrobica degli estratti, delle loro frazioni e/o dei composti puri è stata determinata valutando la minima concentrazione inibente la crescita batterica (MIC: minimum inhibitory concentration), attraverso il metodo delle micro diluizioni. L'attività è stata valutata sia su ceppi standard che su ceppi di isolamento clinico ottenuti da pecore con mastite. I ceppi standard erano i seguenti: *Staphylococcus aureus* ATCC, *S. aureus* 710A, *S. aureus* 305A, *Staphylococcus epidermidis* 19, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC, *Escherichia coli* ATCC, *E. coli* ML-35, *Salmonella enteritidis* H2, *Streptococcus faecalis* 2903 ed il ceppo di alga *Prototheca mastitis*. I ceppi di isolamento clinico erano: *Staphylococcus aureus* 569, *Staphylococcus epidermidis* 41718-80, *Staphylococcus haemolyticus* 41718-111. E' stata inoltre valutata, attraverso lo stesso metodo, anche l'attività antimicotica verso *Candida albicans* ATCC.

La determinazione delle MIC è stata effettuata in piastre microtiter da 96 pozzetti, usando una concentrazione batterica di 5×10^5 unità formanti colonie (CFU)/ml in fase di crescita logaritmica, in terreno Mueller Hinton (MH) al 5% e al 30%. Dopo una notte di incubazione, il valore di MIC corrispondeva alla più bassa concentrazione di campione nel pozzetto, in cui non era visibile una crescita batterica.

Le sostanze idrosolubili sono state disciolte nel brodo di coltura, mentre quelle liposolubili sono state disciolte in dimetilsolfossido (DMSO) e successivamente diluite nel terreno affinché la concentrazione di DMSO nel pozzetto non superasse il 5%, evitando così interferenze del solvente con la crescita dei microorganismi. Ogni determinazione è stata effettuata in triplicato.

4.2.2. Valutazione del sinergismo di attività antimicrobica mediante saggio di MIC di tipo checkerboard.

Al fine di valutare l'eventuale sinergismo di attività tra sostanze ad azione antibatterica, sono stati allestiti saggi MIC di tipo *checkerboard*, in triplicato (Botelho, 2000; Yan & Hancock, 2001). È stata verificata la sinergia tra l'acido ursolico e l'acido

oleanolico e tra l'acido ursolico e la kanamicina, usata come antibatterico di riferimento.

L'attività sinergica è stata valutata aggiungendo combinazioni di due composti in esame, in diluizione seriale, nei pozzetti di piastre microtiter contenenti 5×10^5 CFU/ml di batteri. In particolare, sono stati utilizzati 4 ceppi standard, ossia *S. aureus* ATCC, *E. coli* ATCC, *S. epidermidis* 19 e *E. faecalis* ATCC, nonché un ceppo di isolamento clinico di *S. epidermidis* da mastite ovina. Le due sostanze testate (A e B) sono state diluite, rispettivamente, in maniera seriale lungo l'ordinata e l'ascissa della piastra a multipozzetti, in modo da ottenere tutte le combinazioni delle concentrazioni delle sostanze esaminate (Figura 9). Ogni determinazione è stata effettuata in triplicato.

A6	A6/ B1	A6/ B2	A6/ B3	A6/ B4	A6/ B5	A6/ B6					
A5	A5/ B1	A5/ B2	A5/ B3	A5/ B4	A5/ B5	A5/ B6					
A4	A4/ B1	A4/ B2	A4/ B3	A4/ B4	A4/ B5	A4/ B6					
A3	A3/ B1	A3/ B2	A3/ B3	A3/ B4	A3/ B5	A3/ B6					
A2	A2/ B1	A2/ B2	A2/ B3	A2/ B4	A2/ B5	A2/ B6					
A1	A1/ B1	A1/ B2	A1/ B3	A1/ B4	A1/ B5	A1/ B6					
	B1	B2	B3	B4	B5	B6					

Figura 9. Schema di allestimento della piastra per i saggi *checkerboard*.

La sinergia è stata valutata attraverso la determinazione del valore di concentrazione inibente frazionale (FIC; “fractional inhibitory concentration”), secondo la formula:

$$\mathbf{FIC = FIC_A + FIC_B.}$$

$$\mathbf{(FIC_A = MIC_A \text{ in combinazione} / MIC_A; FIC_B = MIC_B \text{ in combinazione} / MIC_B)}$$

MIC_A e MIC_B sono i valori di MIC dei composti A e B da soli. Gli indici di FIC sono stati interpretati come segue: quando il valore di FIC è inferiore o uguale a 0.5, c'è

un effetto sinergico; quando il valore è compreso tra 0.5 e 2.0 le due sostanze non interferiscono tra loro; quando il valore di FIC è maggiore a 2, vi è antagonismo.

4.2.3. Valutazione dell'attività sulla cinetica di crescita batterica

L'attività sulla cinetica di crescita batterica è stata valutata utilizzando un lettore per micropiastre (Tecan Trading AG, Switzerland). Nei pozzetti di una micro piastra sono stati dispensati, in triplicato, 20 μ l di una soluzione madre del campione, ad una concentrazione di 10 mg/ml, e 180 μ l di una sospensione batterica 10^6 cellule/ml preparata in Mueller Hinton. Le piastre così allestite sono state incubate nel lettore per micropiastre a 37°C per 4 ore e la crescita batterica è stata monitorata misurando l'assorbanza a 600 nm ogni 10 minuti. L'assorbanza, proporzionale alla crescita batterica, è stata confrontata con quella del controllo negativo, in cui i batteri sono stati incubati in assenza della sostanza in esame.

4.2.4. Valutazione della cinetica di uccisione (“time killing”)

La cinetica di uccisione batterica è stata determinata per l'acido ursolico, nei confronti dei ceppi standard *Staphylococcus aureus* ATCC e *S. epidermidis* ATCC e del ceppo *S. epidermidis* 41718-80, da isolamento clinico di mastite ovina. Le concentrazioni del composto in esame utilizzate per il saggio sono state determinate sulla base dei valori di MIC relativi ai singoli ceppi batterici. Il potere battericida è stato espresso come la differenza numerica di cellule vitali, prima e dopo vari tempi di incubazione dei batteri con diverse concentrazioni della sostanza in esame (30, 60, 90, 120 e 360 minuti).

I batteri, in fase logaritmica di crescita, sono stati diluiti alla concentrazione di 1×10^6 CFU/ml in terreno MH ed incubati con l'acido ursolico (0.2 mg/ml nel caso di *S. aureus* ATCC o 0.05 e 0.3 mg/ml nel caso di *S. epidermidis* ATCC e 41718-80). Parallelamente è stata preparata una sospensione batterica di controllo, priva del composto. Le sospensioni ottenute sono state poi incubate in un bagno termostato a 37°C, secondo i tempi di incubazione stabiliti.

La sospensione batterica iniziale (1×10^6 CFU/ml) è stata sottoposta a diluizioni seriali e, 50 μ l delle diluizioni 10^{-3} e 10^{-4} sono stati piastrati, in doppio, su terreno agar MH per determinare l'effettiva concentrazione iniziale di batteri.

Ad ogni tempo di incubazione, le sospensioni batteriche sono state diluite serialmente fino a diluizioni 10^{-4} e 50 μl di ciascuna diluizione sono stati piastrati su agar MH, in duplicato ed incubati *overnight* a 37°C .

I dati espressi come CFU/ml sono stati calcolati come la media di ogni dato in duplicato. Ad ogni tempo sono state piastrate anche le diluizioni 10^{-3} e 10^{-4} della soluzione di controllo per verificare la crescita batterica.

4.3. Attività citotossica

4.3.1. Valutazione della citotossicità mediante il saggio dell'MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro)

La vitalità cellulare è stata quantificata attraverso il saggio dell'MTT, un metodo colorimetrico che determina la quantità di formazano prodotto a livello mitocondriale dalle cellule vive (Tada *et al.*, 1986). Esso è basato sulla capacità delle deidrogenasi mitocondriali delle cellule vive di trasformare il sale di tetrazolio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro], di colore giallo, in formazano, di colore viola. La quantità di formazano prodotta è proporzionale al numero di cellule vive, ossia metabolicamente attive. I saggi sono stati condotti impiegando monociti umani (U-937), differenziati a macrofagi dopo trattamento con forbolo miristato acetato (PMA, 50 ng/ml). Le cellule sono state coltivate in terreno completo, costituito per l'88% di terreno RPMI, dal 10% di siero bovino fetale, dall'1% di una soluzione di antibiotici (100 U/ml di penicillina e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di streptomina) e dall'1% di una soluzione 2mM di L-Glutamina. Le cellule (1×10^5 cell/pozzetto) sono state incubate in piastre sterili da 96 pozzetti con 50, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di acido ursolico o di acido oleanolico per un'ora e per 24 ore, a 37°C ed in presenza di un'atmosfera al 5% in CO_2 . Dopo un lavaggio con 200 μl di tampone PBS 0.1 M, le cellule sono state incubate con MTT (5 mg/ml) per 4 ore a 37°C . A fine incubazione, i cristalli di formazano, che si sono formati, sono stati solubilizzati aggiungendo ad ogni pozzetto 100 μl di Igepal-HCl (0.01 N) ed incubando *overnight* in termostato. La densità ottica è stata quindi misurata alla lunghezza d'onda di 570 nm e la vitalità cellulare è stata espressa come percentuale dei valori di assorbanza relativi alle cellule incubate con i composti in esame, rispetto all'assorbanza dei controlli, in assenza dei composti in esame.

4.3.2. Valutazione delle proprietà emolitiche

L'attività emolitica dell'acido ursolico e dell'acido oleanolico è stata saggiata su eritrociti umani. Una sospensione all'1% di eritrociti è stata preparata in tampone PBS (SPB 10mM e NaCl 139mM, pH 7.4). Entrambi i triterpeni sono stati testati alle concentrazioni di 0.05 e 0.1 mg/ml. La sospensione cellulare è stata incubata con ciascuno dei due composti, in duplicato, a 37°C per 30 minuti. Al termine dell'incubazione, la reazione di lisi è stata arrestata con l'aggiunta di PBS freddo. I campioni sono stati tenuti in ghiaccio e successivamente centrifugati a 5000 rpm per 5 minuti. Il surnatante è stato trasferito in una piastra microtiter e l'assorbanza è stata misurata a 405 nm. La percentuale di emolisi è stata calcolata rispetto ad un controllo positivo, in cui è stata ottenuta una lisi del 100% con una soluzione all'1% di TritonX-100. Parallelamente, è stato preparato un bianco, in cui la sospensione diluita di eritrociti è stata incubata con il solo tampone.

La formula utilizzata per determinare la percentuale di emolisi è:

$\% \text{ emolisi} = (A_x - A_b) / (A_t - A_b) \times 100$, in cui A_b è l'assorbanza a 405 nm del bianco, A_x quella del campione e A_t quella del controllo positivo.

5. PREPARAZIONE DELLE FORMULAZIONI

Al fine di preparare una formulazione per la somministrazione intramammaria dei principi antinfiammatori e/o antibatterici nelle pecore, sono stati valutati:

- a) la composizione in eccipienti più idonea al principio attivo e al tipo di somministrazione,
- b) la stabilità e la possibilità di sterilizzare la formulazione.

La formulazione preparata è un gel, ottenuto impiegando i seguenti eccipienti: paraffina liquida e solida, come base; metil p-idrossibenzoato, come conservante; magnesio stearato, come lubrificante e silice, come viscosizzante. La forma farmaceutica, contenente il 16% (500 mg/3 g) di acido ursolico o kanamicina solfato, è stata preparata a caldo e poi aliquotata nelle siringhe per inoculazione intramammaria (3 g in siringhe da 5 ml), a temperatura ambiente. La preparazione e il riempimento delle candlette è avvenuta sotto cappa a flusso laminare.

6. SPERIMENTAZIONE PRE-CLINICA *IN VIVO*

Allo scopo di verificare l'efficacia della formulazione a base di acido ursolico nel trattamento della mastite, in collaborazione con l'Università di Udine, è stata avviata una sperimentazione nelle pecore.

In particolare, lo studio è condotto su un gruppo di 18 ovini, a cui è stata indotta un'infezione della ghiandola mammaria con inoculo di *S. epidermidis* 41718-80 (1×10^7 CFU/ml). Il giorno successivo all'inoculo, nelle singole emimammelle verranno iniettate le formulazioni di acido ursolico o di kanamicina solfato, oppure il solo veicolo dei due composti, secondo il seguente schema (Tabella 3):

Tabella 3. Combinazioni dei trattamenti utilizzate nell'esperimento *in vivo*.

Combinazioni: 18 animali totali		
Rip.1	Rip.2	Rip.3
0 – 1	0 – 1	0 – 1
0 – 2	0 – 2	0 – 2
0 – 3	0 – 3	0 – 3
1 – 2	1 – 2	1 – 2
1 – 3	1 – 3	1 – 3
2 – 3	2 – 3	2 – 3

0 – CTRL sano (PBS)
1 – CTRL infetto non trattato (formulazione con solo eccipienti).
2 – mammella infetta trattata con kanamicina.
3 – mammella infetta trattata con a. ursolico.

7. ANALISI STATISTICA

I dati sono stati analizzati mediante il test “t” di Student, accettando come significativi i valori di $p < 0.05$. La dose in grado di inibire l'edema del 50% (DI_{50}) è stata calcolata mediante interpolazione grafica dalle rette che pongono in relazione il logaritmo delle dosi somministrate con l'inibizione dell'edema misurata.

RISULTATI E DISCUSSIONE**1. Olivello spinoso (OS)****1.1. Estrazione mediante solventi organici****1.1.1. Preparazione degli estratti**

Le drupe di olivello spinoso (0.5-1 Kg) sono state sottoposte a liofilizzazione, riscontrando un contenuto in acqua pari all'86%. La fase preliminare di liofilizzazione ha permesso di eseguire le successive estrazioni dei frutti mediante solventi organici, evitando l'interferenza dell'acqua e la formazione di emulsioni. L'estrazione dei frutti freschi risulta essere, infatti, piuttosto complessa, dato che il loro succo è composto di tre fasi: 1) una fase oleosa che si dispone in alto nella sospensione, 2) il succo opalescente nello strato intermedio e 3) un sedimento spesso sul fondo. Eliminando l'acqua, non sono stati necessari passaggi intermedi per ottimizzare le estrazioni successive (Arimboor *et al.*, 2006).

I frutti (70.7 g) sono stati quindi sottoposti ad estrazioni sequenziali con *n*-esano (Hex), acetato di etile (AcOEt) e metanolo (MeOH). Dopo filtrazione delle soluzioni estrattive e l'evaporazione dei solventi, si sono ottenuti i relativi estratti esanico, etilacetico e metanolico, con le rese di estrazione sono riportate in Figura 10.

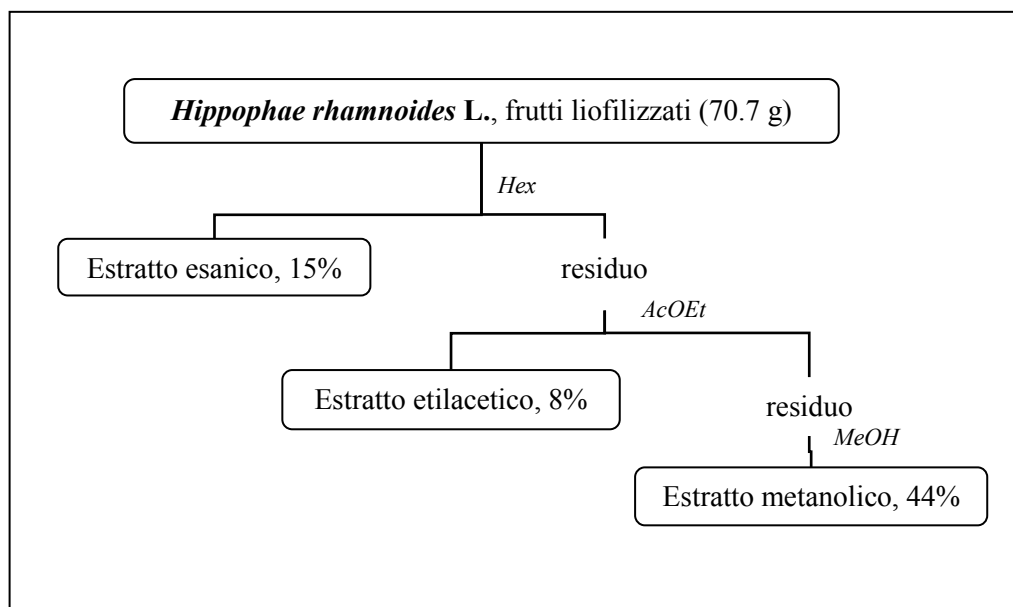


Figura 10. Schema e rese di estrazione dei frutti di OS.

1.1.2. Attività antinfiammatoria degli estratti

I tre estratti sono stati sottoposti al test di attività antinfiammatoria topica, valutata come inibizione della dermatite da olio di Croton nel padiglione auricolare del topo, al fine di individuare quelli più attivi. Ciascun estratto è stato somministrato alla dose di 300 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ e l'attività è stata confrontata con quella del farmaco antinfiammatorio non steroideo indometacina, somministrata alla dose di 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

I risultati ottenuti hanno evidenziato come solo l'estratto esanico e l'estratto etilacetico siano attivi, avendo determinato una riduzione dell'edema pari a rispettivamente 43% e 68%. Come riferimento, l'indometacina ha provocato un'inibizione dell'edema pari al 60% (Tabella 4).

Tabella 4. Attività antinfiammatoria topica degli estratti dei frutti di OS.

Sostanza	Dose ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	N° animali	Edema (mg) Media \pm E.S.	Riduzione %
Controlli	--	10	6.9 \pm 0.2	--
Estratto esanico	300	10	3.9 \pm 0.2*	43
Estratto etilacetico	300	10	2.2 \pm 0.3*	68
Indometacina	100	10	2.9 \pm 0.3*	60
Controlli	--	10	6.2 \pm 0.3	--
Estratto metanolico	300	10	5.4 \pm 0.4	13

* $p < 0.05$ al test "t" di Student, rispetto ai controlli.

Gli estratti esanico ed etilacetico sono stati studiati più in dettaglio, verificandone la relazione dose-effetto in confronto a quella dell'indometacina. L'estratto esanico, pur non avendo determinato un'inibizione significativa dell'edema alla dose più bassa somministrata (100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), è stato in grado di indurre una riduzione dell'edema di tipo dose-dipendente. Infatti, alle dosi di 300 e 1000 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ esso ha indotto rispettivamente il 35% ed il 46% di inibizione. Analogamente, l'estratto etilacetico non ha rivelato un'attività significativa alla dose più bassa (100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), ma è stato in grado di indurre il 50% ed il 60% di riduzione dell'edema, rispettivamente a 300 e 1000 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Il farmaco di riferimento indometacina, alla dose più bassa (30

$\mu\text{g}/\text{cm}^2$), non ha esercitato un effetto significativo, mentre ha ridotto l'edema del 54% e dell'82 % alle dosi di 100 e 300 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, rispettivamente (Tabella 5).

Tabella 5. Relazione dose-effetto degli estratti esanico, etilacetico e dell'indometacina.

Sostanza	Dose ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	N° animali	Edema (mg) Media \pm E.S.	Riduzione %
Controlli	--	10	6.8 \pm 0.3	--
Estratto esanico	100	10	6.2 \pm 0.3	9
	300	10	4.4 \pm 0.2*	35
	1000	10	3.7 \pm 0.3*	46
Estratto etilacetico	100	10	5.9 \pm 0.3	13
	300	10	3.4 \pm 0.2*	50
	1000	10	2.7 \pm 0.3*	60
Indometacina	30	10	5.7 \pm 0.4	16
	100	10	3.1 \pm 0.3*	54
	300	10	1.2 \pm 0.2*	82

* $p < 0.05$ al test "t" di Student, rispetto ai controlli.

Dalle rette di regressione che pongono in relazione le dosi somministrate con l'inibizione dell'edema sono stati calcolati i valori di DI_{50} (dose in grado di inibire l'edema del 50%), quale indice della potenza antinfiammatoria. Il valore di DI_{50} determinato dell'estratto esanico, superiore alla dose più alta provata, è stato estrapolato a 1088 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, mentre quello dell'estratto etilacetico è pari a 485 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, risultando oltre due volte più attivo. L'indometacina, come atteso, è risultata notevolmente più attiva, rivelando un valore di DI_{50} pari a 94 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

I due estratti attivi, quello esanico e quello etilacetico, sono stati ulteriormente studiati al fine di individuare i principi attivi.

1.1.3. Frazionamento “bioassay-oriented” dell’estratto esanico

Dall’estratto esanico (10.5 g), sottoposto a separazione cromatografica mediante colonna di gel di silice, sono state ottenute cinque frazioni (frazioni **a-e**), le cui rese sono riportate in Figura 11.

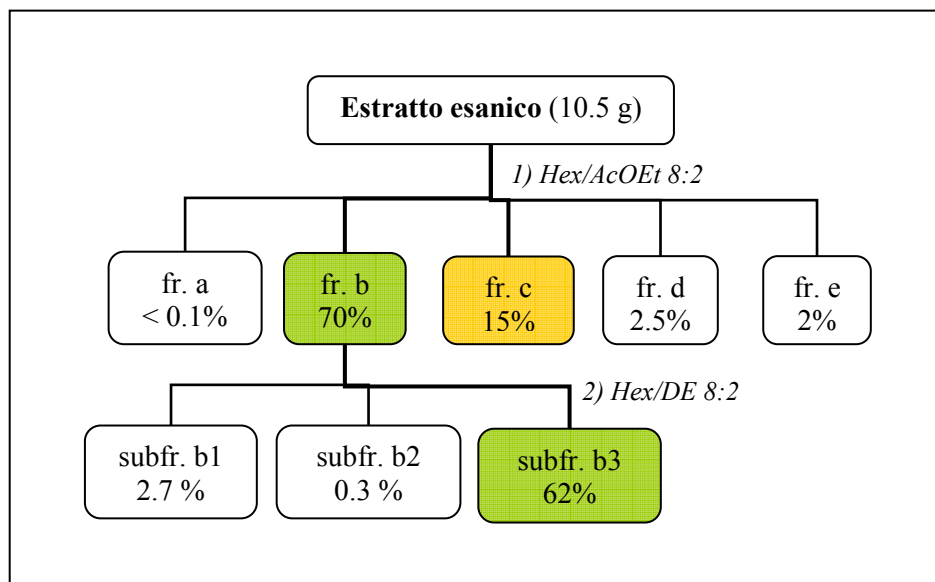


Figura 11. Schema e rese di frazionamento dell’estratto esanico dei frutti di OS.

