



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI
SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE BIOMOLECOLARI E BIOTECNOLOGICHE

INDIRIZZO IN MICROBIOLOGIA MOLECOLARE E CLINICA

Coordinatore
Prof. Bruno Masala

CICLO XXIV

STUDIO DELL'ATTIVITÀ ANTIMICROBICA DI ESTRATTI DA PIANTE E ALTRI PRODOTTI NATURALI

Tutor:
Prof. SALVATORE RUBINO

Tesi di:
Ilaria Borghetto

Anno Accademico 2010 - 2011

INDICE

ABSTRACT	<i>Pag.</i> 5
INTRODUZIONE	7
SCOPO DELLA TESI	15
MATERIALI E METODI	16
VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTIBATTERICA E ANTIMICOTICA	18
Raccolta e preparazione preliminare delle piante	20
Preparazione dell'estratto acquoso	20
Preparazione degli estratti organici	21
Preparazione degli estratti di origine fungina	21
Preparazione dei purificati derivati da estratti fungini	23
Metodo della diffusione in Agar	24
Determinazione della MIC tramite metodo della diluzione in terreno liquido	26
Determinazione della MIC degli estratti delle piante tramite metodo della diluzione in Agar	26

VALUTAZIONE ATTIVITÀ DELL'EFLUSSO DI POMPA (EFFUX PUMP ACTIVITY EPA) IN BATTERI GRAM NEGATIVI MDR	Pag.	28
Metodo di Cartwheel		28
Conferma dell'Efflusso dell'Attività di Pompa		31
VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTIVIRALE		33
Studi di tossicità degli estratti delle piante <i>in vitro</i>		33
Citotossicità degli estratti delle piante nei confronti di cellule MDCK		34
Titolazione virale tramite saggio di emagglutinazione		36
Studio sull'attività antivirale del Mirto e del Te Verde in cellule MDCK infettate con virus influenzale H ₃ N ₂ isolato in Sardegna.		38
Microscopia elettronica		42
RISULTATI		44
Risultati attività antibatterica e antimicotica		44
Valutazione dell'attività dell'efflusso di pompa (Effux pump activity EPA) in S.Typhi		48
Risultati attività antivirale		51
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI		64
BIBLIOGRAFIA		69

ABSTRACT

Despite the remarkable advancements in medical research during last century, infectious diseases still remain one of the leading causes of death worldwide, and the emergence of multidrug resistance has made formerly easy-treatable infections severe life threats. This situation urges the discovery of new antimicrobial drugs or resistance-modifying agents as efflux pump inhibitors to control such infections.

Plants have long been traditionally used to prevent or cure infectious conditions all over the world, and also in Sardinia region (Italy).

For this reason the potential antimicrobial properties of plant extracts of *Camellia sinensis* and *Myrtus communis* and natural products from *Diplodia cupressi* have been explored on a collection of different pathogens including typhoidal *Salmonella*, *E.coli*, *Streptococcus agalactiae* and *viridans*, *Enterococcus faecalis* and *Candida* spp, and influenza virus . Further we tested these extracts in MDR *Salmonella* Typhi strains to explore the potential inhibitory activity of the efflux pumps whose overexpression rendered antibiotics therapeutically ineffective in MDR strains.

The results obtained showed that the extracts of *C. sinensis* and *D. cupressi* exhibited bactericidal activity against MDR *Salmonella* Typhi and a wide range of pathogens Interestingly in MDR *S. Typhi* the extracts of *D. cupressi* and *C. sinensis* exerted a inhibitory efflux pumps effect inducing a reversal of tetracycline resistance.

Tesi di Ilaria Borghetto

Studio dell'attività antimicrobica di estratti da piante e altri prodotti naturali
Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche, Università degli Studi di Sassari

Furthermore *M. communis* extract showed high anti-viral activity against influenza virus (H₃N₂). This finding could be useful in realizing promising antimicrobials for the treatment of typhoid fever caused by *S. Typhi* and influenza virus.

INTRODUZIONE

«Fai del tuo alimento la tua medicina e della tua medicina il tuo alimento». Le parole di Ippocrate (V secolo A.C.) stanno assumendo oggi un significato più profondo grazie al rinnovato interesse nei confronti dei prodotti di origine naturali, in particolare a quelli di origine vegetale. Le tradizioni popolari sono ricche di notizie concernenti gli effetti curativi di alcune piante e/o frazioni di queste tanto che lo stesso Ippocrate citava il *rimedio* come terzo strumento del medico accanto al *tocco* e alla *parola*. Le piante, infatti, rappresentano una fonte rinnovabile ed inesauribile di molecole bioattive, tra cui si riscontrano composti antimicrobici spesso dotati di diversi meccanismi d'azione ed effetti additivi o sinergici. Tali proprietà possono essere dovute agli innumerevoli metaboliti secondari che svolgono per la pianta varie funzioni ecologiche (repellenza, difesa dagli erbivori, lotta contro altre specie vegetali per il controllo delle risorse, difesa dai parassiti, attrazione degli impollinatori, ecc.) e che hanno mostrato importanti attività farmacologiche. Possiamo, senz'altro, considerare le piante come le principali fornitrici di sostanze medicamentose e considerarle quali contenitori dinamici di sostanze chimiche attive (Firenzuoli, 2008). Nonostante la scoperta di sostanze con attività antimicrobica (batteri, virus e funghi) abbia rivoluzionato il trattamento delle malattie infettive, negli anni si sono sviluppati e diffusi microrganismi farmaco resistenti.

La resistenza agli antibiotici, pur non coinvolgendo in egual misura

tutte le specie batteriche e le classi di agenti antimicrobici, costituisce un problema sanitario che ha assunto ormai rilevanza mondiale e condiziona l'efficacia del trattamento farmacologico.

Sulla base di queste considerazioni questa tesi si è orientata principalmente allo studio delle possibili attività antimicrobiche di due specie vegetali: il Te verde (*Camellia sinensis*) ed il Mirto (*Myrtus communis*).

La pianta del Te verde (*C. sinensis*) appartiene alla famiglia delle Theaceae ed è estesamente coltivata nelle regioni tropicali e subtropicali del mondo. La *C. sinensis* è un arbusto eretto, dalle foglie ovato-acuminate, con il margine dentato, di colore verde-chiaro lucente; i fiori semplici di piccole dimensioni, di colore bianco, portano numerosi stami color giallo-oro; è originaria della parte continentale del Sud e Sudest Asiatico, ma ad oggi è coltivata in tutto il mondo, soprattutto in regioni a clima tropicale e subtropicale. Allo stato naturale può crescere ben oltre i due metri ma, per facilitarne la coltivazione, generalmente si mantiene a dimensioni di cespuglio sempreverde o di piccolo albero. Le radici sono forti e i fiori possono bianchi o gialli. Le foglie sono lunghe dai 4 ai 15 cm, e larghe dai 2 ai 5 cm. Una foglia fresca contiene circa il 4% di caffeina. La bevanda era conosciuta già dal 2752 A.C. quando l'imperatore della Cina Shen-Nung introdusse il suo utilizzo bollendo alcune foglie della pianta del Te nella sua coppa regale. Oggi il Te verde è considerata una bevanda di uso quotidiano in tutto il mondo e particolarmente in Asia. Le proprietà benefiche che si attribuiscono a questa bevanda sono dovute in massima parte alla pre-

Tesi di Ilaria Borghetto

Studio dell'attività antimicrobica di estratti da piante e altri prodotti naturali

Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche, Università degli Studi di Sassari

senza di polifenoli; essi costituiscono circa il 30% del peso secco della foglia ma questa percentuale può variare a seconda dell'età, della porzione di pianta o dal metodo di estrazione utilizzato. La massima concentrazione si ottiene eseguendo l'estrazione ad una temperatura di 95 °C per 10 minuti, mentre la loro degradazione avviene a temperature più elevate e in tempi prolungati. Tra i polifenoli contenuti nel Te verde, le catechine sono le più rappresentate e sono suddivise in differenti classi: epigallocatechinogallati (EGCG), epigallocatechine (EGC), epicatechinogallati (ECG) e le epicaechine (EC); le EGCG sono le più rappresentate (Perva, 2006).

Il Mirto (*M. communis*) appartiene alla famiglia delle Myrtacee ed è un arbusto che raggiunge 1-3 metri di altezza, tipico della macchia mediterranea, molto comune in Sardegna. Le foglie sono coriacee, opposte, glabre con numerose ghiandole aromatiche. I fiori sono bianchi, singoli e molto appariscenti. Il tempo di fioritura va da Maggio a Giugno. Le bacche sono blu-nere quando mature o più raramente bianche e molto aromatiche; i semi sono bianchi, allungati e coperti da uno spesso rivestimento. La fruttificazione va da ottobre a novembre (Camarda e Valsecchi, 1983). Il Mirto è ampiamente diffuso nell'area del Mediterraneo ed in Sardegna vegeta in associazione con altre specie tipiche della macchia mediterranea ed è diffuso soprattutto nelle coste poiché è una specie termofila (Camarda, 1983). Si può trovare anche nelle zone pianeggianti dell'interno dell'isola e in collina fino a 800 m. Questa pianta trova utilizzazioni in medicina e alimentazione dai tempi più antichi. Infatti gli oli essenziali presenti nelle

Tesi di Ilaria Borghetto

Studio dell'attività antimicrobica di estratti da piante e altri prodotti naturali

Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche, Università degli Studi di Sassari

foglie e nelle bacche hanno una notevole importanza quali antiossidanti (Hayder *et al.*, 2004; Yadegarinia *et al.*, 2006; Sacchetti *et al.*, 2007; Gardeli *et al.*, 2008; Amensour *et al.*, 2009, Wanness *et al.*, 2010), e in alcuni casi quali antibatterici (Nadir and Salih, 1985; Bonjar *et al.*, 2004; Deriu *et al.*, 2007, Akin *et al.*, 2009, Zanetti *et al.*, 2010) e antivirali (Zolfaghari *et al.*, 1997). Inoltre hanno proprietà anti-iperglicemiche (Elfellah *et al.*, 1984; Onal *et al.*, 2005).

Le popolazioni naturali sono la principale risorsa per l'approvvigionamento delle foglie e delle bacche che trovano un largo impiego nella cucina tradizionale sarda; il Mirto, infatti, si usa per insaporire piatti di carne e di pesce. In Sardegna il Mirto è usato per anche la produzione del pregiato liquore al Mirto, dalle proprietà stomatitiche e digestive e, la produzione di questo liquore tradizionale raggiunge anche 3 milioni di bottiglie all'anno. Anche il Mirto come il Te verde contiene polifenoli, flavonoidi, flavanoli e antociani in quantità di 423,3 mg totali nel Mirto rosso. Le foglie di Mirto contengono piccole quantità di acidi fenolici (caffeico, elagico, gallico) e derivati della quercetina (quercetina 3-O-galattoside e quercetina 3-O-ramannoside) mentre sono presenti in maggiore quantità i derivati delle catechine (epigallocatechine, epigallocatechine gallate) e derivati della miricetina.

La tesi ha previsto in parallelo inoltre lo studio di estratti di funghi in particolare del genere *Cupressus*. La scelta è ricaduta su *Diplodia cupressi*, un agente patogeno del cipresso comune (*Cupressus sempervirens L.*)

responsabile di attività fitotossica, in quanto in letteratura è stato riportato che alcuni metaboliti secondari prodotti da questo fungo svolgono un'attività antimicrobica nei confronti di *Pseudomonas* spp, *Candida* spp, *Cryptococcus* spp (Roland *et al*, 2007), particolarmente grazie ai suoi metaboliti Sphaeropsidina A, e Sphaeropsidone (Evidente *et al*, 1997).