Le frazioni **b-e**, ottenute in quantità sufficienti per il saggio di attività antinfiammatoria, sono state sottoposte al test di inibizione della dermatite da olio di Croton. A tale scopo, ogni frazione è stata somministrata ad una dose corrispondente a 300 µg di estratto esanico di partenza, in base alle rese di frazionamento. I risultati ottenuti, riportati in Tabella 6, evidenziano come l’attività antiflogistica dell’estratto esanico (46% di inibizione dell’edema alla dose di 300 µg/cm²) sia passata nella frazione **b** (41% di inibizione dell’edema) e, in minor misura, nella frazione **c** (30% di riduzione dell’edema). Le altre frazioni provate non hanno invece rivelato un’attività significativa.

Tabella 6. Attività antinfiammatoria topica delle frazioni dell'estratto esanico dei frutti di OS.

Sostanza	Dose ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	N° animali	Edema (mg) Media \pm E.S.	Riduzione %
Controlli	--	10	7.1 \pm 0.3	--
Estratto esanico	300	10	3.8 \pm 0.2*	46
Frazione b	209°	10	4.2 \pm 0.3*	41
Frazione c	46°	10	5.0 \pm 0.3*	30
Frazione d	8°	10	6.5 \pm 0.2	8
Frazione e	5°	10	6.4 \pm 0.3	10
Indometacina	100	10	2.8 \pm 0.3*	61

* $p < 0.05$ al test "t" di Student, rispetto ai controlli; °dose equivalente a 300 μg di estratto esanico.

Dall'analisi mediante cromatografia su strato sottile è emerso che la frazione **b** non è pura e che le bande cromatografiche sono sovrapponibili a quelle della frazione **c**. La frazione **b**, in cui si concentra l'attività dell'estratto esanico, è stata ulteriormente separata mediante colonna di gel di silice, ottenendo tre subfrazioni (subfrazioni **b1-b3**), con le rese riportate in Figura 11.

Le subfrazioni **b1** e **b3**, ottenute in quantità sufficienti per il saggio biologico, sono state sottoposte al test di attività antinfiammatoria, alle dosi corrispondenti a 209 μg di frazione **b** ed equivalenti a 300 μg di estratto esanico. I risultati ottenuti hanno rivelato come l'attività della frazione **b** (43% di riduzione dell'edema) sia passata quasi integralmente nella frazione **b3** (34% di riduzione dell'edema), mentre la frazione **b1** non ha esercitato un effetto significativo (Tabella 7).

La frazione **b3** e la frazione **c** sono state studiate dal punto di vista chimico mediante analisi $^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$ (Tabella 8), che hanno indicato come esse siano costituite da una miscela complessa di trigliceridi. È stata, quindi, effettuata l'idrolisi alcalina dei trigliceridi per individuare la loro composizione in acidi grassi. Dai risultati ottenuti, è emerso che l'acido palmitico e palmitoleico rappresentano i principali acidi grassi dei trigliceridi presenti, sia nella subfrazione **b3** che nella frazione **c** e che queste presentano un contenuto in acidi grassi esterificati tra loro analogo (Tabella 9).

Tabella 7. Attività antinfiammatoria topica delle subfrazioni **b1** e **b3** dell'estratto esanico dei frutti di OS.

Sostanza	Dose ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	N° animali	Edema (mg) Media \pm E.S.	Riduzione %
Controlli	--	10	7.0 \pm 0.3	--
Frazione b	209	10	4.0 \pm 0.2*	43
Subfrazione b1	8°	10	6.3 \pm 0.3	10
Subfrazione b3	197°	10	4.6 \pm 0.4*	34
Indometacina	100	10	2.7 \pm 0.3*	61

* $p < 0.05$ al test "t" di Student, rispetto ai controlli; °dose equivalente a 209 μg di frazione **b**.

Tabella 8. Dati ^1H - e ^{13}C -NMR della fraz. **c** di OS, in CDCl_3 (ppm, J in H_2).

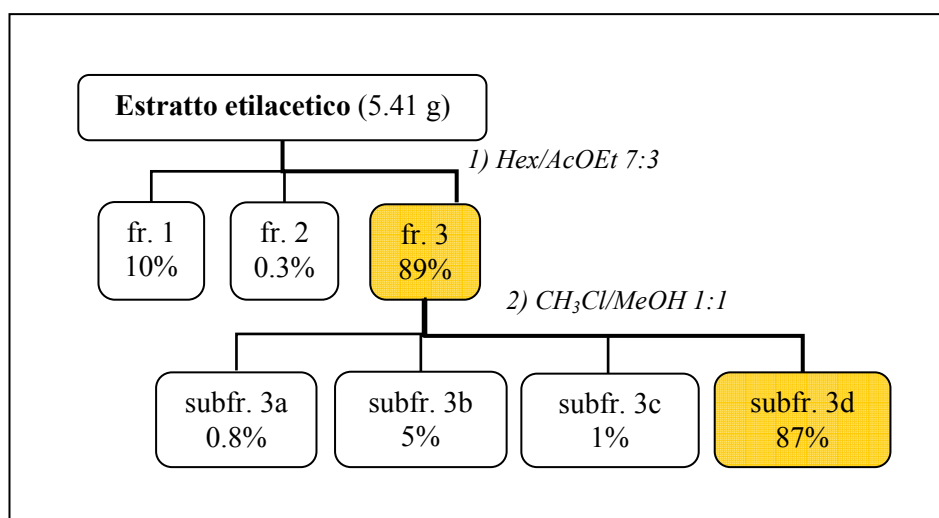
Atomo	^1H (δ)	^{13}C (δ)
1a, 3a	4.12 (dd; J=11.9)	62.0
1b, 3b	4.25 (dd; J=11.9)	62.0
2	5.24 (m)	68.8
1''	-	173.1
1', 1'''	-	172.1
2', 2'', 2'''	2.30 (t; J=7.6)	34.2, 34.0
COCH_2CH_2	1.60 (m)	25.6
CH_2 alif.	1.25 (m)	22.5, 22.6, 22.7, 24.8, 27.2-29.6
$\text{CH}=\text{CHCH}_2$	2.02 (m)	27.1
CH_3	0.87 (br t)	14.1
$=\text{CH}_2=$	2.83 (m)	25.7
$\text{CH}=\text{CH}$	5.35 (m)	127.8-131.8

Tabella 9. Acidi grassi nella subfrazione **b3** e nella frazione **c** dell'estratto esanico di OS.

Acidi grassi	Subrazione b3 (%)	Frazione c (%)
C16 (ac. palmitico)	33.16	31.64
C16:1 n7 (ac. palmitoleico)	37.39	38.36
C18 (ac. stearico)	0.7	0.63
C18:1 n9 (ac. oleico)	10.88	10.11
C18:2 n6 (ac. linoleico)	14.17	14.86
C20 (ac. arachidico)	3.71	4.42

1.1.4. Frazionamento “bioassay-oriented” dell'estratto etilacetico

Dall'estratto etilacetico (5.41 g), sottoposto a separazione mediante cromatografia su colonna di gel di silice, sono state ottenute tre frazioni (frazioni **1-3**), con le rese riportate in figura 12.

**Figura 12.** Schema e rese di frazionamento dell'estratto etilacetico dei frutti di OS.

Ogni frazione è stata sottoposta al test di attività antinfiammatoria alla dose equivalente a 300 µg di estratto di partenza, al fine di individuare quella in cui si concentrano maggiormente i principi attivi. L'attività dell'estratto etilacetico, che a 300 µg/cm² ha indotto circa il 60% di riduzione dell'edema, è passata nelle frazioni **1** e **3**, che hanno inibito l'edema rispettivamente del 34% e del 41%. La frazione **2**, invece, non ha esercitato un effetto significativo (Tabella 10).

Tabella 10. Attività anti-infiammatoria delle frazioni dell'estratto etilacetico dei frutti di OS.

Sostanza	Dose ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	N° animali	Edema (mg) Media \pm E.S.	Riduzione %
Controlli	--	10	7.0 \pm 0.2	--
Estratto etilacetico	300	10	2.9 \pm 0.3*	59
Frazione 1	33°	10	4.6 \pm 0.2*	34
Frazione 2	12°	10	6.4 \pm 0.3*	9
Frazione 3	161°	10	4.1 \pm 0.3*	41
Indometacina	100	10	2.8 \pm 0.3*	60

* $p < 0.05$ al test "t" di Student, rispetto ai controlli; °dose equivalente a 300 μg di estratto etilacetico.

Una parte della frazione **3** (4.85 g) è stata ulteriormente purificata mediante cromatografia su colonna di gel di silice, ottenendo quattro subfrazioni (subfrazioni **3a-3d**), le cui rese sono riportate in Figura 12. Le subfrazioni sono state sottoposte al test di attività antinfiammatoria, alla dose equivalente a 161 μg di frazione **3**, ossia a 300 μg di estratto etilacetico di partenza. I risultati ottenuti hanno rivelato che l'attività della frazione **3** (33% di riduzione dell'edema) passa integralmente nella subfrazione **3d** (30% di riduzione dell'edema). Le altre tre subfrazioni, invece, non hanno esercitato un effetto significativo (Tabella 11).

Tabella 11. Attività antinfiammatoria delle subfrazioni **3a-3d** dell'estratto etilacetico dei frutti di OS.

Sostanza	Dose ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	N° animali	Edema (mg) Media \pm E.S.	Riduzione %
Controlli	--	9	6.4 \pm 0.4	--
Frazione 3	270°	9	4.3 \pm 0.4*	33
Subfrazione 3a	8°	10	6.0 \pm 0.3	14
Subfrazione 3b	25°	9	5.6 \pm 0.3	13
Subfrazione 3c	25°	10	5.7 \pm 0.4	11
Subfrazione 3d	120°	10	4.5 \pm 0.3*	30
Controlli	--	10	7.0 \pm 0.2	--
Indometacina	100	10	2.8 \pm 0.2*	60

* $p < 0.05$ al test "t" di Student, rispetto ai controlli; °dose equivalente a 270 μg di frazione **3**.

La subfrazione **3d**, in cui si concentra l'attività della frazione **3**, è stata sottoposta ad analisi mediante cromatografia su colonna in fase inversa e in base ai picchi del cromatogramma, sono state individuate 6 subfrazioni (Figura 13).

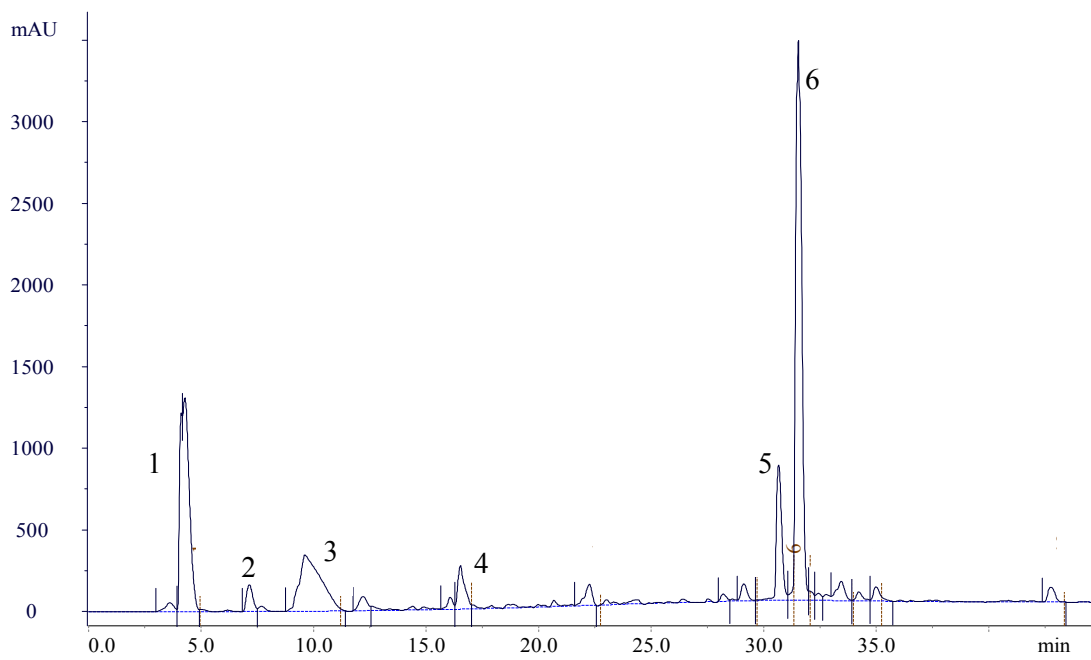


Figura 13. Profilo cromatografico della subfrazione **3d** dell'estratto etilacetico dei frutti di OS.

I risultati delle successive analisi eseguite mediante spettrometria di massa e mediante spettroscopia UV e IR sulle subfrazioni raccolte hanno permesso di individuare alcuni composti di natura flavonoidica ed alcuni acidi organici. In particolare sono stati identificati: l'acido malico, l'acido chinico, glicosidi della quercetina e dell'isoramnetina (Figure 14-15).

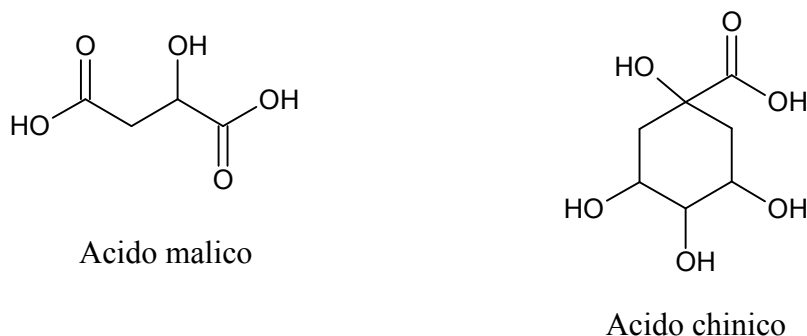


Figura 14. Formule di struttura dell'acido malico e dell'acido chinico [acido malico; UV λ_{\max} (MeOH): 210, 240, 296; ESI-MS (m/z): 132.9, ioni MS/MS (m/z): 114.9, 87, 71; acido chinico: UV λ_{\max} (MeOH): 266; IR ν_{\max} (KBr): 3224, 1736; ESI-MS (m/z): 190.9, ioni MS/MS (m/z): 172.9, 128.9, 110.9].

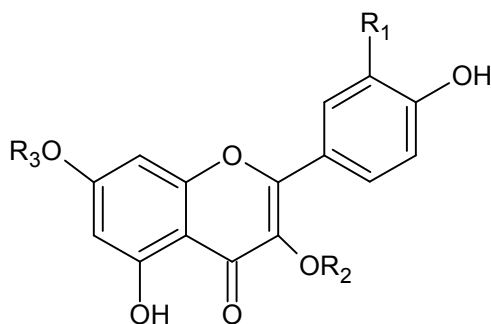


Figura 15. Formule di struttura di alcuni flavonoidi della frazione metanolica [quercetina-3-O-glucoside ($R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \beta\text{-D-glucosio}$, $R_3 = \text{H}$), UV λ_{\max} (MeOH): 204, 257, 353,1; IR ν_{\max} (KBr): 3055, 1654, 1441; ESI-MS (m/z): 463.2, ioni MS/MS (m/z): 300.9, 150.9; isoramnetina-3-O-rutinoside ($R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \alpha\text{-L-ramnosio-(1-6)-D-glucosio}$, $R_3 = \text{H}$), UV λ_{\max} (MeOH): 204, 254,9, 354,8; IR ν_{\max} (KBr): 3054, 1651,1442; ESI-MS (m/z): 623, ioni MS/MS (m/z): 315, 300, 271; isoramnetina-3-O-glucoside ($R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \beta\text{-D-glucosio}$, $R_3 = \text{H}$), UV λ_{\max} (MeOH): 206, 254,9, 353,7; IR ν_{\max} (KBr): 3201, 1654, 1432; ESI-MS (m/z): 477, ioni MS/MS (m/z): 314, 285; isoramnetina 3-O-pentoside-7-O-ramnoside ($R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{pentosio}$, $R_3 = \alpha\text{-L-ramnosio}$), UV λ_{\max} (MeOH): 255.2, 267.9, 354; ESI-MS (m/z): 593, ioni MS/MS (m/z): 461, 447, 315.

1.1.5. Discussione

Seguendo la tecnica del frazionamento guidato dal saggio biologico, utilizzando solventi organici a grado crescente di polarità per l'estrazione dei frutti di *H. rhamnoides*, è stata osservata una significativa attività antinfiammatoria topica per gli

estratti esanico ed etilacetico. Dopo applicazione cutanea, infatti, essi sono stati in grado di inibire la dermatite da olio di Croton nel padiglione auricolare del topo.

Nelle frazioni maggiormente attive dell'estratto esanico ed in una di quello etilacetico è stata individuata una complessa miscela di trigliceridi. Gli acidi grassi più abbondanti, presenti sotto forma di esteri nei trigliceridi, sono l'acido palmitoleico (C16:1 n7; 38.4%), l'acido palmitico (C16; 31.6%), l'acido linoleico (C18:2 n6; 14.9%) e l'acido oleico (C18:1 n9; 10.1%), come riportato in Tabella 9. Va sottolineata l'elevata quantità di acido palmitoleico, che non è particolarmente abbondante nel regno vegetale (Kallio *et al.*, 2002). E' possibile ipotizzare che tali trigliceridi, possano subire un'idrolisi a livello cutaneo e liberare gli acidi grassi, che a loro volta potrebbero essere coinvolti nell'attività antinfiammatoria osservata. Infatti, studi sperimentali hanno evidenziato che, a livello cutaneo, i trigliceridi possono andare incontro ad idrolisi da parte della flora microbica residente e/o di lipasi epidermiche, con liberazione degli acidi grassi (Drake *et al.*, 2008; Ziboh, 1996), che potrebbero essere così disponibili per esercitare la loro attività antiflogistica a livello topico. In particolare, gli acidi grassi insaturi sono noti per le loro proprietà antinfiammatorie, attribuite soprattutto alla loro capacità di interferire con il metabolismo dell'acido arachidonico e con la produzione di eicosanoidi proinfiammatori, come prostaglandine e leucotrieni (Chilton *et al.*, 2008; Das, 2006; Mozaffarian, 2006;). Tale ipotesi è supportata da precedenti studi sull'olivello spinoso, in cui è stata evidenziata un'azione antinfiammatoria dopo somministrazione orale dell'olio di semi efficace nel trattamento della dermatite atopica ed attribuita all'incremento di acido linoleico, α -linolenico e eicopentaenoico nei lipidi nel sangue, e un aumento dell'acido palmitoleico nei fosfolipidi del sangue (Yang *et al.*, 1999). Molti studi, sia *in vitro* che clinici, riportano l'effetto curativo e protettivo dell'olio di olivello nei confronti di affezioni a carico delle mucose. È stata, infatti, dimostrata l'efficacia nel trattamento e nella prevenzione delle ulcere nelle mucose orali e gastro-duodenali. Diversi studi ne riportano anche l'attività antiossidante, correlata con l'attività antinfiammatoria; ad esempio, si è visto che gli acidi grassi sono in grado di diminuire i processi ossidativi, di stabilizzare la struttura delle membrane in modelli animali e di incrementare l'attività degli enzimi antiossidanti glutatione perossidasi e superossido dismutasi (Yang & Kallio, 2002).

Il frazionamento "bioassay-oriented" dell'estratto etilacetico ha invece condotto all'individuazione di una frazione, in cui si concentra gran parte della sua attività, contenente flavonoidi sotto forma di glucosidi (glicosidi della quercetina e

dell'isoramnetina). In letteratura è ampiamente descritta l'attività antinfiammatoria dei flavonoidi. E', infatti, noto che essi possono inibire diversi enzimi coinvolti nei processi infiammatori, principalmente le ciclossigenasi e le lipossigenasi (Kim *et al.*, 2004). L'attività antinfiammatoria dei flavonoidi è correlata con quella antiossidante e "radical scavenger", in grado di ridurre i danni ossidativi che si possono verificare nel corso della flogosi (Tunalier *et al.*, 2007). In particolare, un'attività antiossidante e "radical scavenger" è stata riportata per l'isoramnetina-3-O-glucoside e per alcuni suoi analoghi (De Sousa *et al.*, 2004; Hyun *et al.*, 2006; Shibano *et al.*, 2008), oltre ad un'attività inibitoria nei confronti delle cicloossigenasi, della 12-lipossigenasi, della produzione di ossido nitrico, dell'interleuchina-12 e del fattore di necrosi tumorale- α (Bezakova *et al.*, 1996; Dongmo *et al.*, 2007; Rao *et al.*, 2008).

Anche la presenza di acidi organici, come l'acido chinico, potrebbe contribuire all'attività antinfiammatoria riportata per la frazione attiva dell'estratto etilacetico. Sia *in vitro* che *in vivo*, è stata, infatti, dimostrata l'efficacia di una preparazione contenente un estratto vegetale di *Uncaria tomentosa*, ricco in acido chinico, utilizzata per la cura di stati infiammatori cronici e di disfunzioni gastrointestinali, dovute alla presenza di ulcere (Sheng *et al.*, 2005).

1.2. Estrazione mediante solventi acquosi

1.2.1. Estrazioni preliminari e *screening* di attività antibatterica

I frutti di olivello spinoso sono stati sottoposti ad estrazione con solventi acquosi al fine di individuare l'eventuale presenza di peptidi antimicrobici e, in particolare, di defensine. L'estrazione e la successiva purificazione si è basata su alcune proprietà chimico-fisiche di tali molecole, come le piccole dimensioni, la netta carica positiva, la tolleranza alla degradazione e denaturazione da parte di acidi e solventi organici, la termostabilità.

Il residuo vegetale, ottenuto dall'estrazione dei frutti con solventi organici, è stato utilizzato al fine di estrarre i peptidi antimicrobici e per ridurre le possibili interferenze della porzione lipidica con le estrazioni mediante solventi acquosi. Tale residuo vegetale costituisce all'incirca il 40% del peso secco iniziale ed il 7% di quello fresco. Inizialmente, esso è stato estratto seguendo tre diversi approcci, come riportato di seguito.

1) Estrazione acida con acido acetico 0.5% (4°C e 50°C):

Una prima estrazione è stata condotta in una soluzione acquosa di acido acetico allo 0.5%, sia a freddo (4°C) che a caldo (50°C). Le soluzioni estrattive sono state filtrate e liofilizzate, ottenendo due differenti estratti. Quest'ultimi sono stati poi riuniti per ottenere l'estratto OS_CH₃COOH, che rappresenta 8.4% del residuo vegetale di partenza. Esso è stato eluito su colonna cromatografica, sia a scambio ionico che per gel filtrazione. L'attività antimicrobica dell'estratto è stata testata *in vitro* nei confronti di *Staphylococcus aureus* ed *Escherichia coli*, rivelando un'attività modesta con valori di MIC > 2.5 mg/ml nei confronti di *S. aureus* e > 5 mg/ml nei confronti di *E. coli*. Dalla cromatografia a scambio cationico sono state eluite 3 frazioni (frazioni 1-3) mentre dalla gel filtrazione 4 (frazioni I-IV). Sono stati quindi eseguiti saggi di MIC preliminari e si è constatato che la cromatografia a scambio ionico permette di individuare un maggior numero di frazioni attive.