Le piante sono state saggiate principalmente nei confronti di *Salmonella* MDR ed in particolare contro i principali agenti della febbre enterica (*S. Typhi* e *Paratyphi A*).

La febbre enterica è una sindrome sistemica caratterizzata da febbre, prostrazione e setticemia, causata da *Salmonella enterica* sottospecie *Typhi* e in forma spesso meno grave, è causata da *S. Paratyphi A*.

La febbre tifoide e paratifoide sono annoverate tra le malattie infettive con elevata morbosità e letalità nei Paesi tropicali. Nel 2000 sono stati stimati in tutto il mondo circa 21.7 milioni di casi di febbre tifoide responsabili della morte di circa 217000 persone (Crump, 2010), e oltre 5 milioni di casi di febbre paratifoidea. (Crump, 2010).

Ceppi di *S. Typhi* resistenti ai farmaci considerati di prima scelta nel trattamento terapeutico di questa infezione (cloramfenicolo, ampicillina e cotrimoxazolo) sono stati isolati in diverse parti delle Americhe, Africa, Medio-Oriente e soprattutto nel subcontinente Indiano, in Cina e nel Sud-Est asiatico (Thong, Kariuki). Successivamente, in seguito all'introduzione dei fluoroquinoloni sono seguiti numerosi reports di fallimenti terapeutici

dovuta all'emergenza e alla diffusione di ceppi resistenti.

Le infezioni dovute a ceppi multi-resistenti pongono chiaramente più problemi nella scelta di antibiotici efficaci senza tralasciare gli inconvenienti legati ad un decorso più prolungato, con più frequente comparsa di complicanze, qualora il trattamento non sia stato scelto in base ai risultati delle prove di sensibilità *in vitro*.

Negli anni '80 fu scoperto che le pompe di efflusso sono capaci di estrarre diversi composti inclusi gli antibiotici utilizzati nella clinica rendendo la terapia non efficace. La resistenza agli antibiotici può svilupparsi rapidamente attraverso il cambiamento nell'espressione delle pompe di efflusso, tale fenomeno è stato rilevato anche per gli antibiotici di ultima generazione. Il fenomeno della multiresistenza microbica attraverso le pompe di efflusso è stato riportato per la prima volta da Ball *et al.* e McMurry *et al.* per l'efflusso di tetraciclina in *Escherichia coli*. Questa resistenza è trasferibile tra ceppi ed è codificata dai geni *tet* (tetracycline) presenti su plasmidi o trasposoni. Si possono dividere i trasportatori di efflusso in 5 famiglie in base alla omologia di sequenza amminoacidica: major facilitator MF; resistance-nodulation-division (RND), small MDR (SMR), ATP binding cassette (ABC) and multiple antibiotic and toxin extrusion (MATE).

Le prime tre classi di meccanismi necessitano di energia, tale energia viene utilizzata per una forza motrice protonica di un sistema di *proton drug antiport* che permette di estrarre gli antibiotici, mentre la MATE

family si serve di un meccanismo guidato dallo scambio di protoni o di ioni sodio. Al contrario la ABC family accoppia, con un meccanismo attivo, l'estrusione di *drug* con l'idrolisi dell'ATP.

Non è raro che un organismo codifichi per più di una pompa di efflusso, che può essere espressa costitutivamente o indotta in risposta diretta alla presenza di un substrato. Nei batteri Gram-negativi i meccanismi delle pompe di efflusso sono più complessi per la presenza di una membrana esterna.

Per quanto esposto è importante che vengano formulati nuovi antibiotici, e agenti che possano modificare i meccanismi che portano all'insorgenza della resistenza ai farmaci, in particolare potrebbe essere interessante trovare sostanze in grado di interferire con le pompe di efflusso ricercando inibitori delle pompe di efflusso (EPIs-Efflux pump inhibitors). L'utilizzo di modificatori della resistenza batterica quali EPI potrebbe facilitare la reintroduzione di antibiotici terapeuticamente inefficaci quali ciprofloxacina e addirittura sopprimere l'emergenza di ceppi MDR.

Per quanto concerne lo studio sulle piante ad attività antivirale la scelta è ricaduta sui virus influenzali stagionali. Attualmente l'influenza costituisce un serio problema epidemiologico per ubiquità, contagiosità, variabilità antigenica, esistenza di serbatoi animali (Taubenberger), 2008.

A seconda del gruppo dei pazienti contagiati, l'infezione può determinare gravi complicanze. Sebbene la vaccinazione antinfluenzale annuale rappresenti la migliore strategia per la prevenzione delle complicanze delle

infezioni da virus influenzali, i farmaci antivirali possono essere considerati come ulteriore presidio per il trattamento e la chemiopprofilassi dell'influenza.

Da tempo sono state condotti studi scientifici volti a ricercare possibili attività antivirali in composti derivati dalle piante, questi studi hanno messo in evidenza che alcune sostanze naturali presenti nelle piante posseggono la capacità di contrastare la replicazione batterica sia *in vitro* (May and Willuhn, 1978; Mothana *et al.*, 2006) (che *in vivo* Prahoveanu *et al.*, 1986).

Dal 2007 il laboratorio di Virologia dell'Università di Sassari fa parte della rete di sorveglianza virologica dell'influenza attivato dal Ministero della Salute pertanto l'unità di ricerca ha a disposizione i ceppi virali del virus H₃N₂ in circolazione nella regione Sardegna; è parso, quindi interessante valutare l'attività antivirale degli estratti del Mirto e del Te verde nei confronti del virus influenzale.

SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questa ricerca è quello di trovare alternative all'uso tradizionale dei farmaci per il controllo delle infezioni. Il motivo di tale scelta è stato determinato dal crescente numero di ceppi batterici e virali che non rispondono alle terapie con antibatteriche o antivirali poiché hanno sviluppato resistenza ad uno o più farmaci.

Per valutare le possibili alternative ai farmaci sono stati intrapresi esperimenti volti ad indagare gli effetti antimicrobici di estratti derivati dal Te verde, dal Mirto e dalle colture fungine di *D. cupressi*. La ricerca si è concentrata principalmente su queste due specie vegetali in quanto il loro consumo è aumentato nella popolazione ormai sempre più sensibile comune nella tradizione salutistica che ormai restata volta ad indagare se le sostanze estratte dal Te verde, Mirto e *D. cupressi* manifestassero un'attività antimicrobica anche nei confronti di batteri resistenti ad antibiotici comunemente utilizzati nella pratica clinica. Maggiore attenzione è stata dedicata a sperimentazioni atte ad evidenziare attività antibatterica nei confronti di ceppi di Salmonella Typhi MDR ed individuarne eventuali meccanismi d'azione. Inoltre le piante sono state saggiate anche per valutarne una possibile attività antivirale soprattutto nei confronti del virus influenzale H₃N₂.

MATERIALI E METODI

Le piante, i funghi e le sostanze purificate utilizzate in questa ricerca sono riportate di seguito:

- *Camellia sinensis*. *Te verde, Pakistan, Tapal - Gulbahar*
- *Myrtus communis*, *Sardegna - Castelsardo*
- *Rhodomyrtus tomentosa* - *Vietnam*
- *Ruta graveolens*, *Sardegna - Castelsardo*
- *Helichrysum italicum*, *Sardegna - Castelsardo*
- *Inula viscosa*, *Sardegna - Castelsardo*
- *Pisu balla tonara - Murra tonara - Asolu Pattada - Fasolu Belvì - Asolu nieddu Pattada - Pisu iscanesu Cuglieri (fagioli provenienti da diversi paesi della Sardegna) Dipartimento di Scienze Agronomiche e genetica Vegetale - Facoltà di Agraria - Sassari*
- *Diplodia cupressi*, *Dipartimento di Protezione delle Piante, Sez. di Patologia Vegetale - Facoltà di Agraria - Sassari*
- *Sphaeropsisina A - Sphaeropsisidone - Dipartimento di Protezione delle Piante, Sez. di Patologia Vegetale - Facoltà di Agraria - Sassari*
- *Trichoderma citrinoviridae - Diplodia africana - Dictiochaeta parva, Dipartimento di Protezione delle Piante, Sez. di Patologia Vegetale - Facoltà di Agraria - Sassari*



Camellia sinensis



Myrtus communis



Diplodia cupressi

Tesi di Ilaria Borghetto
Studio dell'attività antimicrobica di estratti da piante e altri prodotti naturali
Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche, Università degli Studi di Sassari

VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTIBATTERICA E ANTIMICOTICA

Per quanto concerne i batteri utilizzati in questa ricerca, i ceppi appartengono alla collezione del Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Microbiologia Sperimentale. I ceppi sono stati isolati in diversi Paesi, quali Pakistan India, Giordania. Per quanto concerne i ceppi clinici questi provengono dal Laboratorio di Diagnostica del Dipartimento di scienze biomediche. Il ceppo virale utilizzato ci è stato fornito dal laboratorio di Virologia del Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Microbiologia Sperimentale. Nella tab. 1 è riportato l'elenco dei microrganismi utilizzati:

Microrganismi utilizzati Numero microrganismi utilizzati

Salmonella Typhi	28
MDR S. Typhi	44
S. Paratyphi A	37
S. Enteritidis	28
<i>Escheria coli</i>	28

<i>S.agalactiae</i>	6
<i>S.viridans</i>	6
<i>E. faecalis</i>	6
<i>Lactobacillus spp</i>	12
<i>Klebsiella spp 6</i>	6

<i>C .Krusei</i>	6
<i>C. albicans</i>	6
<i>C. parapsilopsis</i>	6

Virus influenzale H ₃ N ₂	1
---	---

Tab. 1 - Descrizione e numero dei microrganismi utilizzati in questo studio.

Raccolta e preparazione preliminare delle piante

Le piante utilizzate sono state raccolte sempre nello stesso areale e nella stessa stagione.

Sono state essiccate ponendole al buio in un ambiente arieggiato onde prevenire la formazione di muffe. Ad avvenuto essiccamento sono state prelevate le foglie che, dopo sminuzzamento, sono state riposte in contenitori sterili, chiusi e conservati al buio.

Preparazione dell'estratto acquoso

Dalle foglie essiccate e sminuzzate è stata preparata una soluzione al 5% (peso/volume) utilizzando acqua distillata; l'estrazione è avvenuta le seguenti modalità:

Riscaldamento per 3 minuti a 95°C a “bagno maria” e successivo raffreddamento per 2 minuti. Questa procedura è stata ripetuta 3 volte.

L'estratto finale è stato fatto raffreddare a temperatura ambiente e poi filtrato attraverso una membrana da 0,2µm.

Gli estratti sono stati conservati a 4°C per non più di una settimana.

Preparazione degli estratti organici

Dallo stesso materiale di partenza utilizzato per la preparazione dello estratto acquoso è stata preparata una soluzione metanolica (metanolo al 95%) contenente il 30% di materiale essicato. La preparazione è stata posta in contenitori sterili di vetro scuro in un agitatore orbitale per 72 ore, a temperatura ambiente.

Dopo tale periodo di tempo si è proceduto a filtrare il composto. Dopo la filtrazione è seguita una fase di evaporazione eseguita in speed vacuum a 40 °C. Gli estratti organici grezzi così ottenuti sono stati pesati e conservati temperatura ambiente fino al loro utilizzo.