2) Estrazione a pH neutro in tampone SPB:

Il residuo vegetale, derivato dall'estrazione organica, è stato sottoposto ad un'estrazione in ambiente neutro con tampone sodio fosfato a freddo e a caldo. Dopo filtrazione e liofilizzazione delle soluzioni, sono stati ottenuti i due rispettivi estratti: SPB4C (resa: 12%) e SPB50W (resa: 15%). Gli estratti sono stati sottoposti al test di attività antibatterica nei confronti di *S. aureus* ed *E. coli*, riscontrando dei valori di MIC maggiori di 5 mg/ml per ciascuno di essi. Entrambi sono stati separati mediante colonna cromatografica sia a scambio ionico che per gel filtrazione. Alcune frazioni derivate da gel filtrazione hanno mostrato una modesta attività antimicrobica nei confronti di *S. aureus* 710A, come la frazione I, ottenuta dall'estratto SPB4C (MIC ≥ 0.31 mg/ml) e la frazione II, ottenuta dall'estratto SPB50W (MIC ≥ 1.25 mg/ml).

Si è constatato che l'estrazione a freddo permette di ottenere:

- specie più cariche, che sono diminuite nell'estrazione a caldo (spettro IEX molto debole)
- specie più piccole rispetto all'estratto a caldo, il cui cromatogramma relativo alla gel filtrazione mostra una maggiore intensità per i picchi che corrispondono a pesi molecolari maggiori (Figura 16).

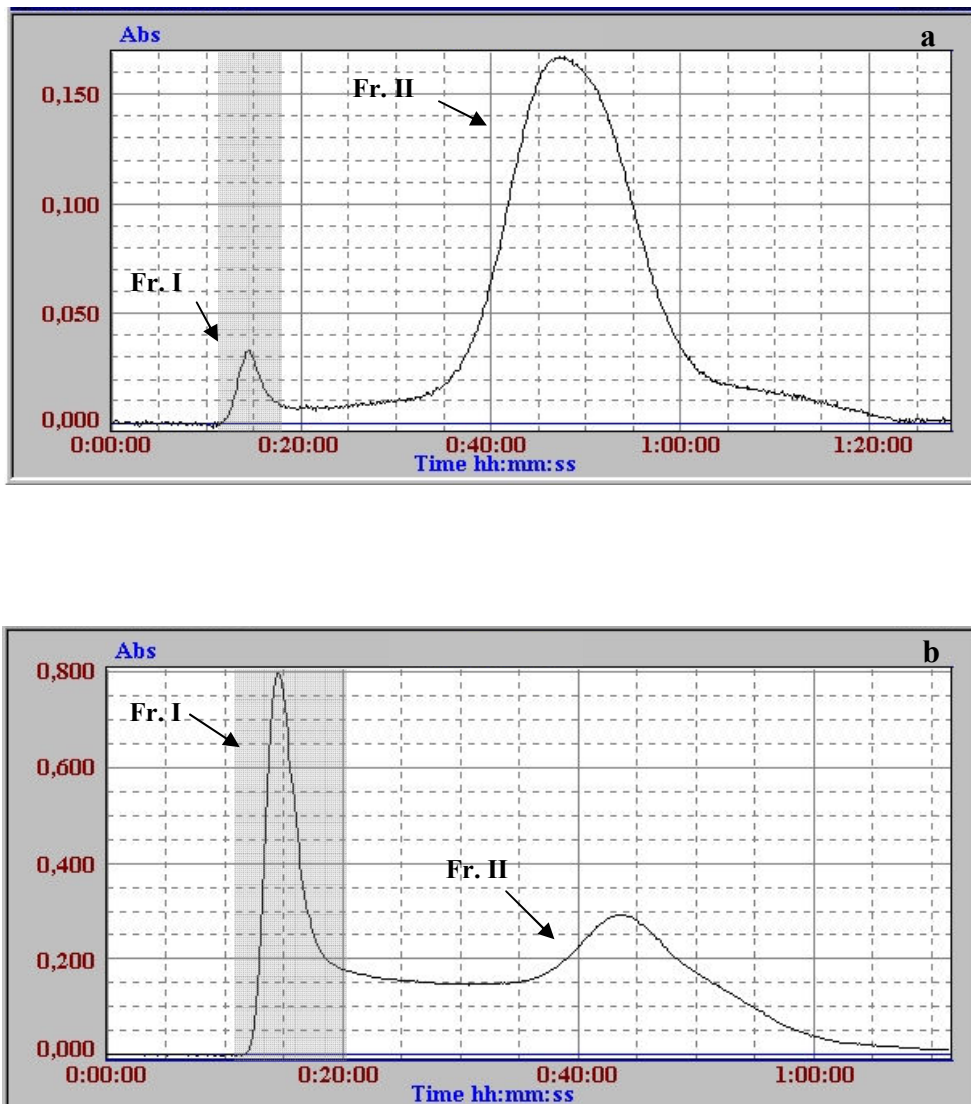


Figura 16. Cromatogramma relativo alla cromatografia per gel filtrazione degli estratti SPB4C (a) e SPB50W (b).

3) Estrazione con Tris-HCl 0,1M, con LiCl e successiva precipitazione con acetone:

Questo metodo prevede una prima estrazione del frutto liofilizzato con Tris-HCl 0.1M (pH 7.5) ed una successiva estrazione con LiCl, ottenendo una resa di estrazione pari a 0.4%, dopo la dialisi necessaria per allontanare il sale presente. Per aggiunta di due volumi di acetone si è ottenuto un precipitato di aspetto gelatinoso che rappresenta il 50% dell'estratto LiCl dializzato. L'analisi cromatografica in fase inversa ha permesso di separare 2 frazioni (frazioni 1-2). Lo screening dell'attività antibatterica ha

evidenziato che la frazione 1 presentava un valore di MIC $\geq 0,625$ mg/ml nei confronti di *S. aureus* 710A.

Questo metodo di estrazione si è rivelato inefficiente per la difficoltà di estrazione, dovuta alla necessità di dialisi per la presenza di LiCl e le rese si sono rivelate molto basse, per la notevole perdita di materiale, che i vari passaggi di purificazione comportano. In conclusione il procedimento risulta piuttosto lento e laborioso.

Dai primi esperimenti si sono potute trarre alcune considerazioni che hanno permesso di individuare i parametri influenti sul procedimento estrattivo dei frutti di olivello spinoso. Si è osservato che è necessaria una prima estrazione organica per eliminare l'interferenza della parte oleosa e che le variabili da considerare per le successive estrazioni in ambiente acquoso sono soprattutto l'acidità e la temperatura. L'estrazione in acido acetico sembra essere, infatti, la più efficiente. La purificazione per precipitazione del materiale idrofilo può essere vantaggiosa, soprattutto se condotta con *t*-butil metil etere, da preferire a quella con acetone, che precipita soprattutto le proteine e non è utile per i peptidi di piccole dimensioni, come le defensine. L'utilizzo di acido acetico comunque comporta una notevole difficoltà nel deacidificare l'estratto.

In questa fase dello studio, è stato inoltre ottimizzato un metodo di *screening* per la valutazione dell'attività antimicrobica, per poter testare contemporaneamente un numero elevato di estratti. In particolare, usando un lettore di assorbanza per piastre, si può valutare la cinetica di crescita batterica e saggiare tutti i campioni alla stessa concentrazione. Ciò permette di confrontare l'attività di un numero elevato di campioni e di poter individuare le frazioni da sottoporre alla successiva purificazione.

Al termine di questa prima parte del lavoro, è stato possibile definire alcuni parametri per ottimizzare il protocollo di estrazione, come schematizzato in Tabella 12.

Tabella 12. Protocollo ottimizzato per l'estrazione dei frutti di OS mediante solventi acquosi.

- Criofrantumazione di almeno 1 kg di frutti a -80°C;
- Liofilizzazione e frantumazione del materiale secco;
- Estrazione della polvere con etere di petrolio, sotto agitazione a 4°C, per rimuovere il materiale oleoso (Ext1);
- Estrazione del residuo (Res1) con acido acetico 5% (Ext2);
- Filtrazione con celite, ultracentrifugazione e seconda filtrazione su membrana con pori di 0.45 µm;
- Risospensione di Ext2 in acido acetico glaciale, precipitazione con *t*-butil etere (-20°C), risospensione in SPB (S2); in alternativa precipitazione con ammonio solfato;
- Saggio di attività antimicrobica di *screening* (cinetica di crescita batterica);
- IEX [Biorad CM Sepharose fast-flow, 1x10 cm, flusso 1,5 ml/min, gradiente 0-30 % solvente B (A: 20 mM NaH₂PO₄, pH 6.5; B: A + 3M NaCl, pH 6.5) in 60'];
- “Desalting” con cartucce Sep-Pak C18 plus in HPLC (isocratico, 60% B) → Liofilizzazione;
- Determinazione del peso di ogni frazione e risospensione a 10 mg/ml;
- Saggio di attività antimicrobica su ogni frazione;
- RP-HPLC di ogni frazione attiva [gradiente 5-65% solvente B (AcCN + 0.05% TFA) in 60'] → Liofilizzazione;
- Saggio di attività antimicrobica su ogni frazione;
- ES-MS sulle frazioni più attive;
- Saggio di contenuto proteico sulle frazioni più attive.

1.2.2. Preparazione degli estratti mediante solventi acquosi

In base al protocollo definito in precedenza, i frutti di olivello (1 Kg) sono stati liofilizzati e sottoposti ad estrazione organica mediante etere di petrolio, ottenendo un estratto che rappresenta il 7% del peso secco iniziale. Sul residuo è stata eseguita un'estrazione acida con acido acetico al 5% (a 4°C ed a 50°C) ed una precipitazione con

una soluzione di ammonio solfato satura al 90%, utile nella purificazione di sostanze di natura proteica. Il precipitato ottenuto è risultato pari circa allo 0.16% del peso secco iniziale (Figura 17).

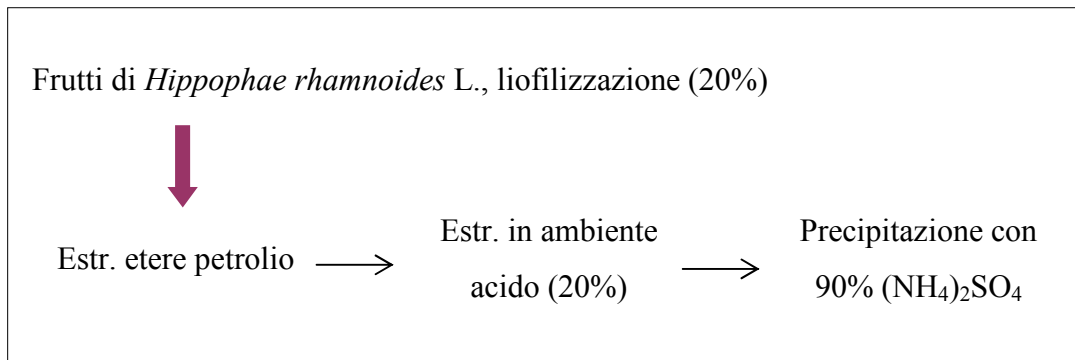


Figura 17. Schema e rese di estrazione dei frutti di OS mediante solventi acquosi.

Quest'ultimo è stato quindi purificato mediante colonna cromatografica a scambio cationico e successivamente in fase inversa, secondo lo schema riportato in Figura 18.

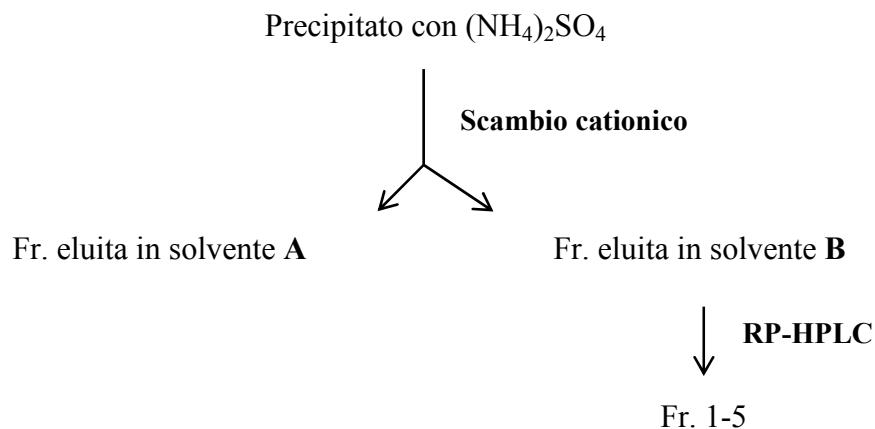


Figura 18. Schema di purificazione del precipitato con ammonio solfato mediante colonna a scambio ionico e in fase inversa.

Nello specifico, la frazione eluita con il solvente B dalla colonna cromatografica a scambio cationico è stata sottoposta a separazione cromatografica in fase inversa mediante colonna Xterra RP18 (7 μ m, 19x300 mm), ed una fase mobile costituita per l'80% da una soluzione acquosa di acido trifluoroacetico allo 0.05% e per il 20% da acetonitrile contenente acido trifluoroacetico allo 0.05% (condizioni isocratiche di separazione; velocità del flusso: 5 ml/min). L'analisi ha portato all'individuazione ed alla separazione di cinque frazioni (frazioni 1-5), come rappresentato in Figura 19.

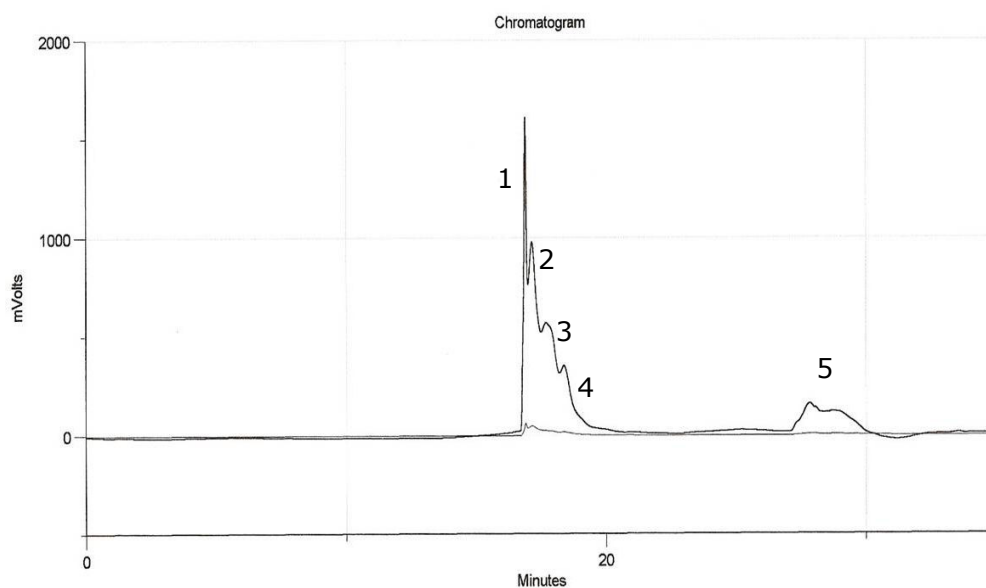


Figura 19. Cromatogramma RP-HPLC della frazione eluita con B mediante cromatografia a scambio cationico.

1.2.3. Attività antimicrobica degli estratti e delle frazioni

Le frazioni ottenute sono state sottoposte ai saggi di attività antimicrobica alla concentrazione di 1 mg/ml, nei confronti di *Staphylococcus aureus* 710A, *Escherichia coli* ML35 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC. I risultati ottenuti hanno rivelato un'attività antibatterica per la frazione 4, nei confronti di tutti e tre i ceppi batterici (Figura 20).

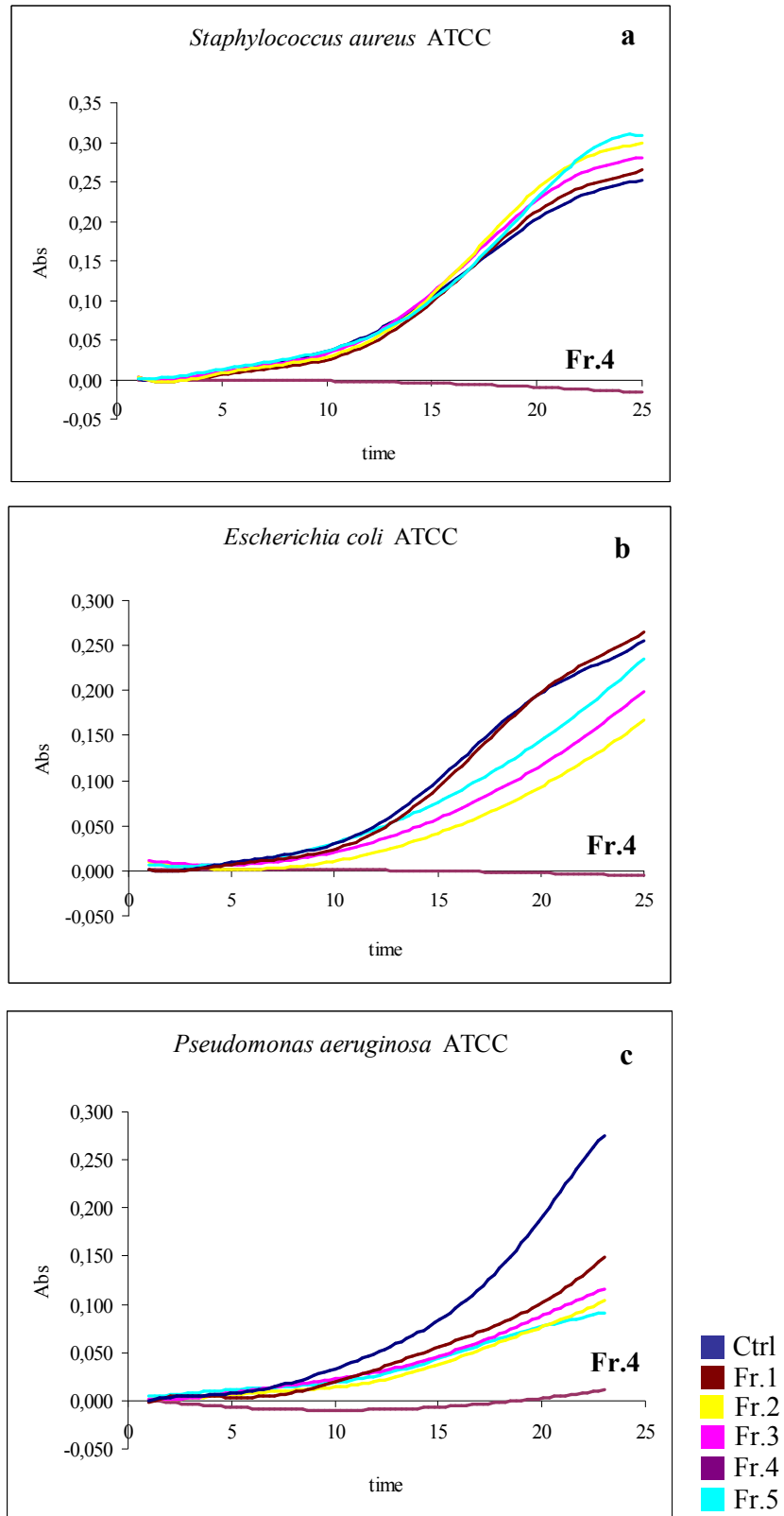


Figura 20. Effetto delle frazioni 1-5 sulla cinetica di crescita di *S. aureus* (a), *E. coli* (b) e *P. aeruginosa* (c).

Per quanto riguarda l'attività antimicotica, non è stato possibile eseguire saggi sulla cinetica di crescita, perché troppo lenta. Pertanto, è stata determinata la MIC nei confronti di *Candida albicans* ATCC sia per l'estratto ottenuto mediante acido acetico, sia per il precipitato ottenuto con ammonio solfato che per le cinque frazioni derivate da RP-HPLC, oltre che nei confronti dei tre ceppi batterici precedentemente riportati. I risultati di attività antimicrobica sono riassunti in Tabella 13.

Tabella 13. Attività antimicrobica dell'estratto in acido acetico, del precipitato in ammonio solfato e delle frazioni 1-5 di OS.

Microorganismo	Estr. acido acetico	Precipitato ammonio solfato	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3	Fr. 4	Fr. 5
<i>E. coli</i> ML35	-	+	+	+	+/-	+++	-
<i>S. aureus</i> 710A	+	-	-	-	-	+++	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	-	++	+	+	++	+++	+/-
<i>C. albicans</i> ATCC [#]	≥ 5	≥ 0.08	≥ 0.13	≥ 0.13	≥ 0.03	≥ 0.06	≥ 0.5

[#]MIC espresse in mg/ml, (+) indica una modesta attività

Il precipitato con ammonio solfato ha rivelato una buona attività antimicotica, mentre la frazione 4 ha mostrato sia un'attività molto buona nei confronti di *C. albicans* ATCC che, soprattutto, una notevole capacità di inibire la crescita batterica. Inoltre, è stato anche verificato l'effetto della frazione 4 stessa nei confronti della specie algale *Prototheca mastitis* coinvolta nella mastite bovina, riscontrando un valore di MIC pari a solo 25 µg/ml.

1.2.4. Analisi chimica della frazione 4

Visti i risultati interessanti, la frazione 4, isolata in colonna preparativa, è stata analizzata mediante cromatografia liquida a fase inversa (Symmetry 300 C18, 5 µm, 2.1x150 mm; flusso: 0.2 ml/min; gradiente di 10-50 % di solvente B in 40'), accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS), individuando un picco, che corrisponde per le caratteristiche di massa, ad un piccolo peptide delle dimensioni paragonabili a quelle di peptidi antimicrobici quali gli IbAMPs di *Impatiens balsamina* (Tailor *et al.*, 1997; Figura 21).

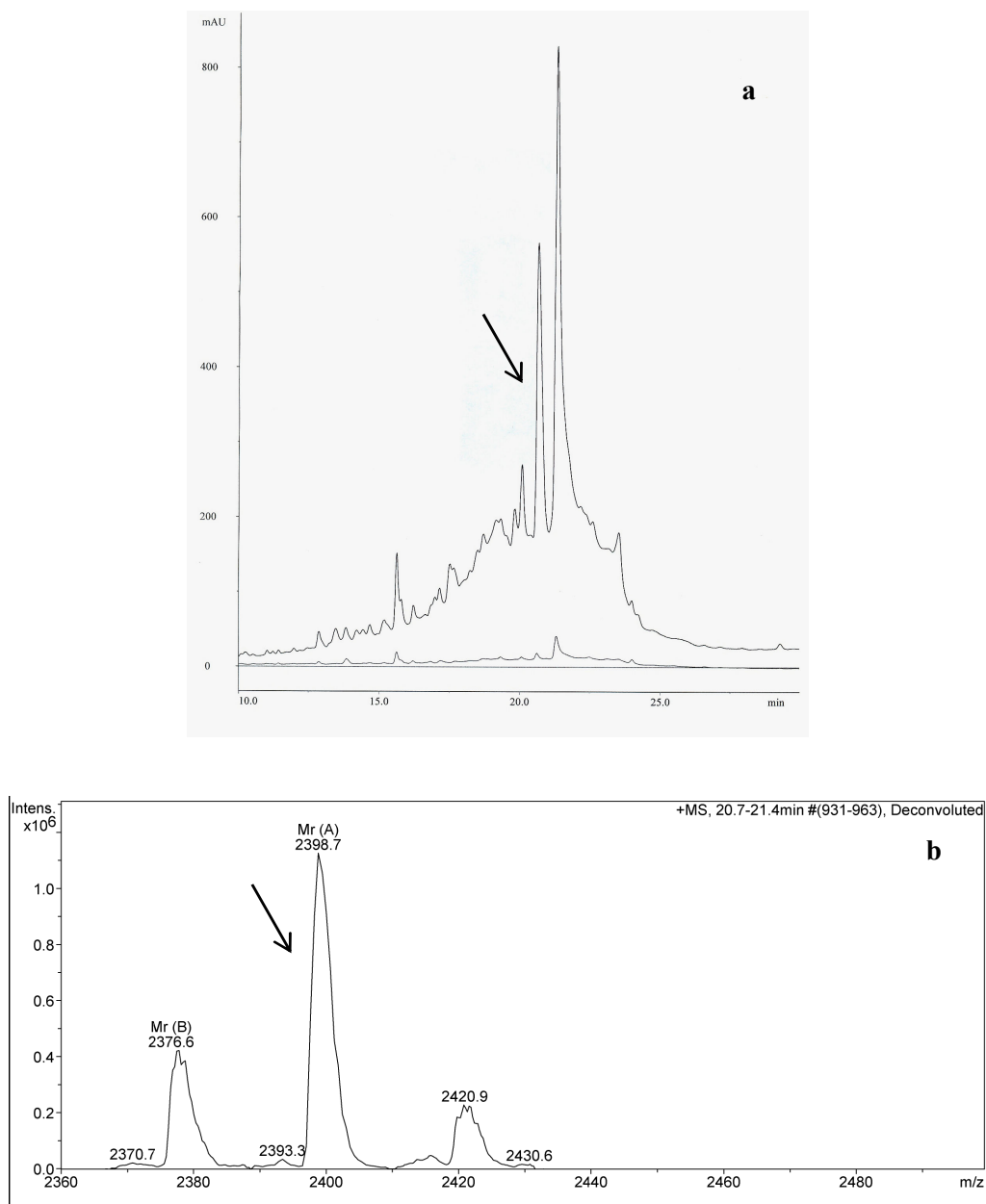


Figura 21. Cromatogramma HPLC (a) e spettro di massa (b) della frazione 4.

Gli IbAMPs sono un gruppo di quattro peptidi ricchi in cisteine (4 residui) costituiti da 20 aminoacidi, estratti dai semi di *Impatiens balsamina* (Balsaminaceae). Questa famiglia di peptidi è la più piccola tra quelle dei peptidi antimicrobici isolati dalle piante. È stato dimostrato che essi sono in grado di inibire la crescita dei batteri Gram-positivi e dei funghi, e che non presentano citotossicità nei confronti delle cellule umane o vegetali (Tailor *et al.*, 1997).

1.2.5. Discussione

Dai risultati ottenuti si può concludere che i frutti di olivello spinoso contengono sostanze ad attività antimicrobica e che esse potrebbero essere rappresentate da composti di natura peptidica. Tuttavia, si è riscontrata una scarsa riproducibilità nell'estrazione dei frutti di olivello spinoso mediante solventi acquosi che potrebbe dipendere, per esempio, dalla cultivar studiata, dal sito di raccolta o dallo stato della pianta. Infatti, in un'estrazione successiva, effettuata su un campione diverso, non si è riusciti ad individuare un possibile peptide ad attività antimicrobica, come quello purificato durante una prima estrazione, che sembrava avere dimensioni simili a quelle di IbAMP. In questo caso, i frutti di olivello erano stati raccolti nello stesso sito, ma l'anno successivo. È probabile dunque che la pianta sia stata sottoposta a diversi stimoli biotici o abiotici, che hanno comportato una differente composizione fitochimica.

Per quel che riguarda i meccanismi di difesa, le piante hanno sviluppato principalmente due tipi di resistenza, quella costitutiva e quella indotta. I fattori che appartengono alla prima sono normalmente presenti nelle piante sane, mentre quelli della seconda vengono attivati solo dopo uno stress che può essere di tipo biotico (patogeni) che di tipo abiotico (ambientale). Diversi studi hanno dimostrato che i geni che codificano per fattori di difesa come le defensine mostrano modelli di espressione organo-specifici. Alcuni sono espressi costitutivamente ed altri come, ad esempio, quelli presenti nelle foglie sono regolati dall'interazione con componenti microbici (Lay & Anderson, 2005). In questo caso, la sintesi dei peptidi antimicrobici viene maggiormente attivata in presenza di uno stress biotico; è per questo che in genere le quantità presenti sono molto basse, tali da rendere difficoltosa la purificazione.

2. Piantaggine maggiore (PM)

2.1. Estrazione mediante solventi organici

2.1.1. Preparazione degli estratti

Le foglie di *Plantago major* (PM) sono state essiccate a temperatura ambiente rilevando un contenuto di acqua pari all'83%. Il materiale vegetale (238 g, peso secco) è stato quindi sottoposto ad estrazioni sequenziali con *n*-esano (Hex), cloroformio (CHL) e metanolo (MeOH). In seguito alla filtrazione delle soluzioni estrattive e l'evaporazione dei solventi, si sono ottenuti gli estratti esanico, cloroformico e metanolico, con le rese di estrazione sono riportate in Figura 22.

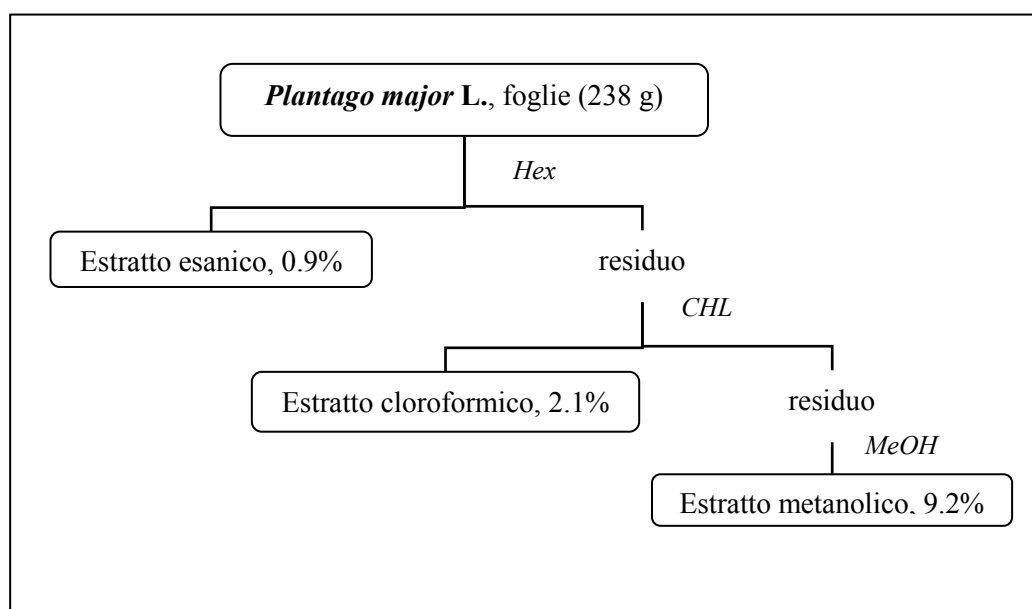


Figura 22. Schema e rese di estrazione delle foglie di PM.

2.1.2. Attività antinfiammatoria degli estratti

Gli estratti di PM sono stati sottoposti al test di attività antinfiammatoria topica in base alla capacità di inibire la dermatite da olio di Croton nel padiglione auricolare del topo. Ciascun estratto è stato somministrato alla dose di $300 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e l'attività è stata confrontata con quella del farmaco antinfiammatorio non steroideo indometacina, somministrata alla dose di $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

I risultati ottenuti hanno rivelato una significativa attività antinfiammatoria per gli estratti esanico e cloroformico, mentre quello metanolico è risultato inattivo. In

particolare, l'estratto più efficace è stato quello cloroformico, che ha indotto il 71% di inibizione dell'edema, mentre l'estratto esanico ha ridotto l'edema del 36%. Come riferimento, l'indometacina ha provocato un'inibizione dell'edema del 61% alla dose di $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Tabella 14).

Tabella 14. Attività antinfiammatoria degli estratti delle foglie di PM.

Sostanza	Dose ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	N° animali	Edema (mg) Media \pm E.S.	Riduzione %
Controlli	--	10	7.0 ± 0.3	--
Estratto esanico	300	10	$4.5 \pm 0.3^*$	36
Estratto cloroformico	300	10	$2.0 \pm 0.3^*$	71
Indometacina	100	10	$2.7 \pm 0.3^*$	61
Controlli	--	10	6.7 ± 0.2	--
Estratto metanolico	300	10	5.9 ± 0.3	12

* $p < 0.05$ al test "t" di Student, rispetto ai controlli.

L'attività antinfiammatoria dell'estratto più attivo, quello cloroformico, è stata studiata ulteriormente, verificandone l'effetto di tre diverse dosi, in confronto all'indometacina. L'estratto ha esercitato un'attività antiflogistica dose-dipendente, inducendo un'inibizione dell'edema compresa tra il 14% ed il 70%, nel *range* di dosi di 30-300 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Il farmaco di riferimento indometacina, alle stesse dosi, ha provocato delle riduzioni dell'edema comprese tra il 17% e l'80% (Tabella 15).

Dalle rette di regressione che correlano l'attività antinfiammatoria con le dosi somministrate, è stata stimata la potenza antiflogistica dell'estratto cloroformico in confronto a quella dell'indometacina, calcolando i rispettivi valori di DI_{50} (dose in grado di inibire l'edema del 50%). È stato così evidenziato che l'estratto cloroformico presenta una DI_{50} pari a $136 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, risultando di poco meno attivo dell'indometacina ($DI_{50} = 91 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Tabella 15. Relazione dose-effetto dell'estratto cloroformico e dell'indometacina.

Sostanza	Dose ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	N° animali	Edema (mg) Media \pm S.E.	Riduzione %
Controlli	--	10	7.1 \pm 0.3	--
Estratto cloroformico	30	10	6.1 \pm 0.4	14
	100	10	4.2 \pm 0.3*	41
	300	10	2.1 \pm 0.2*	70
Indometacina	30	10	5.9 \pm 0.3*	17
	100	10	3.1 \pm 0.3*	58
	300	10	1.4 \pm 0.2*	80

* $p < 0.05$ al test "t" di Student, rispetto ai controlli.

2.1.3. Frazionamento "bioassay-oriented" dell'estratto cloroformico

L'estratto cloroformico è stato successivamente purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice, ottenendo cinque frazioni (frazioni A-E), le cui rese sono riportate in Figura 23.

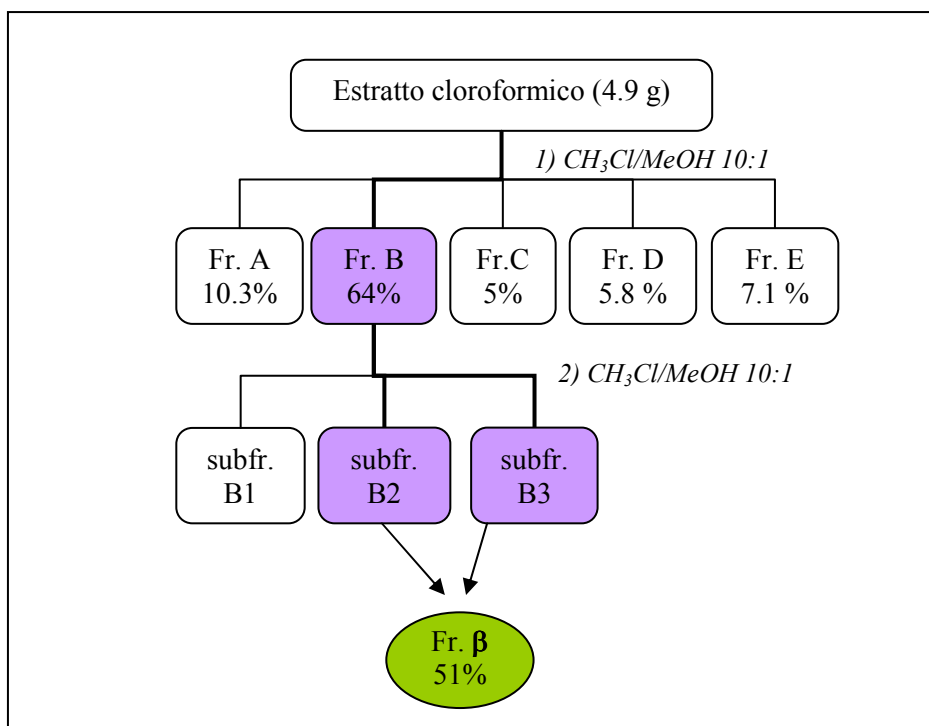


Figura 23. Schema e rese di frazionamento dell'estratto cloroformico delle foglie di PM.

Le frazioni ottenute sono state saggiate per la loro attività antinfiammatoria, alla dose equivalente a 300 μg dell'estratto di partenza, in base alle rese di frazionamento. I risultati ottenuti hanno rivelato come l'attività antinfiammatoria dell'estratto cloroformico passa integralmente nella frazione **B** che, oltre ad essere ottenuta con la resa più alta, ha inibito l'edema del 74%. Le frazioni **A** e **C** hanno invece provocato solo rispettivamente il 15% ed il 21% di riduzione dell'edema, mentre le frazioni **D** ed **E** sono risultate inattive (Tabella 16).

Tabella 16. Attività antinfiammatoria delle frazioni A-E dell'estratto cloroformico delle foglie di PM.

Sostanza	Dose ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	N° animali	Edema (mg) Media \pm E.S.	Riduzione %
Controlli	--	10	6.8 \pm 0.3	--
Estratto cloroformico	300	10	2.8 \pm 0.2*	59
Frazione A	31°	10	5.8 \pm 0.4*	15
Frazione B	192°	10	1.8 \pm 0.2*	74
Frazione C	15°	10	5.4 \pm 0.3*	21
Frazione D	18°	10	5.9 \pm 0.3	13
Frazione E	21°	10	6.3 \pm 0.3	7
Indometacina	100	10	2.9 \pm 0.2*	57

* $p < 0.05$ al test di Student, rispetto ai controlli; °dose equivalente a 300 μg di estratto cloroformico.

La frazione **B** è stata ulteriormente sottoposta a separazione cromatografica su colonna di gel di silice, ottenendo tre subfrazioni (subfrazioni **B1-B3**). Poiché l'analisi TLC ha rivelato che le subfrazioni **B2** e **B3** hanno una composizione tra loro analoga, esse sono state riunite in una frazione denominata frazione β , che rappresenta il 51% della frazione B (Figura 23).

La frazione β è stata sottoposta a separazione cromatografica mediante RP-HPLC. I principali costituenti chimici della frazione risultano essere gli acidi triterpenici, ursolico ed oleanolico (Figura 24), la cui presenza è confermata dall'analisi mediante spettrometria di massa e risonanza magnetica nucleare.

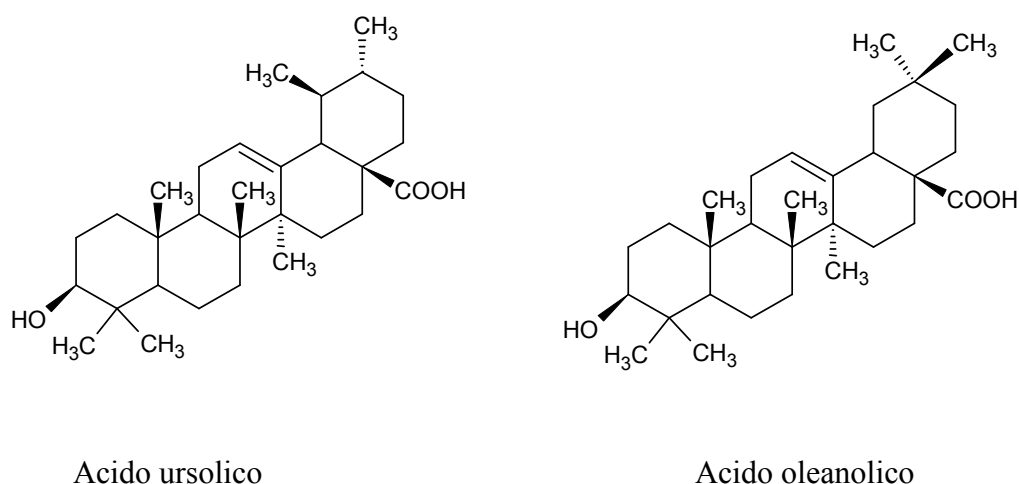


Figura 24. Formule di struttura dell'acido ursolico e dell'acido oleanolico.

Lo spettro di massa presenta uno ione molecolare con valore m/z pari a 455 $[M-H]^-$, e un frammento pari a 407 m/z . Il confronto con i dati ottenuti dall'analisi degli standard ha permesso di confermare la miscela di acido ursolico (acido 3 β -idrossi-olea-12-en-28-oico) ed acido oleanolico (acido 3 β -idrossi-urs-12-en-28-oico):

- acido ursolico: 1H -NMR ($CDCl_3$) δ 0.78 (3H, s), 0.81 (3H, s), 0.86 (3H, d, $J=6.3$ Hz), 0.92 (3H, s), 0.97 (3H, d, $J=6.8$ Hz), 1.09 (3H, s), 1.25 (3H, s), 2.18 (1H, d, $J=13.8$ Hz), 3.12 (1H, dd, $J=10.2, 5.2$ Hz) 5.28 (1H, t, $J=3.6$ Hz); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ 15.5, 15.6, 17.0, 18.3, 21.2, 23.3, 23.6, 24.1, 27.2, 28.0, 28.1, 29.7, 30.6, 32.9, 36.7, 37.0, 38.7, 39.0, 39.4, 42.0, 47.5, 47.9, 52.6, 55.2, 79.0, 125.8, 137.9, 181.2.

- acido oleanolico: 1H -NMR ($CDCl_3$) δ 0.73 (3H, s), 0.75 (3H, s), 0.88 (3H, s), 0.89 (3H, s), 0.90 (3H, s), 0.96 (3H, s), 1.11 (3H, s), 2.82 (1H, dd, $J=13.6$ Hz), 3.22 (1H, dd, $J=9.6$ Hz) 5.28 (1H, t, $J=3.6$ Hz); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ 15.3, 15.5, 17.1, 18.3, 22.9, 23.4, 23.6, 25.9, 27.2, 27.7, 28.1, 30.7, 32.4, 32.6, 33.1, 33.8, 37.1, 38.7, 39.2, 41.0, 41.6, 45.8, 46.5, 47.6, 55.2, 79.0, 122.6, 143.6, 183.5.

È stato possibile quantificare i due isomeri nella frazione β , in riferimento alle rette di taratura ottenute utilizzando i composti puri mediante RP-HPLC. L'acido ursolico rappresenta il 69.5% ($y = 4E+06x - 35396$; $r^2 = 0,9983$) della frazione, mentre l'acido oleanolico rappresenta il 18 % ($y = 4E+06x + 21628$; $r^2 = 0,9976$).

Al fine di verificare la loro attività antinfiammatoria e confermare il ruolo che hanno nell'effetto della frazione **B**, i due acidi triterpenici sono stati sottoposti al test di inibizione della dermatite da olio di Croton. Entrambi i composti hanno esercitato un'attività antinfiammatoria dose-dipendente. A dosi comprese tra 25 e 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, l'acido ursolico ha indotto delle riduzioni dell'edema comprese tra il 24% ed il 90%, mentre l'acido oleanolico (50-400 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) ha determinato dal 20% al 79% di riduzione dell'edema (Tabella 17).

Tabella 17. Attività antinfiammatoria dell'acido ursolico e dell'acido oleanolico.

Sostanza	Dose ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	N° animali	Edema (mg) Media \pm E.S.	Riduzione %
Controllo	--	9	8.0 \pm 0.4	--
Acido ursolico	25	10	6.1 \pm 0.3*	24
	50	10	4.5 \pm 0.1*	44
	100	10	2.0 \pm 0.3*	75
	200	10	0.8 \pm 0.1*	90
Acido oleanolico	50	10	6.4 \pm 0.4*	20
	100	10	4.4 \pm 0.5*	45
	200	10	2.8 \pm 0.3*	65
	400	9	1.7 \pm 0.1*	79

* $p < 0.05$ al test "t" di Student, rispetto ai controlli.

Dalle curve dose-effetto dei due composti (Figura 25) è stato possibile calcolare i valori di DI_{50} di entrambi gli acidi triterpenici, quale indice della loro potenza antinfiammatoria. L'acido ursolico presenta un valore di DI_{50} pari a 57 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, mentre la DI_{50} dell'acido oleanolico è pari a 131 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Questo sta ad indicare come l'acido ursolico sia quasi tre volte più potente dell'acido oleanolico e circa due volte più attivo del farmaco antinfiammatorio non steroideo indometacina, la cui DI_{50} è pari a 91 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. La potenza antiflogistica dei due acidi triterpenici ed il loro contenuto nella frazione **B**, in cui si sono concentrati, e nell'estratto cloroformico di partenza, giustificano l'attività antinfiammatoria osservata per tale frazione e per l'estratto.

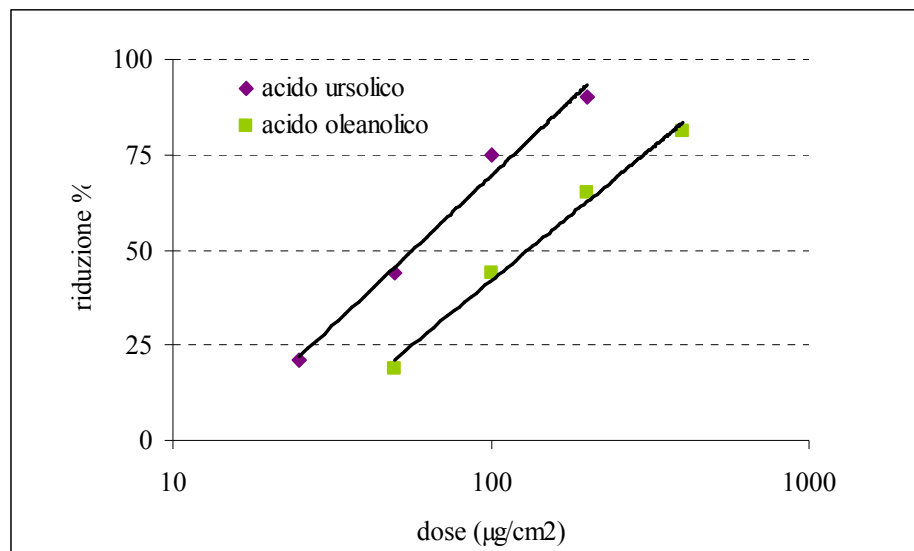


Figura 25. Relazione dose-effetto dell'acido ursolico e dell'acido oleanolico.