Per effettuare le differenti analisi, le soluzioni stock sono state preparate dissolvendole in dimetilsolfossido (DMSO, Merck).

Le successive diluizioni da utilizzare per gli esperimenti in colture cellulari sono state opportunamente preparate in terreno di coltura tissutale.

Preparazione degli estratti di origine fungina

L'isolato di *D. cupressi* è stato allevato in condizioni statiche su un substrato nutritivo liquido semisintetico costituito da terreno Czapek addizionato di farina di mais (2%).

In sintesi 400 ml di substrato nutritivo sono stati versati in beute (2 L)

ed inoculati con 3 mL di una sospensione miceliare del fungo. Le beute sono state mantenute per 28 giorni in una camera climatica a 25 °C al buio. Terminato il periodo d'incubazione, le colture sono state filtrate su carta Whatman n°1 e il filtrato colturale ottenuto è stato conservato in congelatore a - 20 °C fino al momento della successiva estrazione.

Il filtrato colturale è stato sottoposto, dopo correzione del pH iniziale con HCl 2N, ad estrazione liquido-liquido con acetato di etile in un imbuto separatore. Le fasi organiche combinate sono state anidrificate con solfato di sodio anidro, concentrate a pressione ridotta in rotavapor a 40 °C, evaporate a secchezza e successivamente pesate.

Trichoderma citrinoviride; è stato allevato su tre tipi di substrato solido:

- favino-piselli-orzo-grano (1:1:1:1, w/w/w/w).
- orzo-farro (1:1, w/w).
- Czapek addizionato di estratto di lievito.

Diplodia africana è stato allevato su tre tipi di substrato:

- Czapek addizionato di polenta in condizioni statiche utilizzando bottiglie di Roux
- liquido semisintetico (Czapek addizionato di polenta) in condizioni statiche utilizzando beute.
- liquido semisintetico Czapek addizionato di polenta in condizioni statiche utilizzando beute, i tempi di fermentazione sono stati portati a 10 giorni
- semisintetico (M 1D) in condizioni statiche in bottiglie di Roux.

Tesi di Ilaria Borghetto

Studio dell'attività antimicrobica di estratti da piante e altri prodotti naturali
Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche, Università degli Studi di Sassari

Preparazione dei purificati derivati da estratti fungini

Le purificazioni cromatografiche sono state condotte su colonne impaccate con gel di silice (Kieselgel 60; 0,063-0.200) della Merck (Germany). Le cromatografie analitiche, preparative su strato sottile (TLC, Thin Layer Chromatography) sono state effettuate su lastre di gel di silice (Kieselgel 60 F254) della Merck, aventi uno spessore rispettivamente di 0,25-0,50 mm. Le TLC su fase inversa sono state effettuate su lastre a fase inversa K-C18F254 della Whatman (Maidstone, U.k) aventi 0,20 mm di spessore. I cromatogrammi su strato sottile sono stati evidenziati attraverso esposizione a radiazione UV (253nm), o spruzzando la TLC con H₂SO₄ al 10% in MeOH e successivamente con acido fosfomolibdico al 5 % in EtOH, il tutto seguito da riscaldamento in stufa a 110 °C per 10 minuti.

L'estratto organico è stato analizzato mediante TLC su lastre di gel di silice con i sistemi eluenti CHCl₃: isoProH (95:5, v/v) e CHCl₃: isoProH (9:1, v/v)

L'estratto organico della coltura di *D. cupressi* (9.8 g) è stato frazionato utilizzando una colonna cromatografica di gel di silice usando il sistema eluente CHCl₃: isoProH (95:5, v/v), seguito da eluizione finale con metanolo . Le frazioni raccolte sono state analizzate mediante TLC su lastre di gel di silice utilizzando lo stesso sistema eluente e raggruppate in 9 gruppi di frazioni omogenee.

Il residuo della frazione 3 è stato purificato su TLC preparativa utiliz-

zando il sistema eluente B, dando 4 gruppi di frazioni omogenee. Il residuo della terza frazione della TLC ottenuto come un solido bianco omogeneo è stato identificato come sferopsidina A (R_f 0.65, eluente CHCl_3 : isoProH (95:5, v/v)).

Il residuo della frazione 5 è stato purificato su TLC preparativa utilizzando il sistema eluente CHCl_3 : isoProH (95:5, v/v). dando 4 gruppi di frazioni omogenee. Il residuo della seconda frazione della TLC ottenuto come un solido bianco omogeneo è stato identificato come sferopsidone (R_f 0.47, eluente CHCl_3 : isoProH (9:1, v/v) su colonna cromatografica.

Metodo della diffusione in Agar

Gli estratti sono stati saggiati per l'attività antibatterica e antimicotica.

Tutti gli estratti metanolici sono stati prima fatti evaporare in speed vacuum e poi risospesi in Dimetilsolfossido (DMSO) per ottenere la soluzione stock.

Le colture batteriche sono state preparate 24 h prima inoculando i microrganismi in adatto terreno di coltura (Luria Broth A; MHA; Agar sangue). Le colture pure sono state poi rilanciate in Terreno liquido LB per 3 h a 37° C in aerobiosi, in agitazione fino ad ottenere la coltura batterica in fase logaritmica di crescita.

L'indice di crescita è stato valutato in termini di torbidità allo scopo di

ottenere un indice di 0,5 “Mc Farland” nell’apposito buffer salino valore che corrisponde a 5×10^5 CFU/ml di coltura batterica.

Con l’ausilio di un tampone sterile la sospensione batterica è stata piastrata con la tecnica dello “spread plate” in terreno solido. Sono stati creati dei pozzetti all’interno dell’agar tramite un’ansa con diametro di circa 6 mm. All’interno di questi pozzetti è stato deposto l’estratto in quantità di 10 microlitri per ciascuna diluizione. In alternativa sono stati utilizzati dei dischetti di carta bibula imbibiti di estratto posizionati sulla piastra Petri (Disc diffusion method).