2.1.4. Discussione

E' stato osservato che le foglie di *Plantago major* sono dotate di proprietà antinfiammatorie e che i principi responsabili dell'attività antiflogistica possono essere estratti con solventi relativamente apolari, come il cloroformio. Essi sono rappresentati dai triterpeni acido ursolico (acido 3 β -idrossi-12-urs-12-en-28-oico) ed acido oleanolico (acido 3 β -idrossi-12-olea-12-en-28-oico). I triterpeni sono piuttosto comuni nel mondo vegetale e li ritroviamo soprattutto nella famiglia delle Labiatae, in piante come *Ocinum basilicum* (basilico), *Origanum vulgare* (origano), *Rosmarinum officinalis* (rosmarino), *Salvia officinalis* (salvia) e *Thymus vulgaris* (timo).

L'acido ursolico ha rivelato una DI_{50} pari a 57 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, risultando circa due volte più attivo dell'indometacina ($DI_{50} = 91 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) e quasi tre volte più attivo dell'acido oleanolico ($DI_{50} = 131 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). L'acido ursolico è stato precedentemente individuato in *P. major* come principale componente di un estratto lipofilo, in grado di inibire la cicloossigenasi-2 (Ringbom *et al.*, 1998). L'attività antinfiammatoria dell'acido ursolico e dell'acido oleanolico sono state in precedenza osservate studiando altre specie vegetali, sia dopo applicazione topica che dopo somministrazione sistemica. L'attività antiflogistica sembra derivare dalla loro capacità di inibire diversi eventi coinvolti nella flogosi, come il rilascio di istamina, il metabolismo dell'acido arachidonico attraverso le

vie ciclo- e 5-lipoossigenasica e la produzione di ossido nitrico (Ikeda *et al.*, 2008; Miceli *et al.*, 2005). Per quel che riguarda l'acido oleanolico è stata osservata la formazione di un complesso tra il triterpene e la fosfolipasi A₂ di tipo secretorio, che causa l'inibizione irreversibile dell'enzima stesso (Dharmappa *et al.*, 2009). Entrambi gli acidi triterpenici mostrano un effetto inibitorio significativo nei confronti della ciclossigenasi-2, con un'azione diretta sull'enzima e quindi sulla sintesi delle prostaglandine. L'acido ursolico sembra essere più attivo del suo isomero (Liu, 1995; Ringbom *et al.*, 1998), analogamente a quanto osservato per l'attività antinfiammatoria *in vivo* nel corso di questo studio.

2.2. Estrazione mediante solventi acquosi

2.2.1. Preparazione degli estratti

Al fine di individuare la presenza di peptidi antimicrobici, le foglie essiccate di *Plantago major* sono state sottoposte ad estrazioni con solventi organici, in riferimento al protocollo estrattivo utilizzato per i frutti di olivello spinoso. Nel caso di questa specie, è riportata in letteratura l'identificazione di un gene per la sintesi di una defensina, dfn1 e questo ci ha supportato nella ricerca di peptidi antimicrobici. (<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/dbfetch?db=emblcds&id=CAH58740>).

In particolare, 1 Kg di foglie essiccate è stato sottoposto ad estrazione mediante etere di petrolio, per evitare eventuali interferenze di sostanze lipofile con la successiva estrazione acquosa. Il residuo è stato quindi estratto prima in tampone sodio fosfato (SPB) 10 mM, a 50°C ed in seguito con una soluzione di acido acetico all'1%, sempre alla temperatura di 50°C. Dopo averli dializzati entrambi, si è proceduto con l'analisi cromatografica, prima in scambio cationico e poi in fase inversa, ottenendo le frazioni riportate in Figura 26.

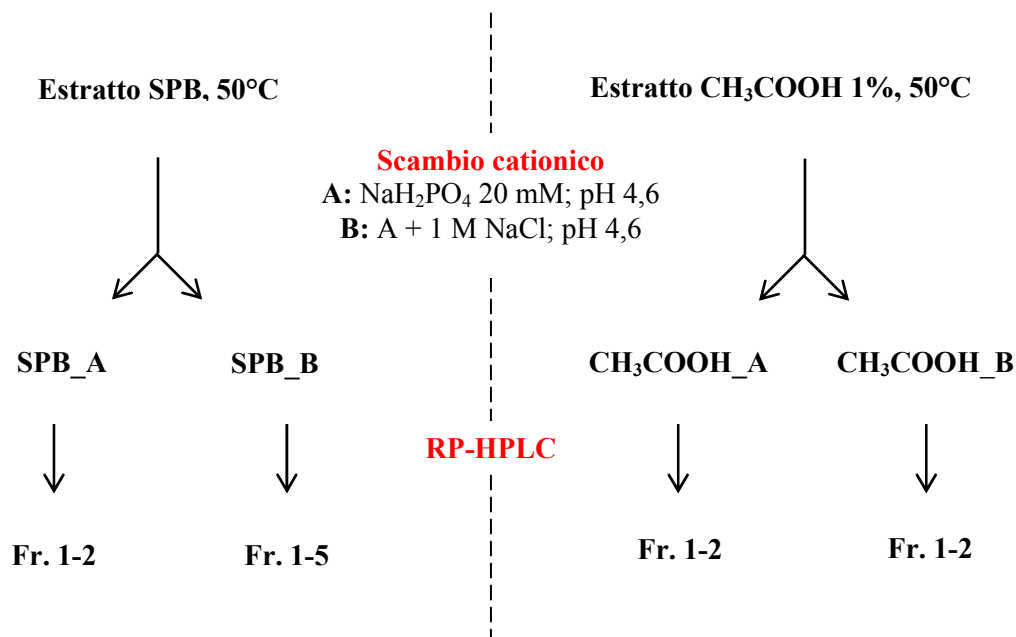


Figura 26. Schema di purificazione in colonna a scambio ionico e in fase inversa degli estratti delle foglie di PM ottenuti con tampone fosfato ed acido acetico all'1%.

2.2.2. Attività antimicrobica degli estratti

Tutte le frazioni ottenute dall'analisi in fase inversa di entrambi gli estratti sono state sottoposte a *screening* di attività antimicrobica. In particolare sono stati eseguiti saggi di inibizione della cinetica di crescita batterica, alla concentrazione di 1 mg/ml, nei confronti di *S. aureus* ATCC, *E. coli* ATCC e *P. aeruginosa* ATCC, nonché saggi di attività antimicotica determinando la MIC nei confronti di *C. albicans* ATCC (Tabelle 18).

Tabelle 18. Attività antimicrobica degli estratti acquosi di PM (estratto ottenuto con SPB e sue frazioni; estratto ottenuto con CH₃COOH e sue frazioni).

Microorganismo	Estratto SPB	Fraz. A1	Fraz. A2	Fraz. B1	Fraz. B2	Fraz. B3	Fraz. B4	Fraz. B5
<i>E.coli</i> ATCC	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>S.aureus</i> ATCC	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>P.aeruginosa</i> ATCC	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C.albicans</i> ATCC	-	≥ 1	-	-	-	-	-	-

Microorganismo	Estr. CH ₃ COOH	Fraz. A1	Fraz. A2	Fraz. B1	Fraz. B2
<i>E.coli</i> ATCC	-	-	-	-	-
<i>S.aureus</i> ATCC	+ -	+	-	-	-
<i>P.aeruginosa</i> ATCC	+	+	+	++	+
<i>C.albicans</i> ATCC	-	≥ 0,016	-	≥ 0,5	≥ 1

MIC espresse in mg/ml, (+) indica una modesta attività.

Dai risultati ottenuti è emerso che solo alcune frazioni dell'estratto in acido acetico sembrano esercitare una buona attività antimicrobica, soprattutto la frazione A1 nei confronti di *C. albicans* e la frazione B1 nei confronti di *P. aeruginosa*.

2.2.3. Discussione

I risultati ottenuti hanno permesso di individuare alcune frazioni dotate di attività antimicrobica. Tuttavia, in questa fase sono sorte alcune difficoltà poiché, dopo avere eseguito i saggi di attività biologica, non è stato possibile proseguire con la purificazione delle frazioni attive, per insufficienza di materiale disponibile e perché i passaggi cromatografici, la dialisi e la neutralizzazione del pH comportano una notevole perdita di materiale. Ciò, a sua volta, va a sommarsi al fatto che i peptidi, eventualmente presenti, normalmente si trovano in concentrazioni piuttosto basse.

Le difficoltà riscontrate nella ricerca di peptidi antimicrobici può essere la conseguenza della bassa presenza di queste molecole nella pianta, in assenza di stress; infatti, come riportato già per olivello, la sintesi di questi peptidi, soprattutto nelle foglie, è, spesso, indotta a seguito di stress biotici o abiotici ed è per questo che la loro presenza non sempre è garantita. Nel laboratorio di Peptidi Antinfettivi del Dipartimento di Scienze della Vita (Università di Trieste), in cui è stata svolta tutta la parte di progetto inerente all'attività antimicrobica, è stato possibile, sulla base delle analogie con defensine di altre piante, studiare l'aumento dell'espressione genica per la produzione di peptidi antimicrobici, in piante quali la canna da zucchero, sottoposte a stress di tipo biotico (Padovan *et al.*, 2009 e 2010). Questa metodologia potrebbe essere utilizzata per ottenere una sovraespressione di geni codificanti per le defensine, con un

conseguente aumento del contenuto delle defensine stesse nella piantaggine, permettendo di identificare peptidi potenzialmente utilizzabili per le loro proprietà antimicrobiche e facilitando il loro isolamento.

2.3. Attività antimicrobica e citotossicità di componenti estratti con solventi organici finalizzata ad un potenziale impiego nel trattamento della mastite

Considerando la notevole attività antinfiammatoria dell'estratto cloroformico di *P. major* e dei suoi costituenti, l'acido ursolico e l'acido oleanolico, è stato condotto uno studio volto a verificare se essi possiedono anche proprietà antimicrobiche. In questo modo, l'individuazione di composti dotati sia di un'attività antimicrobica, sia di un'azione antinfiammatoria, rappresenta un promettente punto di partenza per lo sviluppo di preparazioni efficaci per il trattamento della mastite bovina.

Parallelamente, sono stati studiati altri composti presenti nelle foglie, estratti mediante l'impiego di solventi organici, come l'iridoide aucubina.

I composti più attivi saranno studiati anche per verificare eventuali effetti citotossici.

2.3.1. Attività antimicrobica dell'estratto cloroformico

L'estratto cloroformico di *P. major* è stato sottoposto al saggio di attività antimicrobica, determinando i valori di MIC nei confronti di diverse specie batteriche coinvolte nella mastite bovina, tra cui *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus faecalis*. Generalmente i batteri sono stati coltivati in terreno 5% MH, ma per alcuni di essi, in modo particolare, nel caso di *S. faecalis* ed *S. epidermidis*, è stato utilizzato terreno 30% MH, poiché la loro crescita *in vitro* si è rivelata piuttosto lenta e difficoltosa. I risultati ottenuti evidenziano un'attività antibatterica dell'estratto, soprattutto nei confronti di *S. aureus* e *S. epidermidis* (Tabelle 19).

Tabelle 19. Attività antimicrobica dell'estratto cloroformico delle foglie di PM

Ceppo batterico (5% MH)	Estratto cloroformico (MIC; µg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	60
<i>Staphylococcus aureus</i> 710A	16
<i>Staphylococcus aureus</i> 305A	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	60
<i>Escherichia coli</i> ATCC	93
<i>Escherichia coli</i> ML 35	125
<i>Salmonella enteritidis</i> H ₂	125

La concentrazione batterica è di 5×10^6 CFU/ml, per *P. aeruginosa* ATCC è di 5×10^5 CFU/ml. L'estratto è risospeso in terreno MH contenente 5% di DMSO.

Ceppo batterico (30% MH)	Estratto cloroformico (MIC; µg/ml)
<i>Streptococcus faecalis</i> 2903	92
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 19	30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 12989	60

La concentrazione batterica è di 5×10^5 CFU/ml. L'estratto è risospeso in terreno MH contenente 5 % di DMSO.

2.3.2. Attività antimicrobica dell'acido ursolico e dell'acido oleanolico

L'attività antibatterica dell'acido ursolico e dell'acido oleanolico è stata valutata determinando la MIC nei confronti di alcuni ceppi di *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis*. Anche l'acido ursolico e l'acido oleanolico hanno rivelato una buona attività antibatterica nei confronti degli stessi ceppi sensibili all'estratto cloroformico, risultando più attivi di quest'ultimo. In particolare, i valori di MIC erano uguali o inferiori a 60 µg/ml; solo nei confronti di *Pseudomonas aeruginosa* 12989 l'acido oleanolico ha rivelato una MIC pari a 125 µg/ml. L'acido ursolico è inoltre risultato più attivo dell'oleanolico (Tabelle 20).

Tabelle 20. Attività antimicrobica dell'acido ursolico ed oleanolico

Ceppo batterico (5%MH)	Acido ursolico (MIC; µg/ml)	Acido oleanolico (MIC; µg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	23	60
<i>Staphylococcus aureus</i> 710A	16	16
<i>Staphylococcus aureus</i> 305A	4	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	30	45
<i>Escherichia coli</i> ATCC	60	60
<i>Escherichia coli</i> ML 35	60	60
<i>Salmonella enteritidis</i> H ₂	45	30

La concentrazione batterica è di 5×10^6 CFU/ml, per *P. aeruginosa* ATCC è di 5×10^5 CFU/ml. L'estratto è risospeso in terreno MH contenente 5% DMSO.

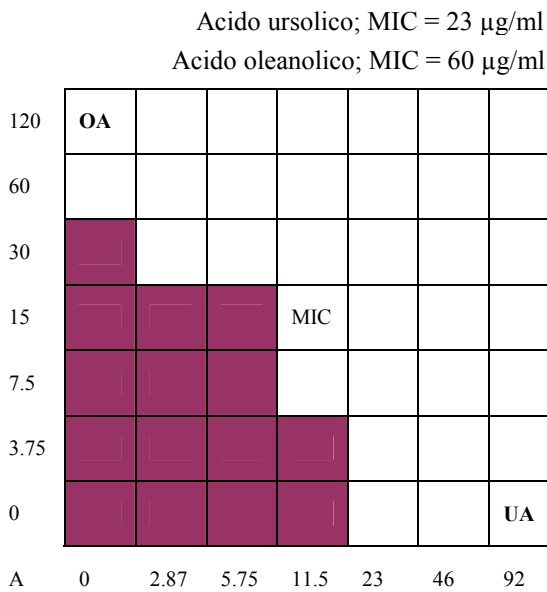
Ceppo batterico (30%MH)	Acido ursolico (MIC; µg/ml)	Acido oleanolico (MIC; µg/ml)
<i>Streptococcus faecalis</i> 2903	4	8
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 19	4	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 12989	60	125

La concentrazione batterica è di 5×10^5 CFU/ml. L'estratto è risospeso in terreno MH contenente 5% DMSO.

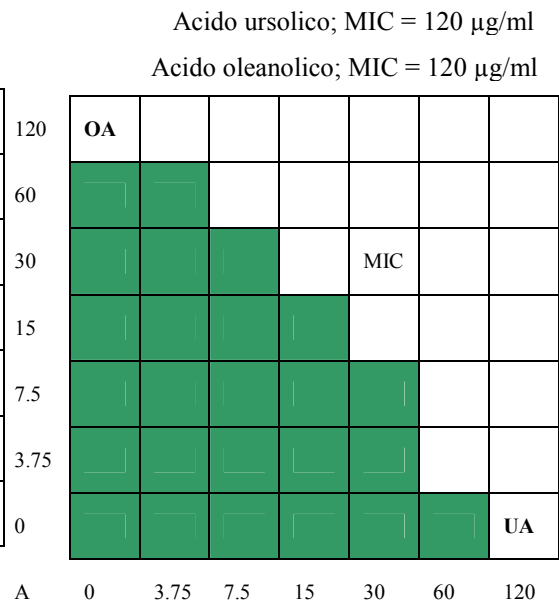
Al fine di valutare l'eventuale attività sinergica tra i due isomeri, sono stati condotti saggi MIC di tipo *checkerboard*, in triplicato. In questo modo è stato determinato il valore di FIC ("Fractional Inhibitory Concentration"), sulla base della MIC dei composti in esame presi singolarmente e della MIC che presentano quando agiscono simultaneamente. Tale valutazione è stata effettuata nei confronti di ceppi standard di *S. aureus*, *E. coli*, *S. epidermidis* e *S. faecalis*, come mostrato nelle Tabelle 21.

Da questi esperimenti risulta che l'acido ursolico e l'acido oleanolico esercitano un effetto sinergico nei confronti di *E. coli*, mentre non agiscono in maniera altrettanto sinergica nei confronti di *S. aureus*, *S. faecalis* o *S. epidermidis*.

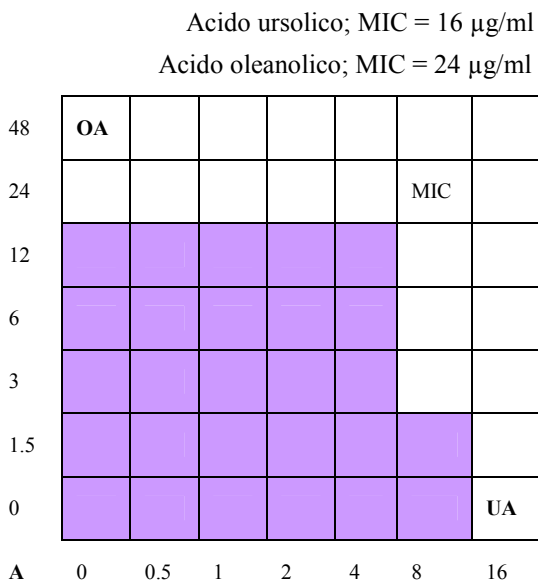
Tabelle 21. Interazione tra acido ursolico ed oleanolico per l'attività antimicrobica nei confronti di *S. aureus*, *E. coli*, *S. epidermidis* e *S. faecalis*.



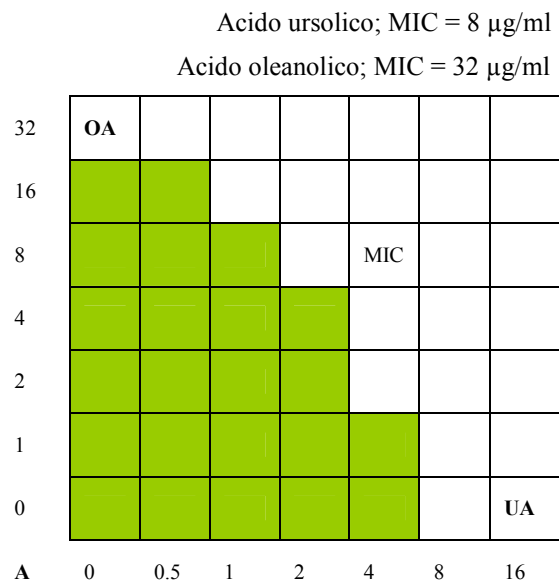
S. aureus ATCC (5×10^6 CFU/ml)
FIC = 0.75



E. coli ATCC (5×10^5 CFU/ml)
FIC = 0.5



S. epidermidis 19 (5×10^5 CFU/ml)
FIC = 1.5



S. faecalis 2903 (5×10^5 CFU/ml)
FIC = 0.75

2.3.3. Citotossicità dell'acido ursolico e dell'acido oleanolico

Considerando la notevole attività antibatterica ed antinfiammatoria dell'acido ursolico ed oleanolico, i due triterpeni sono stati studiati per verificare l'eventuale tossicità, in previsione di un loro utilizzo nel trattamento della mastite.

Quale parametro preliminare, sono stati valutati il potere emolitico nei confronti di eritrociti umani e l'effetto citotossico nei confronti di macrofagi umani, mediante il test del MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro].

Per entrambi i composti, la percentuale di emolisi indotta dalla concentrazione di 0.05 mg/ml, rispetto ad un controllo positivo in cui è avvenuto il 100% di emolisi, è risultata inferiore al 5%. Alla concentrazione di 0.1 mg/ml, l'acido ursolico ha invece provocato il 22% di emolisi, mentre l'emolisi indotta dall'acido oleanolico era pari a 32% (Tabella 22). Il potere emolitico dei due composti può quindi essere considerato trascurabile.

Tabella 22. Attività emolitica dell'acido ursolico e dell'acido oleanolico.

Composto	Concentrazione (mg/ml)	Emolisi (%)
Acido ursolico	0.05	3
	0.10	22
Acido oleanolico	0.05	4
	0.10	32

Il test del MTT, che valuta la vitalità cellulare misurando l'attività mitocondriale delle cellule vive, ha permesso di rilevare che l'acido ursolico non è citotossico alle concentrazioni di 50 e 250 µg/ml, mentre mostra una certa citotossicità a 500 µg/ml. Per quel che riguarda, invece, l'acido oleanolico non si è avuto alcun effetto citotossico fino ad una concentrazione di 100 µg/ml.

2.3.4. Valutazione del potenziale impiego di aucubina ed aucubigenina per l'attività antimicrobica.

L'aucubina è un iridoide glicosilato presente nelle foglie di *Plantago major*, il cui aglicone aucubigenina è noto per le sue proprietà antimicrobiche (Figura 27; Davini *et al.*, 1986).

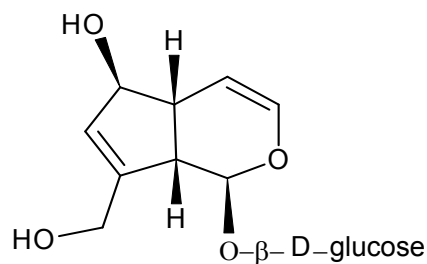


Figura 27. Formula di struttura dell'aucubina.

L'aucubina è stata isolata dall'estratto metanolico di *P. major* mediante separazione su colonna cromatografica in fase inversa. Essa è stata identificata, per confronto con uno standard di origine commerciale, in base al tempo di ritenzione in RP-HPLC e ai dati di spettrometria di massa (MS: $[M-H]^- = 345$ m/z, $2x[M-H]^- = 691$ m/z; MS/MS: $[M-H-glu]^- = 182,9$ m/z). Dall'analisi HPLC è emerso che l'aucubina viene eluita in condizioni isocratiche al 2% di MeOH, mentre il suo aglicone viene eluita all'1% di MeOH (Figura 28), nonostante sia privo dello zucchero e pertanto meno polare.

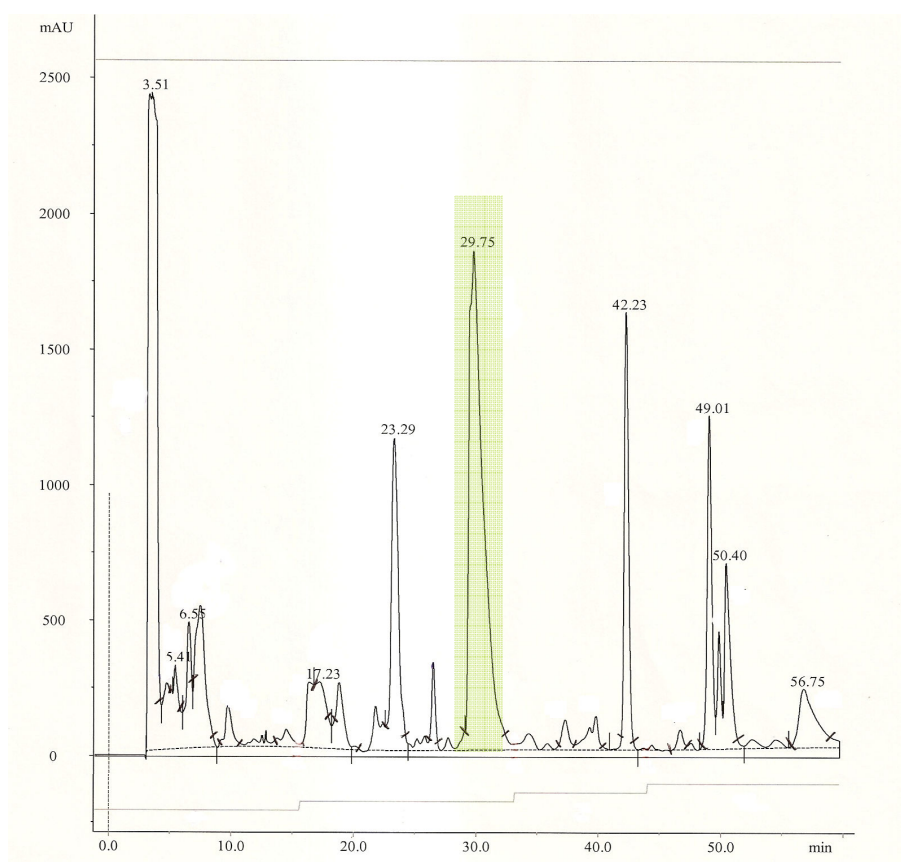


Figura 28. Cromatogramma RP-HPLC dell'estratto metanolico da foglie di *P. major*.

Il contenuto in aucubina dell'estratto metanolico è stato calcolato sulla base della retta di taratura ($y = 11,601x + 18,501$; $r^2 = 0,9999$), ottenuta con lo standard commerciale. Si è calcolato che l'aucubina rappresenta il 2.6% dell'estratto metanolico.

Considerando che l'aucubigenina è nota per l'attività antimicrobica, sono state valutate le condizioni per ottenere l'idrolisi del glucoside aucubina. L'aucubigenina viene liberata nelle foglie in seguito all'idrolisi enzimatica da parte delle β -glicosidasi.

Esperimenti *in vitro*, hanno evidenziato che incubando l'aucubina con la β -glicosidasi (EC 3.2.1.21) l'idrolisi del glucoside avviene quasi completamente entro 30 minuti, dato che la quantità di aucubina presente in soluzione si riduce del 90% (Figura 29). La reazione avviene in ambiente neutro e alla temperatura di 37°C. Al fine di idrolizzare 1 mg di aucubina, nelle condizioni appena riportate, è sufficiente 1U di enzima e la quantità in peso di aglicone che si produce è in rapporto ponderale di 1:2 rispetto al glicoside di partenza.

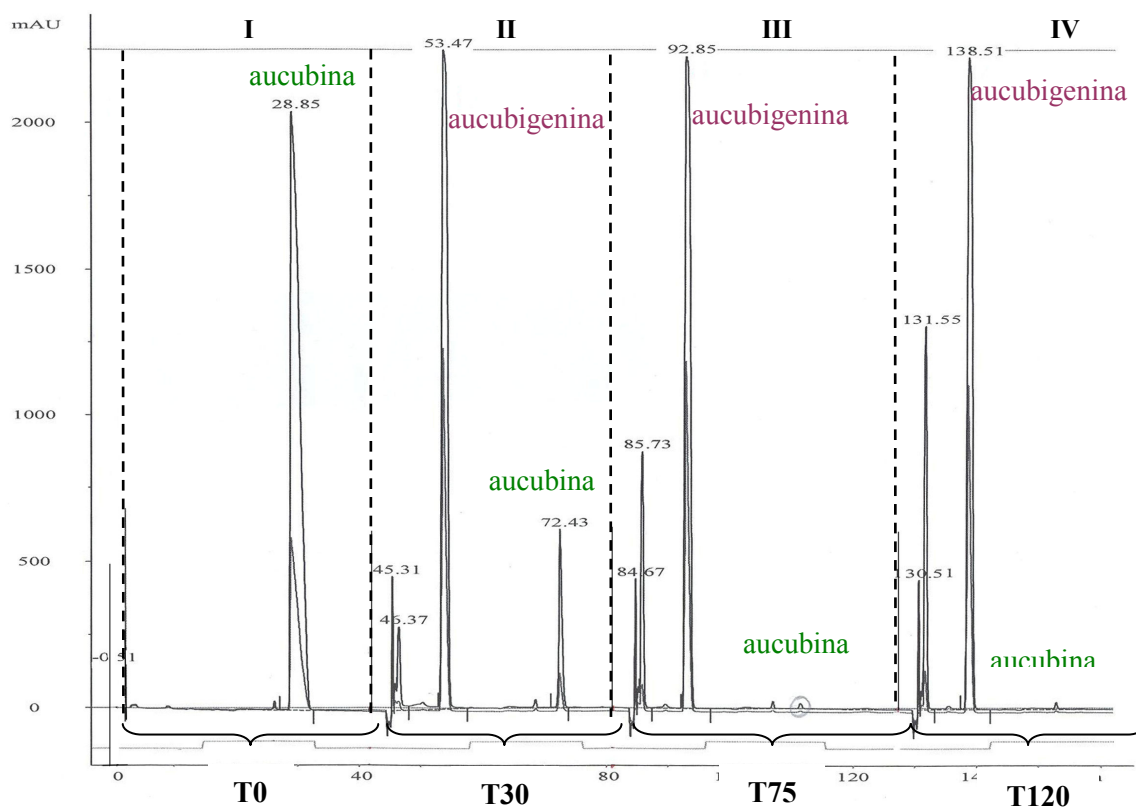


Figura 29. Cinetica di idrolisi enzimatica dell'aucubina (cromatogrammi RP-HPLC fino 120 minuti dall'incubazione con l'enzima β -glicosidasi).

L'aucubigenina è stata quindi sottoposta ai saggi di attività antimicrobica, determinando i valori di MIC nei confronti dei batteri *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e del fungo *C. albicans*. I risultati ottenuti hanno evidenziato come il composto possieda un'interessante attività antimicrobica, soprattutto nei confronti di *S. aureus* (Tabella 23).

Tabella 23. Attività antimicrobica dell'aucubigenina.

Ceppo batterico	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	62
<i>Escherichia coli</i> ATCC	250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	250
<i>Candida albicans</i> ATCC	250

La concentrazione batterica è di 5×10^5 CFU/ml; coltura in 5 % MH.

Successivamente, al fine di considerare il potenziale utilizzo dell'aucubigenina in formulazioni ad attività antimicrobica, sono stati condotti studi di estrazione per estrarre l'aucubina, da cui ricavare l'aucubigenina, senza impiegare il metanolo come solvente. A tale scopo, come solventi di estrazione sono stati utilizzati: 1) l'acqua o il metanolo come riferimento, 2) l'etanolo o l'etanolo acquoso al 75%, 3) l'acetato di etile. Gli esperimenti, riassunti in Tabella 24, hanno rivelato che, usando il metanolo come solvente di estrazione, si ottiene un estratto contenente lo 0.25% di aucubina, mentre usando l'acqua, l'etanolo, l'etanolo acquoso al 75% o l'acetato d'etile, si sono ottenuti degli estratti in cui non è stato possibile rilevare l'aucubina.

Tabella 24. Prove di estrazione dell'aucubina dalle foglie di *P. major*.

N° prova	Solvente di estrazione	Resa di estrazione (%)	Aucubina (% nell'estratto)
1	MeOH	4.2	0.25
1	H ₂ O	5.6	Non rilevata
2	EtOH acquoso 75 %	2.9	Non rilevata
2	EtOH 100%	3.7	Non rilevata
3	AcOEt	2.0	Non rilevata

Infine, è stato eseguito uno studio di stabilità del composto, determinando la sua concentrazione, mediante analisi RP-HPLC: è stato osservato che, a 4°C, la quantità dell'aglicone subisce una riduzione del 24 %, entro circa 6 giorni (Figura 30).

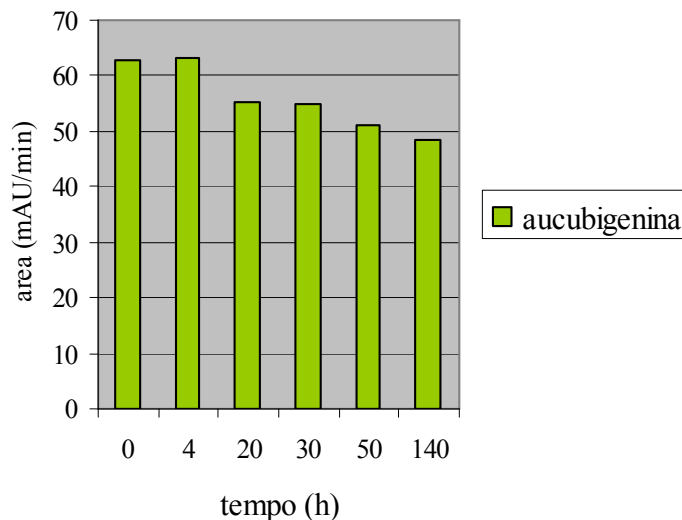


Figura 30. Stabilità dell'aucubigenina in soluzione acquosa a 4°C.

2.3.5. Discussione

I risultati di questo studio hanno evidenziato come l'acido ursolico e l'acido oleanolico possiedano interessanti proprietà antimicrobiche. L'acido ursolico, in particolare, ha mostrato una maggiore attività rispetto al suo isomero, soprattutto nei confronti di batteri Gram-positivi. È rilevante anche la sua attività antifungina contro *Candida albicans*. Per quanto riguarda il meccanismo d'azione, sembra che la presenza del gruppo idrossile sul C-3 sia importante, così come il gruppo carbossilico al C-28; entrambi fungono da utili sostituenti nella formazione di legami idrogeno (Shai *et al.*, 2008).

L'acido ursolico ed oleanolico, che oltre a possedere interessanti proprietà antimicrobiche, possiedono anche una potente attività antinfiammatoria, sono dei composti promettenti per l'impiego nel trattamento locale della mastite bovina. Infatti, a concentrazioni attive per l'attività antimicrobica, essi non sono risultati citotossici. L'assenza di citotossicità è confermata da studi su cellule PC12 (linea cellulare da feocromocitoma di ghiandola surrenalica da ratto), in cui non è stata osservata alcuna interferenza sulla vitalità cellulare a concentrazioni pari a 20 e 40 μM (Tsai & Yin, 2008).

Anche l'aglicone dell'aucubina mostra dati promettenti di attività antimicrobica nei confronti di batteri Gram-positivi, coinvolti nella mastite. Tuttavia, le basse rese di estrazione dell'aucubina e la necessità di liberare l'aucubigenina dal glucoside, mediante idrolisi, rappresentano uno svantaggio per un potenziale sfruttamento dell'attività antimicrobica di questo composto. Di conseguenza, i successivi studi, volti ad ottenere preparati a base di *P. major* per il trattamento della mastite, sono stati rivolti essenzialmente all'acido ursolico, più attivo dell'acido oleanolico sia come agente antimicrobico, sia come antinfiammatorio, ma con una citotossicità lievemente inferiore.

3. Ottimizzazione dei metodi di estrazione dell'acido ursolico da PM

3.1. Estrazione con etanolo o acetato di etile

In prospettiva dello sfruttamento delle proprietà antimicrobiche ed antinfiammatorie dell'acido ursolico ed oleanolico nel trattamento della mastite bovina, sono stati condotti studi volti a mettere a punto un metodo semplice di estrazione del triterpene, usando solventi non tossici o comunque meno tossici del cloroformio usato in precedenza. Gli studi condotti si sono concentrati prima di tutto sulla scelta del solvente di estrazione. A tale proposito, le foglie di *P. major* sono state sottoposte ad estrazioni con etanolo a diverse concentrazioni (50%, 75%, 100%) e con acetato di etile. Le rese percentuali di estrazione e le attività biologiche sono state messe a confronto con quelle dell'estratto in cloroformico, ottenuto e studiato nella prima fase della ricerca.

3.1.1. Estrazione con etanolo: rese ed attività antinfiammatoria

Le foglie fresche (500 g) sono state sottoposte ad estrazione per macerazione con le diverse soluzioni acquose di etanolo, in triplicato. Dopo 48 h sotto agitazione, le soluzioni estrattive sono state filtrate e portate a secco mediante rotavapor, ottenendo i rispettivi estratti, che successivamente sono stati analizzati per verificare il contenuto in acido ursolico ed oleanolico e sottoposti al test di attività antinfiammatoria *in vivo*.

Le rese di estrazione sono riportate in Tabella 25.

Tabella 25. Rese di estrazione delle foglie di PM con etanolo o etanolo acquoso.

	EtOH acq. 50%	EtOH acq. 75%	EtOH 100%
Resa di estrazione*	3.4%	2.6%	3.2%

*rispetto al peso del materiale vegetale fresco

L'attività antinfiammatoria degli estratti ottenuti è stata testata mediante il test di inibizione della dermatite da olio di Croton nel padiglione auricolare del topo. Gli estratti ottenuti con etanolo acquoso al 75% ed etanolo al 100% sono risultati i più attivi, determinando delle riduzioni dell'edema pari a rispettivamente 48% e 50%, alla dose di 300 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Tabella 26). L'estratto ottenuto con etanolo acquoso al 50%, a parità di dose, ha invece mostrato un'attività molto minore (18%). Tale estratto risulta pertanto poco efficiente e non è stato ulteriormente studiato.

Tabella 26. Attività antinfiammatoria degli estratti etanolici di *P. major*.

Sostanza	Dose ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	N° animali	Edema (mg) Media \pm E.S.	Riduzione %
Controllo	--	10	6.5 \pm 0.2	--
Estratto con EtOH 50 %	300	9	5.3 \pm 0.6*	18
Estratto con EtOH 75 %	300	11	3.3 \pm 0.4*	48
Estratto con EtOH 100 %	300	10	3.5 \pm 0.3*	50

* $p < 0.05$ al test "t" di Student, rispetto ai controlli.

Gli estratti ottenuti con etanolo acquoso al 75% e con etanolo al 100% sono stati purificati su colonna di gel di silice. La fase mobile utilizzata era composta da diclorometano e metanolo in rapporto di 8:2, per il primo estratto e in rapporto 9:1, per il secondo. Per entrambi gli estratti, dalla separazione cromatografica sono state ottenute 3 frazioni principali (frazioni 1-3). Il confronto con lo standard su lastra TLC ci ha permesso di individuare gli acidi triterpenici nella frazione 1 (frazione triterpenica) che rappresenta il 3% ed il 4% del primo e del secondo estratto, rispettivamente. Dalle rette di taratura ottenute con l'acido ursolico ($y = 6,4262x - 0,4924$; $r^2 = 0,997$) ed oleanolico ($y = 6,2041x + 52,533$; $r^2 = 0,9894$), sono stati quantificati i due triterpeni negli estratti e nella frazione 1 da essi ottenuta. E' stato così osservato che la resa di estrazione

dell'acido ursolico ed oleanolico era maggiore usando l'etanolo acquoso al 75% rispetto all'etanolo al 100%. Inoltre, nel caso di entrambi gli estratti, la concentrazione di acido ursolico era maggiore a quella dell'acido oleanolico (Tabella 27).

Tabella 27. Concentrazione di acido ursolico ed acido oleanolico negli estratti etanoliche di *P. major* e nella frazione triterpenica.

Triterpene	Estrazione con EtOH 75%		Estrazione con EtOH 100%	
	Estratto	Frazione 1	Estratto	Frazione 1
Acido ursolico (%)	1.15	35.4	0.85	24.2
Acido oleanolico (%)	0.38	13.4	0.29	8.4

3.1.2. Estrazione con acetato di etile: rese ed attività antimicrobica

Parallelamente, è stata condotta un'estrazione in acetato di etile per valutare la resa e poterla mettere a confronto con quelle ottenute con le estrazioni mediante etanolo o etanolo acquoso. L'estratto etilacetico, ottenuto per macerazione delle foglie fresche, è stato analizzato mediante HPLC per valutare il contenuto in acidi triterpenici. L'estratto etilacetico, senza essere sottoposto a purificazione, risulta contenere il 25% di acido ursolico e 4% di acido oleanolico. In questo caso non è stata effettuata una separazione degli acidi triterpenici mediante cromatografia su colonna in gel di silice, ma si è cercato di arricchire ulteriormente l'estratto in acido ursolico, già presente in elevate quantità.

A questo riguardo sono stati seguiti due diversi approcci:

- Filtrazione su carbone attivo (Baricevic *et al.*, 2001)
- Purificazione con etanolo acquoso al 30%.

Filtrazione su filtro in carbone attivo:

Le foglie essiccate (1 Kg) sono state estratte con 5 l di AcOEt, al fine di ottenere l'estratto etilacetico (resa: 20.8 g). Esso è risultato essere costituito per il 28% da acido ursolico. L'estratto è stato ridisciolti in acetato di etile e filtrato sottovuoto su carbone attivo, recuperando una soluzione da cui, in seguito ad evaporazione del solvente, è stata ottenuta una frazione triterpenica, ricca in acido ursolico (48%). L'estrazione del materiale vegetale con acetato di etile è stata ripetuta 3 volte e per ognuna di essa è stato determinato il contenuto di acido ursolico, osservando come già dopo la prima

estrazione viene estratta la maggior parte dell'acido ursolico. Inoltre, la percentuale di ursolico nell'estratto totale finale (ottenuto dalla riunione delle tre soluzioni estrattive) è diminuito, passando dal 28 al 20%, facendo supporre che la frazione triterpenica si sia arricchita anche in altre sostanze (Tabella 28).

La frazione totale è stata quindi filtrata su carbone attivo, ma è stato osservato che la percentuale in acido ursolico diminuiva al 15%. Ciò fa supporre che il carbone attivo trattiene un'alta percentuale di acido ursolico e per questo motivo, il metodo non risulta essere adatto per arricchire l'estratto etilacetico in acido ursolico.

Tabella 28. Concentrazione di acido ursolico nell'estratto etilacetico di *P. major*.

Estrazione con AcOEt	Acido ursolico (%)
I Estrazione	28
II Estrazione	9.7
III Estrazione	5.6
Totale	20

Purificazione con etanolo acquoso al 30 %

L'estratto in acetato di etile è stato purificato mediante controestrazione con una soluzione acquosa al 30% di etanolo, ripetuta per tre volte. Anche in questo caso la quantificazione dell'acido ursolico è stata effettuata mediante HPLC, sulla base della retta di taratura precedentemente riportata. E' stata determinata la percentuale di acido ursolico nell'estratto etilacetico dopo la prima estrazione con etanolo acquoso al 30% e dopo la terza. In questo modo è stato possibile ottenere un estratto arricchito in acido ursolico, la cui concentrazione è pari a circa il 40% (Tabella 29).

Tabella 29. Concentrazione di acido ursolico nell'estratto in etilacetato delle foglie di *P. major* dopo purificazione con etanolo acquoso al 30%.

Estratto etilacetico	Acido ursolico (%)
I Estrazione con EtOH 30%	28%
III Estrazione con EtOH 30%	39%

L'attività antimicrobica dell'estratto arricchito in acido ursolico è stata testata valutando la MIC nei confronti di ceppi batterici coinvolti nella mastite bovina. Esso ha mostrato una buona attività nei confronti di *S. aureus* ATCC e *S. epidermidis* 19 (MIC = 16 e 60 µg/ml, rispettivamente), se paragonata a quella dell'acido ursolico, che ha rivelato una MIC pari a 8 µg/ml nei confronti di *S. aureus* ATCC e 4 µg/ml nei confronti di *S. epidermidis* 19 (Tabella 30).

Tabella 30. Attività antimicrobica dell'estratto etilacetico delle foglie di *P. major*, purificato con etanolo acquoso al 30%.

Ceppo batterico (5×10^5 CFU/ml)	Estratto etilacetico purificato con EtOH 30 % (MIC; µg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	16
<i>Escherichia coli</i> ATCC	>500
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 19	60
<i>Streptococcus faecalis</i> 2903	92

* coltura in 30% MH per *S. epidermidis* 19 e *S. faecalis* 2903. L'estratto è risospeso in terreno MH contenente 5% DMSO.

3.1.3. Discussione

I risultati ottenuti mostrano come l'acetato di etile rappresenti un buon solvente per l'estrazione dei due acidi triterpenici dalle foglie di *P. major*, migliore del cloroformio e dell'etanolo per quanto riguarda la resa (Tabella 31).

Tabella 31. Concentrazione di acido ursolico ed oleanolico negli estratti di *P. major*.

	Estr. EtOH 75 %		Estr. EtOH 100 %		Estr. CHCl ₃		Estr. AcOEt	
	Estratto	FT	Estratto	FT	Estratto	FT	Estratto	FT
AU (%)	1.15	35.4	0.85	24.2	9.7	69	25	/
AO (%)	0.38	13.4	0.29	8.4	2.5	18	3.9	/

AU = acido ursolico; AO = acido oleanolico; FT = frazione triterpenica.

Considerando la tossicità, inferiore a quella del cloroformio, l'acetato di etile è stato scelto, per l'estrazione dell'acido ursolico e dell'acido oleanolico, allo scopo di

ottenere una frazione arricchita in tali composti, da impiegare nella formulazione di preparati per il trattamento della mastite.

Per quel che riguarda i metodi di purificazione si è visto che l'impiego del carbone attivo non fornisce risultati promettenti poiché trattiene un'alta percentuale di triterpene. Al contrario, la controestrazione con etanolo acquoso al 30% è risultata molto efficace poiché si è riusciti ad ottenere una frazione contenente circa il 40% di acido ursolico con un metodo di purificazione semplice, che non richiede l'impiego di tecniche cromatografiche.

4. Valutazione dell'attività antimicrobica degli estratti di *P. major* arricchiti in acido ursolico nei confronti di ceppi microbici di isolamento clinico

La frazione arricchita in acido ursolico e l'acido ursolico stesso sono stati sottoposti a studi di attività antimicrobica, valutando l'effetto nei confronti di ceppi batterici di isolamento clinico. I ceppi studiati sono stati *Staphylococcus aureus* 569, *Staphylococcus epidermidis* 41718-80, *Staphylococcus haemolyticus* 41718-111 isolati da latte di ovini con mastite, in previsione della sperimentazione *in vivo*. Gli ovini sono stati scelti, infatti, come animali su cui valutare l'efficacia di tali estratti nel trattamento della mastite, poiché rappresentano, rispetto ai bovini, una soluzione maggiormente gestibile, sia dal punto di vista economico che della conduzione dell'esperimento. In entrambi i casi, i principali microrganismi coinvolti nella mastite sono gli stessi, come ad esempio *S. aureus*, *S. epidermidis* ed *E. coli* (Contreras *et al.*, 2007; Winter & Colditz, 2002).