Le piastre così preparate sono state incubate per 18-24 h a 37° C aerobicamente.

La dimensione degli aloni d’inibizione (non crescita del batterio) è stata misurata in millimetri e sono stati considerati sensibili all’azione dell’estratto diametri di inibizione con valori maggiori uguali a 15 millimetri.

In parallelo per ogni esperimento è stata allestita una piastra di controllo a cui non è stata aggiunto l’estratto.

Le concentrazioni di estratto testato sono comprese tra 5 e 0,312 mg/ml.

Determinazione della MIC (Minimum inhibitory concentration) tramite metodo della diluzione in terreno liquido

Per ogni estratto e/o purificato sono state preparate delle diluizioni seriali (1:2) in terreno Muller-Hinton (MH) Broth.

Le concentrazioni degli estratti acquosi erano comprese in un range di 5000 µg/ml fino a 50 µg/ml.

Le concentrazioni degli estratti organici sono state testate con un range compreso tra 2500 e 25 microgrammi/ml.

Determinazione della MIC degli estratti delle piante tramite metodo della diluzione in Agar

In questi esperimenti è stato utilizzato il terreno di coltura MHA a cui sono stati aggiunti gli estratti con un rapporto sostanza terreno tale da non superare il valore 1:20. Sono stati testati 20 ceppi per piastra.

Tutta la sperimentazione è stata effettuata in cappa a flusso laminare.

Sono stati inoculati 10 µl di ciascuna coltura batterica sia nelle piastre con terreno addizionato dell'estratto che senza, quest'ultima modalità è stata considerata il controllo dell'esperimento.

Le piastre sono state lasciate ad asciugare sotto cappa per almeno 30

minuti al fine di favorire l'adsorbimento della coltura batterica nel terreno, e poi incubate a 37° C per 18-24 ore.

La più bassa concentrazione di estratto o frazione di esso che inibisce la crescita batterica è stata considerata la MIC dell'estratto saggiato per quel determinato ceppo.

VALUTAZIONE ATTIVITÀ DELL'EFFLUSSO DI POMPA (EFFUX PUMP ACTIVITY EPA) IN BATTERI GRAM NEGATIVI MDR.

Metodo di Cartwheel

Allo scopo di valutare l'attività dell'efflusso di pompa è stato utilizzato il metodo EB-Agar descritto da Cartwheel; tale metodica identifica una presunta over-espressione del sistema di efflusso responsabile del fenotipo MDR nei batteri. Il metodo utilizza bromuro d'etidio a differenti concentrazioni, aggiunto al terreno di coltura agarizzato quale substrato, permettendo così l'identificazione di una eventuale over-espressione del sistema di efflusso.

La valutazione sperimentale stima l'intensità della fluorescenza prodotta dall'isolato batterico e confronta tale intensità con quella prodotta da un ceppo di riferimento sensibile alle sostanze (normalmente farmaci) utilizzate.

Il ceppo batterico di riferimento emette fluorescenza in presenza della più bassa concentrazione di bromuro d'etidio utilizzata nell'esperimento, mentre i batteri con over espressione dell'efflusso di pompa fluorescono a concentrazioni di bromuro d'etidio maggiori.

Per la prima parte della sperimentazione sono stati selezionati ceppi sensibili e MDR di *S. Typhi* (Tab. 2) e il corrispondente controllo positivo *E. coli* ATCC25922 sensibile a tutti gli antibiotici.

1	S. Typhi	SSM 2279	sensibile
2	S. Typhi	SSM 2284	MDR ACCoST
3	S. Typhi	SSM 2287	sensibile
4	S. Typhi	SSM 2864	MDR ACCoST
5	S. Typhi	SSM 2873	MDR NA,ACCoST
6	S. Typhi	SSM 2877	MDR NA,ACCoST
7	S. Typhi	SSM 3703	MDR NA,ACCoST
8	S. Typhi	SSM 3699	sensibile
9	E. coli	ATCC25922	Ceppo di riferimento

Tab 2. - Elenco degli isolati batterici testati per la determinazione dell'efflusso di pompa secondo il metodo di Carthwell. Per ogni ceppo è riportato il pattern di resistenza; A:ampicillina C:Cloramfenicolo; NA:Acido nalidixico, T:Tetraciclina, S:Streptomycin, ST:Trimethopim+sulfamethoxazolo

La sperimentazione è stata condotta previa preparazione dell'inoculo dei ceppi batterici in terreno LB posto in agitatore orbitale a 37°C per 16-24 ore allo scopo di ottenere una crescita batterica pari a 5×10^5 CFU/ml corrispondente ad una densità ottica di 0.6 OD misurata ad una lunghezza d'onda di 600nm. Successivamente i ceppi batterici sono stati piastrati su piastre Petri con LBA addizionato con concentrazioni di bromuro d'etidio comprese tra 0 e 2,5 mg/ml.

Una volta che l'inoculo si è completamente adsorbito le piastre sono state riposte in incubatore a 37°C per 16-18 h.

La valutazione dell'esperimento è stata effettuata successivamente all'esposizione di ciascuna piastra alla radiazione UV ed acquisendo l'immagine con un idoneo apparecchio fotografico. È stata, quindi, calcolata la capacità di efflusso di pompa di ciascun ceppo MDR adottando la seguente formula:

$$\text{Index} = \frac{\text{MC EB(MDR)} - \text{MC EB(ref)}}{\text{MC EB(ref)}}$$

MC EB = la minima concentrazione di bromuro d'etidio (EB) alla quale si osserva fluorescenza.