4.1. Determinazione della MIC dell'estratto etilacetico purificato e dell'acido ursolico

L'attività antimicrobica nei confronti di ceppi di isolamento clinico da ovini con mastite (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*) è stata valutata per l'estratto etilacetico purificato con etanolo acquoso al 30%, parallelamente all'acido ursolico. Dal confronto con i valori di MIC ottenuti sui ceppi batterici di riferimento, possiamo notare alcune differenze: l'acido ursolico ha rivelato un valore di MIC nei confronti del ceppo di isolamento clinico di *S. aureus* (4 µg/ml) minore rispetto a quello mostrato verso il ceppo standard ATCC (MIC = 23 µg/ml). Questo non avviene per quel che riguarda *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*. L'estratto etilacetico sembra essere più

attivo verso i ceppi da isolato clinico, soprattutto per quel che riguarda *S. epidermidis* (Tabella 32).

Tabella 32. Attività antimicrobica dell'estratto etilacetico purificato e dell'acido ursolico nei confronti di ceppi batterici di isolamento clinico da mastite ovina.

Ceppo batterico (5×10^5 CFU/ml)	Acido ursolico (MIC; $\mu\text{g/ml}$)	Estr. Etilacetico purificato con EtOH 30% (MIC; $\mu\text{g/ml}$)
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	30
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	30	40
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	30	45

* coltura in 30% MH per *S. epidermidis* 19 e *S. faecalis* 2903. L'estratto è risospeso in 5% DMSO.

Nella fase finale del lavoro di dottorato, si è predisposto, in collaborazione con i gruppi coordinati dal Prof. Stefanon e dalla Prof.ssa Zanetti dell'Università di Udine, un esperimento *in vivo* negli ovini, a conclusione dell'attività di ricerca riguardante le proprietà antinfiammatorie e antimicrobiche di piantaggine maggiore. In previsione della più probabile formulazione da applicare agli animali con mastite e alla luce dei risultati ottenuti, si è puntata l'attenzione verso l'acido ursolico, studiando più in dettaglio la sua attività antimicrobica.

4.2. Saggi di time killing sull'acido ursolico

In base ai valori di MIC, è stato possibile pianificare esperimenti di "time killing" nei confronti di *S. aureus* e *S. epidermidis*, per determinare il potere battericida dell'acido ursolico. Inizialmente è stata saggiata l'attività verso i ceppi standard sia di *S. aureus* che di *S. epidermidis*, selezionati come maggiori rappresentanti dei batteri coinvolti nella mastite. Successivamente, sono stati eseguiti gli stessi esperimenti sui ceppi da isolamento clinico.

Staphylococcus aureus ATCC

In riferimento al valore di MIC dell'acido ursolico (23 $\mu\text{g/ml}$) è stato valutato il suo potere battericida a 30, 60, 90, 120 e 360 minuti dal trattamento alla concentrazione

di 0.2 mg/ml. Dalla Figura 31 si può constatare che l'acido ursolico è in grado di ridurre la concentrazione batterica di 4 log, in un'ora e di portarla a 0 entro due ore.

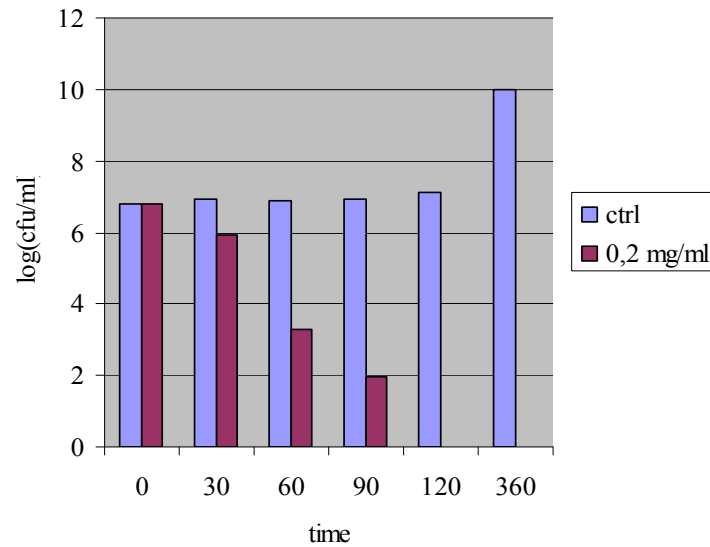


Figura 31. Attività battericida dell'acido ursolico nei confronti di *S. aureus* ATCC.

Staphylococcus epidermidis 19

Nelle stesse condizioni, è stato saggiato il potere battericida dell'acido ursolico nei confronti del ceppo standard di *S. epidermidis*, alla concentrazione di 0.05 mg/ml, che corrisponde a circa dieci volte il valore di MIC (4 µg/ml). Come si può notare dalla Figura 32, nelle due ore successive all'incubazione con il triterpene, la concentrazione batterica si è ridotta di almeno 4 log. Il completo potere battericida del triterpene è stato osservato dopo più di due ore dall'incubazione.

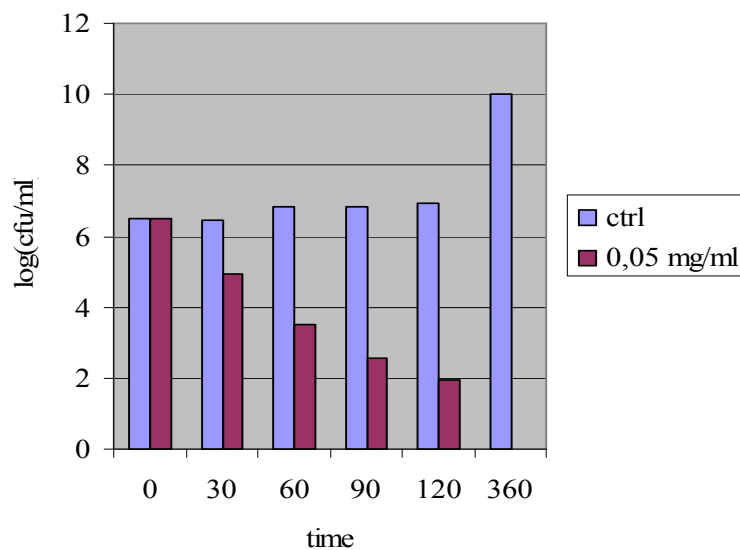


Figura 32. Attività battericida dell'acido ursolico nei confronti di *S. epidermidis* 19.

Staphylococcus epidermidis da isolato clinico di pecora

Per indurre la mastite negli animali, che verranno impiegati nell'esperimento *in vivo*, è stato scelto un inoculo di *Staphylococcus epidermidis* 41718-80. Le ragioni di questa scelta sono soprattutto di tipo etico, per evitare di sacrificare gli animali dopo l'esperimento.

A questo punto è stato necessario approfondire lo studio dell'attività dell'acido ursolico nei confronti di *S. epidermidis* da isolamento clinico.

Due diverse concentrazioni di acido ursolico sono state testate nei confronti di *S. epidermidis* 41718-80, ossia 0.05 mg/ml, che corrisponde all'incirca alla MIC (30 µg/ml) e 0.3 mg/ml, che corrisponde ad una concentrazione 10 volte la stessa. L'acido ursolico ha mostrato un'attività concentrazione-dipendente, risultando battericida entro due ore, alla concentrazione di 0.3 mg/ml. Alla concentrazione di 0.05 mg/ml non si è avuto l'azzeramento della carica batterica neanche nell'arco delle 6 ore totali, ma la concentrazione è diminuita di circa 4 Log (Figura 33).

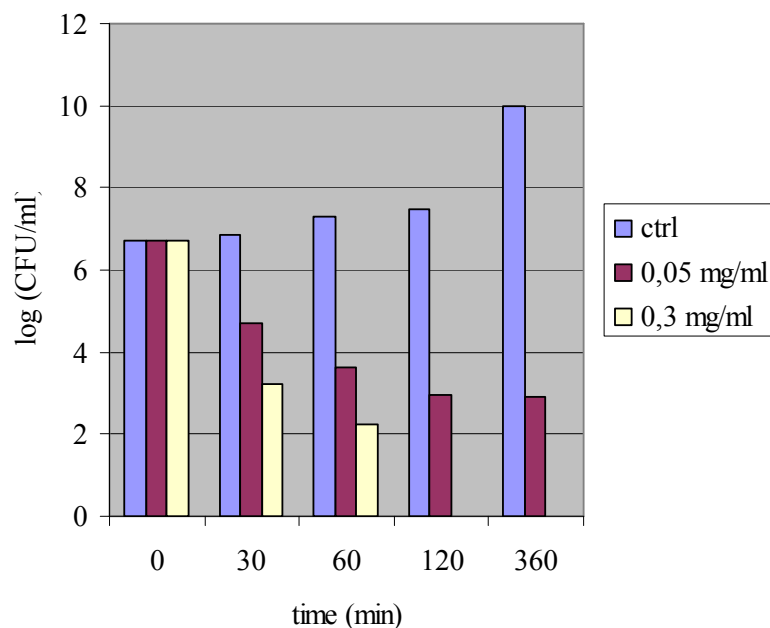


Figura 33. Attività battericida dell'acido ursolico nei confronti di *S. epidermidis* 41718-80.

Per poter saggiare il principio attivo in condizioni che rispecchino il più possibile la situazione *in vivo*, sono stati eseguiti esperimenti utilizzando, come mezzo di coltura, alcuni campioni di latte prelevati da pecore affette da mastite. Il latte è stato fornito direttamente da un allevatore presente in Regione (Tramonti di Sotto, UD), subito dopo la mungitura. Prima dell'utilizzo, il latte è stato pastorizzato termostatando

a 63°C per 30 minuti. In questo modo è stata eliminata la carica batterica presente per quel che riguarda i patogeni, senza alterare la flora batterica caratteristica. Il latte pastorizzato è stato conservato a -20°C fino all'utilizzo.

In modo particolare è stato eseguito un ulteriore esperimento di “time killing”, diluendo in latte e non in terreno di coltura, le sospensioni batteriche da piastrare. Le concentrazioni di acido ursolico testate sono state sempre 0.05 e 0.3 mg/ml. L'attività dell'acido ursolico si è rivelata molto minore rispetto a quella osservata direttamente sul ceppo di isolamento clinico in terreno di coltura. In particolare, esso ha perso il suo potere battericida e ha mostrato piuttosto un effetto batteriostatico, che coincide ad entrambe le concentrazioni (Figura 34).

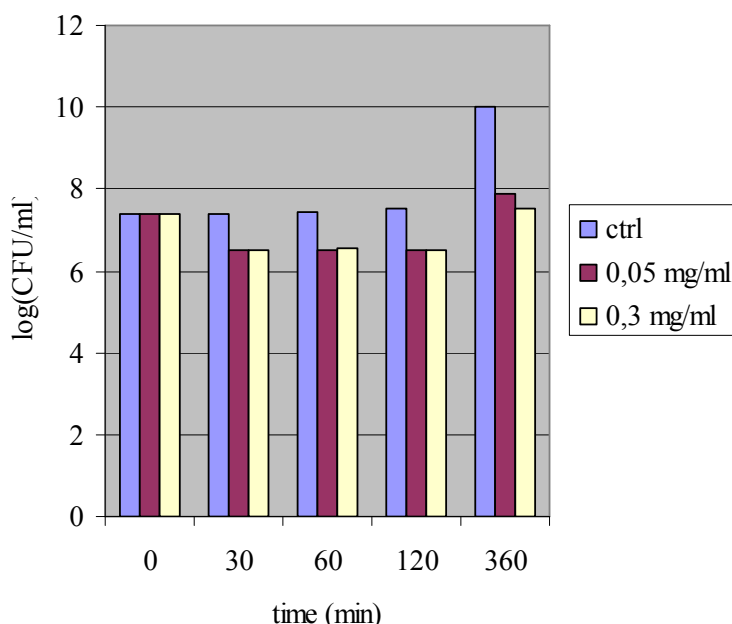


Figura 34. Attività battericida dell'acido ursolico nei confronti di *S. epidermidis* 41718-80 in latte da ovino con mastite.

Si può ipotizzare che il latte interferisca con la sostanza in esame, annullando in parte il suo effetto. Il fatto che l'attività batteriostatica sia uguale ad entrambe le concentrazioni, fa presupporre che le molecole contenute nel latte, ad esempio le proteine o altre sostanze lipofile, possano sequestrare l'acido ursolico, rendendolo meno disponibile. Il latte contiene, infatti, specifiche proteine (caseine, α -lactoalbumine, β -lactoglobuline) che sono prodotte dalle cellule epiteliali della ghiandola mammaria e che possono potenzialmente legare molecole disciolte (Gehring & Smith, 2006).

4.3. Attività antimicrobiche dell'antibiotico scelto

Dall'antibiogramma di *S. epidermidis* 41718-80, si è constatato che il batterio è in genere sensibile a molti degli antibiotici presenti in commercio. Tra questi è stata scelta la kanamicina solfato, come farmaco di riferimento da utilizzare nell'esperimento *in vivo*. Come test preliminari per verificare l'attività antimicrobica della kanamicina solfato sono stati eseguiti saggi di MIC (Tabella 33) e di MIC checkerboard (Tabella 34), per valutare un'eventuale interazione tra l'antibiotico e l'acido ursolico.

Tabella 33. Attività antimicrobica della kanamicina solfato nei confronti di ceppi batterici di isolamento clinico da mastite ovina.

Ceppo batterico (5×10^5 CFU/ml)	Kanamicina solfato (MIC; $\mu\text{g/ml}$)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2

S.aureus: 5% MH; *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*: 30% MH.

Come riportato in Tabella 33, la kanamicina solfato ha rivelato una MIC pari a 4 $\mu\text{g/ml}$ nei confronti di *S. epidermidis* 41718-80, mentre l'acido ursolico aveva rivelato una MIC pari a 30 $\mu\text{g/ml}$. In base a questi dati è stato allestito un esperimento di MIC checkerboard per l'antibiotico, in associazione con l'acido ursolico.

Tabella 34. Saggio di MIC *checkerboard* di acido ursolico e kanamicina solfato nei confronti del ceppo da isolato clinico di *S. epidermidis*.

		Acido ursolico; MIC = 30 µg/ml					
		Kanamicina; MIC = 4 µg/ml					
	K						
4							
2							
1							
0.5			MIC				
0,25							
0							UA
		0	3,75	7,5	15	30	60

S. epidermidis 41718-80 (5×10^5 CFU/ml)

FIC = 0.4

Dai risultati ottenuti è emerso un possibile sinergismo tra i due composti in esame, in quanto, la presenza reciproca diminuisce i valori di MIC di entrambi, nei confronti di *S. epidermidis*.

4.4. Discussione

L'attività dell'acido ursolico nei confronti di *S. epidermidis* 41718-80 consiste in un'azione battericida a concentrazioni di poco maggiori al valore di MIC, ma che sono, contemporaneamente, di molto inferiori a quelle utilizzate nell'esperimento *in vivo*. (139 mg/ml nella formulazione). Quando i saggi di time killing sono stati svolti utilizzando il latte come mezzo di coltura, l'acido ursolico ha mostrato un'attività differente rispetto a quelli svolti in Mueller Hinton. Nonostante sia diminuita la sua attività antimicrobica, ha comunque conservato un'azione batteriostatica. Questo fa presupporre una probabile interazione dell'acido ursolico con le componenti del latte, in grado di diminuirne la biodisponibilità.

5. Studi di formulazione

5.1. Preparazione delle siringhe intramammarie

Sulla base dell'esempio di alcune formulazioni presenti in commercio, è stata messa a punto una formulazione contenente acido ursolico, da utilizzare nell'esperimento *in vivo* su ovini, a cui verrà indotta una mastite batterica.

Gli eccipienti sono stati scelti sulla base delle caratteristiche chimiche dell'acido ursolico e dell'ambiente intramammario, in cui la sostanza dovrà agire. L'acido ursolico è una molecola di natura lipofila, insolubile in acqua e debolmente acida ($pK_a = 5.29$).

Per quel che riguarda l'ambiente interno della ghiandola mammaria invece è necessario considerare diversi aspetti. Essa è costituita da una serie di dotti ramificati, ricoperti da uno strato di cellule epiteliali, che terminano in alveoli rivestiti, a loro volta, da un singolo strato di cellule epiteliali di tipo secretorio. Si presuppone che il farmaco agisca a livello delle cellule epiteliali ed in parte venga assorbito. Tuttavia, l'ambiente intramammario, in cui è secreto il latte, è fondamentalmente idrofilo poiché lo è la fase esterna del latte stesso (emulsione). Si deduce che le molecole non ionizzate e lipidiche siano quelle più facilmente distribuite nella parte profonda della ghiandola mammaria e quindi quelle con più facilità ad essere assorbite dalle membrane cellulari lipofile. In caso di mastite, ci sono anche altri fattori che influenzano la distribuzione e l'assorbimento; ad esempio, è stato osservato che, talvolta, lo sfaldamento delle cellule epiteliali a causa dell'infiammazione, agevola l'assorbimento dei farmaci, come nel caso della gentamicina. Il latte stesso subisce dei cambiamenti; ad esempio, il suo pH aumenta per la presenza dell'infezione batterica ed alcune proteine, come l'albumina possono aumentare, ed altre, come le caseine, diminuire (Gehring & Smith, 2006).

Come forma farmaceutica, si è deciso di preparare un gel lipofilo, nel quale l'acido ursolico è stato incorporato; la preparazione è stata dispensata in appositi applicatori, sterilizzati con luce UV per 30 minuti. Il riempimento è avvenuto sotto cappa a flusso laminare per preservare il più possibile la sterilità. In modo particolare sono state preparate diverse combinazioni, per testare la scorrevolezza e la consistenza del gel.

La ricetta definitiva per siringa intramammaria prevede:

Paraffina solida	0.83g
Paraffina liquida	2.75g
Magnesio stearato (agente lubrificante)	0.025g
Metilparaidrossibenzoato (conservante)	0.025g
Silice (gelificante)	0.012g
Principio attivo	0.5g

Il peso totale di riempimento corrisponde a 3 g (3.6 ml). Aggiungendo 500 mg di acido ursolico otteniamo un gel che contiene il principio attivo ad una concentrazione di 139 mg/ml.

I campioni sono stati conservati a temperature diverse per poter valutare la stabilità della formulazione: alcuni sono rimasti a temperatura ambiente ed altri sono stati posti a 4°C. In entrambi i casi, la preparazione ha conservato, nel tempo, le sue caratteristiche di scorrevolezza.

5.2. Saggi di time killing sulla formulazione

Per verificare un'eventuale interazione del gel con il latte mastitico e studiarne l'effetto sulla crescita batterica, è stato eseguito un ulteriore saggio di time killing. In questo caso il campione contenente i batteri, diluiti in terreno MH (I) ed in latte (II), è stato incubato a 37°C in presenza della formulazione in modo da avere un'alta concentrazione di acido ursolico (10 mg/ml).

I risultati non mostrano significative differenze di crescita tra i due esperimenti; in entrambi i casi, sia in Mueller Hinton, che in latte, l'acido ursolico presente nella formulazione ha mostrato un'azione batteriostatica ad una concentrazione molto elevata (Figura 35).

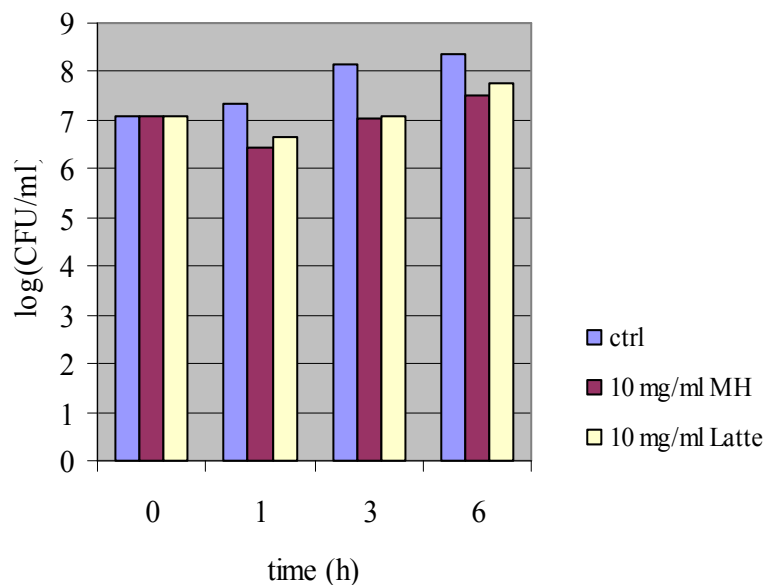


Figura 35. Attività battericida dell'acido ursolico nella formulazione (139 mg/ml) nei confronti di *S. epidermidis* 41718-80 (saggio di “time killing” in MH e in latte).

5.3. Discussione

L'utilizzo del latte come mezzo di coltura ci ha permesso di creare un ambiente più simile possibile a quello in cui agiranno la formulazione e l'acido ursolico contenuto. In questo caso la diminuzione dell'attività batteriostatica dell'acido ursolico potrebbe essere dovuta ad una minore biodisponibilità della sostanza, a causa della natura lipofila degli eccipienti che lo contengono. Nonostante l'elevata concentrazione di acido ursolico, l'interazione con i batteri presenti nel latte, la cui fase esterna è idrofila, risulta difficoltosa, per una maggiore affinità con la formulazione lipofila. Questo potrebbe comportare una maggiore disponibilità dell'acido ursolico ad interagire con le cellule epiteliali della ghiandola mammaria ed un conseguente migliore assorbimento. Non avendo a disposizione un modello *in vitro* di epitelio ghiandolare, che ci permetta di ricreare maggiormente l'ambiente intramammario, sarà possibile valutare l'effetto della formulazione solo *in vivo*.

6. Esperimento *in vivo* su pecore mastitiche

In collaborazione con i gruppi coordinati dal Prof. Stefanon e dalla Prof.ssa Zanetti dell'Università di Udine, verrà condotto un esperimento *in vivo*, su ovini. Agli animali verrà indotta la mastite, per inoculo con 1×10^7 del ceppo da isolato clinico di *S.*

epidermidis 41718-80. Al II e al III giorno dall'inoculo, dopo svuotamento della ghiandola mammaria, verrà eseguito il trattamento secondo lo schema indicato nel paragrafo 6 del capitolo "Materiali e metodi".

A giorni alterni dal trattamento, sui campioni di latte prelevato, verrà determinata la carica batterica totale (CBT) ed eseguita la conta delle cellule somatiche (SCC), per potere determinare l'effetto dei diversi trattamenti.

L'esperimento, alla consegna della presente tesi, è tuttavia in atto.

CONCLUSIONI

Nel corso dell'attività di dottorato di ricerca sono state studiate le proprietà antinfiammatorie ed antimicrobiche di *Hippophae rhamnoides* (Elaeagnaceae) e *Plantago major* (Plantaginaceae), due specie vegetali presenti in Friuli Venezia Giulia, allo scopo di individuare fonti alternative di molecole utili nel trattamento della mastite degli animali da reddito, anche nell'ambito di allevamenti biologici, dove l'impiego dei farmaci è limitato da normative europee.

Nella prima parte del lavoro è stata dimostrata un'effettiva attività antinfiammatoria e/o antimicrobica di alcuni estratti e frazioni ottenuti da entrambe le specie. In particolare, i frutti di **olivello spinoso** hanno rivelato interessanti proprietà antinfiammatorie per via topica, *in vivo*, correlate alla presenza di trigliceridi e di composti di natura flavonoidica. Per quel che riguarda l'attività antimicrobica, la ricerca di peptidi antimicrobici ha comportato diverse difficoltà, dovute al variabile contenuto in tali molecole, che può essere correlata all'influenza delle condizioni ambientali in cui crescono le piante.

I risultati più promettenti sono stati ottenuti invece dalla **piantaggine maggiore**, le cui foglie hanno rivelato notevoli proprietà antiflogistiche ed antimicrobiche. In particolare, in entrambe le attività, sembrano giocare un ruolo determinante gli acidi triterpenici, quali l'acido ursolico e l'acido oleanolico. L'acido ursolico, infatti, si è mostrato più potente dell'acido oleanolico per la sua attività antimicrobica, sia nei confronti di ceppi batterici standard, sia nei confronti di ceppi da isolamento clinico da animali con mastite. Inoltre, l'acido ursolico ha rivelato un'attività antiflogistica circa due volte maggiore a quella dell'indometacina e tre volte maggiore a quella dell'acido oleanolico.

Nell'ottica di individuare molecole dotate sia di attività antimicrobica che di attività antinfiammatoria, è stato individuato l'acido ursolico come principio attivo potenzialmente utile nel trattamento della mastite in animali da reddito. Pertanto, allo scopo di ottenere una formulazione ad uso intramammario per il trattamento della mastite bovina, è stato preparato un gel lipofilo contenente acido ursolico, da sottoporre ad uno studio *in vivo* su ovini, a cui è stata indotta la mastite per inoculo di *S. epidermidis*, da isolato clinico. L'esperimento è tuttavia in corso di esecuzione.

Se tale formulazione dovesse rivelarsi utile nella cura della mastite, potrebbe diventare interessante verificare quale effetto avrebbe sulla patologia, l'integrazione

della dieta del bestiame con *P. major*. In caso di sufficiente accumulo dell'acido ursolico e comprovata l'assenza di citotossicità, l'utilizzo di *Plantago major* quale integratore alimentare potrebbe essere utile nella prevenzione della patologia.

Oggi giorno i maggiori problemi derivanti dal trattamento farmacologico riguardano la presenza di residui negli alimenti e l'insorgenza di ceppi batterici farmaco-resistenti. Questi aspetti importanti per qualsiasi tipo di allevamento, sono di fondamentale rilevanza anche per la salute pubblica. Nell'ottica, quindi, di ridurre l'utilizzo di farmaci allopatrici in campo veterinario, i prodotti fitoterapici a base di *Plantago major* potrebbero rappresentare una valida alternativa terapeutica.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Antcheva, N.; Zelezetsky, I.; Tossi, A. (2006). *The Handbook of Biologically Active Peptides* 11: 55-65.
- 2) Arimboor, R.; Venugopalan, V.; Sarinkumar, K.; Arumughan, C.; Sawhney, R. (2006). Integrated processing of fresh indian sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) berries and chemical evaluation of products. *J Sci Food Agric* 86: 2345-2353.
- 3) Arimboor, R.; Kumar, K.S.; Arumughan, C. (2008). Simultaneous estimation of phenolic acids in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) using RP-HPLC with dad. *J Pharm Biomed Anal* 47: 31-38.
- 5) Balunas, M.J.; Kinghorn, A.D. (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci* 78: 431-441.
- 6) Baricevic, D.; Sosa, S.; Della Loggia, R.; Tubaro, A.; Simonovska, B.; Krasna, A.; Zupancic, A. (2001). Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *J Ethnopharmacol* 75: 125-132.
- 7) Bekker, N.; Glushenkova, A.I. (2001). Components of certain species of the elaeagnaceae family.. *Chemistry of Natural Compounds* 37: 97-116.
- 8) Beveridge, T.; Harrison, J.E.; Drover, J. (2002). Processing effects on the composition of sea buckthorn juice from *Hippophae rhamnoides* L. cv. indian summer. *J Agric Food Chem* 50: 113-116.
- 9) Bezákova, L.; Masterová, I.; Paulíková, I.; Psenák, M. (1996). Inhibitory activity of isorhamnetin glycosides from *Calendula officinalis* L. on the activity of lipoxygenase. *Pharmazie* 51: 126-127.
- 10) Botelho, M.G. (2000). Fractional inhibitory concentration index of combinations of antibacterial agents against cariogenic organisms. *J Dent* 28: 565-570.

- 11) Brevoort P. (1998). The blooming u.s. botanical market: a new overview.. *Herbalgram* 44: 33-46.
- 12) Busani, L.; Graziani, C.; Franco, A.; Di Egidio, A.; Grifoni, G.; Formato, G.; Sala, M.; Binkin, N.; Battisti, A. (2003). Gli antibiotici nell'allevamento bovino: risultati di un'indagine tra i veterinari del settore. *Notiziario dell'Istituto superiore di sanità*. 16: 7-8.
- 13) Calixto, J.B.; Otuki, M.F.; Santos, A.R.S. (2003). Anti-inflammatory compounds of plant origin. part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa b (nf-kappab). *Planta Med* 69: 973-983.
- 14) Calixto, J.B.; Campos, M.M.; Otuki, M.F.; Santos, A.R. (2004). Anti-inflammatory compounds of plant origin. part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med* 70: 93-103.
- 15) Cheng, J.; Kondo, K.; Suzuki, Y.; Ikeda, Y.; Meng, X.; Umemura, K. (2003). Inhibitory effects of total flavones of *Hippophae rhamnoides* L. on thrombosis in mouse femoral artery and in vitro platelet aggregation. *Life Sci* 72: 2263-2271.
- 16) Chilton, F.H.; Rudel, L.L.; Parks, J.S.; Arm, J.P.; Seeds, M.C. (2008). Mechanisms by which botanical lipids affect inflammatory disorders. *Am J Clin Nutr* 87: 498S-503S.
- 17) Contreras, A.; Sierra, D.; Sanchez, A.; Corrales, J.; Marco, J.; Paape, M.; Gonzalo, C. (2007). Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research* 68: 145-153.
- 18) Costantini E. (1998). Bordan e tarnep, storie di vite ator dal lac. *Amministrazione Comunale di Bordano*. 119-120.
- 19) Das, U.N. (2006). Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. *Biotechnol J* 1: 420-439.

- 20) Davini, E.; Javarone, C.; Trogolo, C.; Aureli, P.; Pasolini, B. (1986). The quantitative isolation and antimicrobial activity of the aglycone of aucubin. *Phytochemistry* 25: 2420-2422.
- 21) De Sousa, E.; Zanatta, L.; Seifriz, I.; Creczynski-Pasa, T.; Pizzolatti, M.; Szpoganicz, B.; Silva, F. (2004). Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3,7-o-(alpha)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves. *J Nat Prod* 67: 829-832.
- 22) De Verdier, K.; Ohagen, P.; Alenius, S. (2003). No effect of a homeopathic preparation on neonatal calf diarrhoea in a randomised double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Acta Vet Scand* 44: 97-101.
- 23) Dharmappa, K.K.; Kumar, R.V.; Nataraju, A.; Mohamed, R.; Shivaprasad, H.V.; Vishwanath, B.S. (2009). Anti-inflammatory activity of oleanolic acid by inhibition of secretory phospholipase a2. *Planta Med* 75: 211-215.
- 24) Dongmo, A.B.; Miyamoto, T.; Yoshikawa, K.; Arihara, S.; Lacaille-Dubois, M. (2007). Flavonoids from *Acacia pennata* and their cyclooxygenase (cox-1 and cox-2) inhibitory activities. *Planta Med* 73: 1202-1207.
- 25) Drake, D.R.; Brogden, K.A.; Dawson, D.V.; Wertz, P.W. (2008). Thematic review series: skin lipids. Antimicrobial lipids at the skin surface. *J Lipid Res* 49: 4-11.
- 26) Erskine, R.J.; Bartlett, P.C.; Tavernier, S.R.; Fowler, L.H.; Walker, R.D.; Seguin, J.H.; Shuster, D. (1998). Recombinant bovine interleukin-2 and dry cow therapy: efficacy to cure and prevent intramammary infections, safety, and effect on gestation. *J Dairy Sci* 81: 107-115.
- 27) Fey, P.D.; Safranek, T.J.; Rupp, M.E.; Dunne, E.F.; Ribot, E.; Iwen, P.C.; Bradford, P.A.; Angulo, F.J.; Hinrichs, S.H. (2000). Ceftriaxone-resistant salmonella infection acquired by a child from cattle. *N Engl J Med* 342: 1242-1249.

- 28) Fitzpatrick, J. (2000). Staphylococcus aureus mastitis: past problems, future risks.. *Cattle Practice* 3: 273-277.
- 29) Ganju, L.; Padwad, Y.; Singh, R.; Karan, D.; Chanda, S.; Chopra, M.K.; Bhatnagar, P.; Kashyap, R.; Sawhney, R.C. (2005). Anti-inflammatory activity of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaves. *Int Immunopharmacol* 5: 1675-1684.
- 30) Gao, X.; Ohlander, M.; Jeppsson, N.; Björk, L.; Trajkovski, V. (2000). Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. *J Agric Food Chem* 48: 1485-1490.
- 31) Geetha, S.; Sai Ram, M.; Singh, V.; Ilavazhagan, G.; Sawhney, R.C. (2002). Anti-oxidant and immunomodulatory properties of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*)-- an *in vitro* study. *J Ethnopharmacol* 79: 373-378.
- 32) Gehring, R.; Smith, G.W. (2006). An overview of factors affecting the disposition of intramammary preparations used to treat bovine mastitis. *J Vet Pharmacol Ther* 29: 237-241.
- 33) Gomez-Flores, R.; Calderon, C.L.; Scheibel, L.W.; Tamez-Guerra, P.; Rodriguez-Padilla, C.; Tamez-Guerra, R.; Weber, R.J. (2000). Immunoenhancing properties of *Plantago major* leaf extract. *Phytother Res* 14: 617-622.
- 34) Green, M.J.; Bradley, A.J.; Medley, G.F.; Browne, W.J. (2007). Cow, farm, and management factors during the dry period that determine the rate of clinical mastitis after calving. *J Dairy Sci* 90: 3764-3776.
- 35) Guliyev, V.B.; Gul, M.; Yildirim, A. (2004). *Hippophae rhamnoides* L.: chromatographic methods to determine chemical composition, use in traditional medicine and pharmacological effects. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 812: 291-307.
- 36) Halasa, T.; Huijps, K.; Østerås, O.; Hogeveen, H. (2007). Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Vet Q* 29: 18-31.

- 37) Hetland, G.; Samuelsen, A.B.; Løvik, M.; Paulsen, B.S.; Aaberge, I.S.; Groeng, E.C.; Michaelsen, T.E. (2000). Protective effect of *Plantago major* L. pectin polysaccharide against systemic streptococcus pneumoniae infection in mice. *Scand J Immunol* 52: 348-355.
- 38) Holetz, F.B.; Pessini, G.L.; Sanches, N.R.; Cortez, D.A.G.; Nakamura, C.V.; Filho, B.P.D. (2002). Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 1027-1031.
- 39) Hsu, H.Y.; Yang, J.J.; Lin, C.C. (1997). Effects of oleanolic acid and ursolic acid on inhibiting tumor growth and enhancing the recovery of hematopoietic system postirradiation in mice. *Cancer Lett* 111: 7-13.
- 40) Hyun, S.K.; Jung, H.A.; Chung, H.Y.; Choi, J.S. (2006). In vitro peroxynitrite scavenging activity of 6-hydroxykynurenic acid and other flavonoids from *Ginkgo biloba* yellow leaves. *Arch Pharm Res* 29: 1074-1079.
- 41) Ikeda, Y.; Murakami, A.; Ohigashi, H. (2008). Ursolic acid: an anti- and pro-inflammatory triterpenoid. *Mol Nutr Food Res* 52: 26-42.
- 42) Kallio, H.; Baoru, Y.; Tahvonen, R.; Hakala, M. (2000). Composition of seabuckthorn berries of various origins. International workshop on sea buckthorn. (IWS-99) Aug. 29 - Sept. 2, Beijing, P.R. China.: 17-23.
- 43) Kallio, H.; Yang, B.; Peippo, P.; Tahvonen, R.; Pan, R. (2002). Triacylglycerols, glycerophospholipids, tocopherols, and tocotrienols in berries and seeds of two subspecies (ssp. *sinensis* and *mongolica*) of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*). *J Agric Food Chem* 50: 3004-3009.
- 44) Kaufman, P.; Cseke, L.; Warber, S.; Duke, J.; Brielmann, H. (1999). Natural products from plants. *CRC Press, Boca Raton, FL* : .
- 45) Kim, H.; Son, K.; Chang, H.; Kang, S. (2004). Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences* 96: 229-245.

- 46) Kitchen, B.J.; Middleton, G.; Durward, I.G.; Andrews, R.J.; Salmon, M.C. (1980). Mastitis diagnostic tests to estimate mammary gland epithelial cell damage. *J Dairy Sci* 63: 978-983.
- 47) Lay, F.T.; Anderson, M.A. (2005). Defensins--components of the innate immune system in plants. *Curr Protein Pept Sci* 6: 85-101.
- 48) Li, T.; Beveridge, T.(B.; Schroeder, W.; Small, E. (2003). Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.): production and utilization.. *NRC Research Press, Ottawa, Ontario*.
- 49) Li, Y.; Xu, C.; Zhang, Q.; Liu, J.Y.; Tan, R.X. (2005). In vitro anti-helicobacter pylori action of 30 chinese herbal medicines used to treat ulcer diseases. *J Ethnopharmacol* 98: 329-333.
- 50) Liu, J. (1995). Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J Ethnopharmacol* 49: 57-68.
- 51) Lokar, L.C.; Poldini, L. (1988). Herbal remedies in the traditional medicine of the venezia giulia region (north east Italy). *J Ethnopharmacol* 22: 231-279.
- 52) Mahady, G.B. (2005). Medicinal plants for the prevention and treatment of bacterial infections. *Curr Pharm Des* 11: 2405-2427.
- 53) Miceli, N.; Taviano, M.F.; Giuffrida, D.; Trovato, A.; Tzakou, O.; Galati, E.M. (2005). Anti-inflammatory activity of extract and fractions from *Nepeta sibthorpii* bentham. *J Ethnopharmacol* 97: 261-266.
- 54) Mishra, K.P.; Chanda, S.; Karan, D.; Ganju, L.; Sawhney, R.C. (2008). Effect of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) flavone on immune system: an in-vitro approach. *Phytother Res* 22: 1490-1495.
- 55) Mozaffarian, D. (2006). Trans fatty acids - effects on systemic inflammation and endothelial function. *Atheroscler Suppl* 7: 29-32.

- 56) Mukherjee, R.; De, U.K.; Ram, G.C. (2009). Evaluation of mammary gland immunity and therapeutic potential of *Tinospora cordifolia* against bovine subclinical mastitis. *Trop Anim Health Prod* : .
- 57) Padovan, L.; Segat, L.; Tossi, A.; Antcheva, N.; Benko-Iseppon, A.M.; Ederson, A.K.; Brandao, L.; Calsa, T.J.; Crovella, S. (2009). A plant-defensin from sugarcane (*saccharum* spp.). *Protein Pept Lett* 16: 430-436.
- 58) Padovan, L.; Crovella, S.; Tossi, A.; Segat, L. (2010). Techniques for plant defensin production. *Curr Protein Pept Sci* : .
- 59) Pelegri, P.B.; Franco, O.L. (2005). Plant gamma-thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 2239-2253.
- 60) Puupponen-Pimiä, R.; Nohynek, L.; Meier, C.; Kähkönen, M.; Heinonen, M.; Hopia, A.; Oksman-Caldentey, K.M. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *J Appl Microbiol* 90: 494-507.
- 61) Rao, Y.K.; Fang, S.; Tzeng, Y. (2008). Antiinflammatory activities of flavonoids and a triterpene caffeate isolated from *Bauhinia variegata*. *Phytother Res* 22: 957-962.
- 62) Ringbom, T.; Segura, L.; Noreen, Y.; Perera, P.; Bohlin, L. (1998). Ursolic acid from *Plantago major*, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis. *J Nat Prod* 61: 1212-1215.
- 63) Ringbom, T.; Huss, U.; Stenholm, A.; Flock, S.; Skattebøl, L.; Perera, P.; Bohlin, L. (2001). Cox-2 inhibitory effects of naturally occurring and modified fatty acids. *J Nat Prod* 64: 745-749.
- 64) Rios, J.L.; Recio, M.C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol* 100: 80-84.

- 65) Rousi, A. (1971). The genus *Hippophae* L. a taxonomic study. *Ann.Bot. Fenn.* 8: 177-227.
- 66) Samuelsen, A.; Paulsen, S.; Wold, J.; Otsuka, H.; Kiryohara, H.; Yamada, H.; Knutsen, S. (1996). Characterization of a biologically active pectin from *Plantago major* L. *Carbohydrate Polymers* 30: 37-44.
- 67) Samuelsen, A.; Paulsen, S.; Wold, J.; Knutsen, S.; Yamada, H. (1998). Characterization of a biologically active arabinogalactan from leaves of *Plantago major* L. *Carbohydrate Polymers* 35: 145-153.
- 68) Samuelsen, A.B. (2000). The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. a review. *J Ethnopharmacol* 71: 1-21.
- 69) Shai, L.J.; McGaw, L.J.; Aderogba, M.A.; Mdee, L.K.; Eloff, J.N. (2008). Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata* (burm.f) c.a. sm. leaves. *J Ethnopharmacol* 119: 238-244.
- 70) Sheng, Y.; Akesson, C.; Holmgren, K.; Bryngelsson, C.; Giamapa, V.; Pero, R.W. (2005). An active ingredient of cat's claw water extracts identification and efficacy of quinic acid. *J Ethnopharmacol* 96: 577-584
- 71) Shibano, M.; Kakutani, K.; Taniguchi, M.; Yasuda, M.; Baba, K. (2008). Antioxidant constituents in the dayflower (*Commelina communis* L.) and their alpha-glucosidase-inhibitory activity. *J Nat Med* 62: 349-353.
- 72) Sordillo, L.M.; Shafer-Weaver, K.; DeRosa, D. (1997). Immunobiology of the mammary gland. *J Dairy Sci* 80: 1851-1865.
- 73) Sordillo, L.M.; Streicher, K.L. (2002). Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7: 135-146.

- 74) Süleyman, H.; Demirezer, L.O.; Büyükokuroglu, M.E.; Akcay, M.F.; Gepdiremen, A.; Banoglu, Z.N.; Göçer, F. (2001). Antiulcerogenic effect of *Hippophae rhamnoides* L. *Phytother Res* 15: 625-627.
- 75) Tada, H.; Shiho, O.; Kuroshima, K.; Koyama, M.; Tsukamoto, K. (1986). An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods* 93: 157-165.
- 76) Tailor, R.H.; Acland, D.P.; Attenborough, S.; Cammue, B.P.; Evans, I.J.; Osborn, R.W.; Ray, J.A.; Rees, S.B.; Broekaert, W.F. (1997). A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *J Biol Chem* 272: 24480-24487.
- 77) Tsai, S.; Yin, M. (2008). Antioxidative and anti-inflammatory protection of oleanolic acid and ursolic acid in pc12 cells. *J Food Sci* 73: H174-8
- 78) Tubaro, A.; Dri, P.; Delbello, G.; Zilli, C.; Della Loggia, R. (1986). The croton oil ear test revisited. *Agents Actions* 17: 347-349.
- 79) Tunalier, Z.; Koşar, M.; Küpeli, E.; Caliş, I.; Başer, K.H.C. (2007). Antioxidant, anti-inflammatory, anti-nociceptive activities and composition of *Lythrum salicaria* L. extracts. *J Ethnopharmacol* 110: 539-547.
- 80) Tyler, V.E. (1999). Phytochemicals: back to the future. *J Nat Prod* 62: 1589-1592.
- 81) Velasco-Lezama, R.; Tapia-Aguilar, R.; Román-Ramos, R.; Vega-Avila, E.; Pérez-Gutiérrez, M.S. (2006). Effect of plantago major on cell proliferation in vitro. *J Ethnopharmacol* 103: 36-42.
- 82) Viegi, L.; Pieroni, A.; Guarrera, P.M.; Vangelisti, R. (2003). A review of plants used in folk veterinary medicine in Italy as basis for a databank. *J Ethnopharmacol* 89: 221-244.
- 83) Viguier, C.; Arora, S.; Gilmartin, N.; Welbeck, K.; O'Kennedy, R. (2009). Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends Biotechnol* 27: 486-493.

- 84) Winter, P.; Colditz, I.G. (2002). Immunological responses of the lactating ovine udder following experimental challenge with *Staphylococcus epidermidis*. *Vet Immunol Immunopathol* 89: 57-65.
- 85) Yan, H.; Hancock, R.E. (2001). Synergistic interactions between mammalian antimicrobial defense peptides. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 1558-1560.
- 86) Yang, B.; Kalimo, K.O.; Mattila, L.M.; Kallio, S.E.; Katajisto, J.K.; Peltola, O.J.; Kallio, H.P. (1999). Effects of dietary supplementation with sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) seed and pulp oils on atopic dermatitis. *J Nutr Biochem* 10: 622-630.
- 87) Yang, B.; Karlsson, R.M.; Oksman, P.H.; Kallio, H.P. (2001). Phytosterols in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries: identification and effects of different origins and harvesting times. *J Agric Food Chem* 49: 5620-5629.
- 88) Yang, B.; Kallio, H. (2002). Composition and physiological effects of Sea buckthorn (*Hippophae*) lipids. *Trends in Food Science & Technology* 13: 160-167.
- 89) Zacchigna, M.; Cateni, F.; Faudale, M.; Sosa, S.; Della Loggia, R. (2009). Rapid hplc analysis for quantitative determination of the two isomeric triterpenic acids, oleanolic acid and ursolic acid in *Plantago major*. *Scientia Pharmaceutica* 77: 79-86.
- 90) Zhao, X.; Lacasse, P. (2008). Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *J Anim Sci* 86: 57-65.
- 91) Ziboh, V. (1996). The significance of polyunsaturated fatty acids in cutaneous biology. *Lipid* 31: s249-s253.