La metodica descritta permette di valutare una over espressione del sistema delle pompe di efflusso ma non permette di distinguere se tale over espressione sia dovuta ad una intrinseca downregulation delle porine spesso presente nei batteri Gram negativi MDR.

Allo scopo di appurare se vi sia un'effettivo aumento dell'EPA dovuta alla azione dell'estratto utilizzato è stato allestito un test di conferma.

Questo metodo evidenzia se un inibitore dell'efflusso di pompa riduce o rende reversibile la resistenza di un ceppo MDR ai singoli antibiotici ai quali erano inizialmente resistenti.

Conferma dell'attività dell'efflusso di pompa

Tutti gli isolati batterici MDR di *S. Typhi* che hanno mostrato over espressione di EPA sono stati posti in coltura fino ad ottenere una coltura batterica in fase logaritmica. Nel frattempo sono state allestite piastre da 24 pozzetti contenenti 1 ml di terreno LB all'interno dei quali era stato introdotto un dischetto di ciascun antibiotico (Cloranfenicolo, Acido nalidixico, Tetraciclina, Ampicillina, Streptomicina, Trimethropim+sulfamethoxazolo). Dopo un ora di incubazione a 37°C si è proceduto a dispensare gli inibitori della EPA: phenyllalanyl arginyl-beta-naphthylamide (PABN) che è attivo contro diversi efflussi di pompa della famiglia delle RND (Resistance Nodulation Cell Division), il Carbonyl cyanide-m-chlorophenylhydrazone (CCCP) che dissipa la forza motrice protonica inibendo così l'efflusso. Si è deciso quindi di valutare alcuni estratti delle piante e di funghi per valutare la loro efficacia come inibitori di tale meccanismo di resistenza. Sono stati scelti l'estratto acquoso e metanolico di *Te verde* e l'estratto grezzo della *D. cupressi*. Tutti gli inibitori testati sono stati dispensati a metà della loro MIC.

Sono state poi inoculate le sospensioni batteriche.

Le piastre sono state poste in incubatore per 16-18 h a 37° C.

La valutazione dell'esperimento è stata effettuata attraverso osservazione delle piastre e il risultato è stato registrato come: inversione (corrispondente a non crescita, che implica che quel batterio diventa completamente

sensibile all'antibiotico), riduzione (poca crescita comparata al controllo, indicando che l'efflusso contribuisce parzialmente alla resistenza) e non effetto dell'inibitore rispetto a ciascun antibiotico testato (nessuna differenza di crescita in presenza e in assenza dell'inibitore).

VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTIVIRALE

Studi di tossicità degli estratti delle piante *in vitro*

Ipotizzando un possibile effetto antivirale nei confronti dei virus influenzali, esercitato dagli estratti di *C. sinensis* e di *M. communis*, sono stati impostati esperimenti idonei a comprovare tale ipotesi.

Gli estratti alcolici e acquosi di Te verde e Mirto sono stati saggiati utilizzando un modello *in vitro*.

In breve, cellule (Madin-Darby Canine Kidney) MDCK SIAT-1 permissive al virus influenzale sono state infettate con il virus H₃N₂ e successivamente trattate con gli estratti. La valutazione dell'effetto antivirale è stata portata avanti eseguendo una RT- Real Time PCR qualitativa che ha fornito i valori di decremento della carica virale in tempi differenti. Nelle sperimentazioni di nuovi farmaci che siano di derivazione naturale o di sintesi va sempre valutata la possibile tossicità del composto testato nel sistema cellulare prescelto. L'obiettivo finale è quello di stabilire una relazione dose-reazione che non comporti un danno per l'assuntore di tali prodotti. Di conseguenza, è importante conoscere la quantità di farmaco efficace per l'organismo bersaglio affinché il farmaco possa realmente risultare benefico e non tossico. Sebbene le piante utilizzate nei nostri studi siano ampiamente consumate in Sardegna e non siano mai stati segnalati casi di tossicità dovuti al loro consumo, ne sono stati valutati gli eventuali effetti tos-

Tesi di Ilaria Borghetto

Studio dell'attività antimicrobica di estratti da piante e altri prodotti naturali

Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche, Università degli Studi di Sassari

sici valutando la vitalità cellulare quando a queste vengono aggiunte le sostanze esaminate.

Per quanto esposto sopra, prima di valutare gli effetti antivirali sono stati valutati gli eventuali effetti tossici degli estratti del the verde e del Mirto sulle cellule prescelte allestendo un saggio di citotossicità.

Citotossicità degli estratti delle piante nei confronti di cellule Madin Darby Canine Kidney (MDCK)

Principio del metodo

Il saggio di citotossicità è stato eseguito in colture in vitro delle linee cellulari utilizzate negli esperimenti successivi. Il test in vitro condotto su cellule MDCK SIAT1 risulta essere un metodo sperimentale in grado di dare molte informazioni sulle reazioni che possono verificarsi in vivo. Il saggio MTT è semplice, accurato e da risultati riproducibili. Questo metodo è stato sviluppato in origine da Mossman nel 1993. Il componente più importante è il 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromuro o MTT. Questo prodotto ha un colore giallognolo in soluzione. La deidrogenasi mitocondriale di cellule vitali rompe l'anello tetrazolico, portando alla formazione di cristalli color porpora insolubili in soluzioni acquose. I cristalli sono ridisciolti in isopropanolo acidificato e la soluzione purpurea risultante è misurata spettrofotometricamente. Un aumento o

una diminuzione nel numero delle cellule, in concomitanza con la variazione nella quantità di formazano formato, indica il grado di citotossicità causato dal prodotto utilizzato.

In sintesi la sperimentazione ha previsto le seguenti fasi:

Le cellule delle linee MDCK SIAT1 sono state seminate in piastre da 96 pozzetti a fondo piatto, alle concentrazioni di 20×10^3 cellule per ml di terreno (DMEM addizionato di siero fetale di bovino (FBS) al 10% e antibiotici), ad un volume di 100 μ l per pozzetto. Le piastre sono state poste in un incubatore a 37 °C in ambiente umidificato con il 95% di O₂ e il 5% CO₂.

La somministrazione degli estratti è avvenuta il giorno successivo alla messa in coltura. I farmaci sono stati somministrati nell'intervallo di concentrazioni che va da 2.5 mg/ml a 0,0468 mg/ml eseguendo diluizioni 1:2.

Le piastre sono state poi incubate per tempi differenti, 24h, 48h e 72h nelle stesse condizioni atmosferiche e di temperatura menzionate precedentemente.

Per la rilevazione della vitalità cellulare, una soluzione di MTT (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germania) 5mg/ml in tampone DPBS è stata dispensata (20micro litri) per pozzetto e lasciata incubare 4 ore a 37 °C al buio in incubatore. In seguito il sovrinatante delle piastre è stato completamente aspirato.

Il formazano è stato solubilizzato grazie alla somministrazione di 100 microlitri di una soluzione di Isopropanolo e acido cloridico.

La vitalità cellulare è stata determinata mediante misurazione della den-

sità ottica (O.D.) a 550 nm e a 670nm utilizzando il lettore ELISA Versamax Microplate Reader. I dati sono stati ottenuti con il programma SoftMax-Pro e analizzati mediante il programma Excel. Per ogni condizione di ogni esperimento è stata effettuata una semina in quadruplicato, quindi dai valori di O.D. ottenuti è stato ricavato un valore medio che è stato normalizzato sul non trattato.

Titolazione virale tramite saggio di emagglutinazione

Il saggio fornisce una misura della concentrazione (titolo) del virus influenzale in un dato campione. Il titolo emoagglutinante è definito come il reciproco della più alta diluizione virale capace di agglutinare un uguale volume di emazie umane di gruppo 0 o di cavia, ed è espresso in unità emoagglutinanti (HAU).

I virus influenzali sono stati forniti dalla Professoressa Caterina Serra del Laboratorio di Virologia del Dipartimento di Scienze Biomediche sono stati ottenuti in seguito a propagazione sulla nuova linea cellulare di MDCK-SIAT1, permissiva al virus e che permette di avere una resa virale migliore che in altre linee cellulari.

In una piastra da 96 pozzetti con il fondo a U sono state preparate una serie di diluizioni al raddoppio dei sovranatanti delle colture cellulari infet-

tate, usando come diluente tampone fosfato (PBS) addizionato dell'1% di siero bovino fetale.

In ogni pozzetto di una fila orizzontale, tranne nella prima, sono stati messi 50 microlitri di PBS, quindi sono stati messi 100 microlitri del supernatante nei pozzetti della prima fila. Con una pipetta multicanale sono state fatte delle diluizioni scalari 1:2 trasferendo 50 microlitri del campione da un pozzetto al successivo. In una fila di pozzetti sono stati messi solamente 50 microlitri di diluente e questa è stata utilizzata come controllo negativo, mentre in un'altra fila sono stati messi 50 microlitri delle diluizioni scalari di un campione sicuramente positivo, ed essa è stata utilizzata come controllo positivo.

In tutti i pozzetti, compresi i controlli negativi e positivi, sono stati aggiunti 50 microlitri di emazie umane di gruppo 0 all'1% v/v.

Dopo 30-45 minuti a temperatura ambiente si è osservata la piastra e si è proceduto alla sua lettura. Il campione è stato considerato positivo se presentava almeno un titolo emagglutinante maggiore di quattro.

La fluorescenza specifica, di un colore verde intenso, dovrebbe essere localizzata a livello intracellulare (nucleare/citoplasmatico). Un campione positivo può essere identificato anche dalla presenza di una o poche cellule intatte che presentino fluorescenza intracellulare specifica. Sono stati raccolti campioni clinici prima possibile dopo l'insorgenza dei sintomi, poiché il numero delle cellule infette tende a diminuire nel corso dell'infezione.

Studio sull'attività antivirale del Mirto e del Te Verde in cellule MDCK infettate con virus influenzale H₃ N₂ isolato in Sardegna.

La replicazione virale è stata verificata mediante l'identificazione del RNA virale della proteina di superficie HA dal sovrinatante e dalle cellule infette.

Infezione delle colture cellulari.

L'isolamento virale è stato effettuato utilizzando cellule renali di cane (MDCK SIAT-1), permissive all'infezione. Le cellule sono state mantenute in coltura in terreno DMEM addizionato del 10% FCS e antibiotici (penicillina 100 U/ml; streptomicina 100U/ml) e selezionate con G418 (1 mg/ml). Per la replicazione del ceppo H₃N₂ è stato utilizzato un monostrato di cellule MDCK SIAT-1 confluenti all'80% circa, mantenuto a 37° e al 5% di CO₂.

Il giorno precedente l'infezione le cellule MDCK SIAT-1 sono state seminate in piastre da 48 pozzetti ad una concentrazione di 50 x 10³ cellule/pozzetto utilizzando terreno DMEM addizionato del 10% FCS e antibiotici ma privo di G418.

Dopo 24 ore di incubazione a 37°C e al 5% di CO₂ il monostrato di cellule MDCK SIAT-1, confluenti all'80% circa, è stato lavato 2-3 volte con MEM senza siero (contenente il 3% di bicarbonato di sodio, pH 7.4) e infettato con 50 µl del sovrinatante virale H₃N₂ e tripsina TPCK (0,5 mg/ml).

Tesi di Ilaria Borghetto

Studio dell'attività antimicrobica di estratti da piante e altri prodotti naturali
Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche, Università degli Studi di Sassari

Dopo un'ora di adsorbimento (50 microlitri di sovrinatante virale H₃N₂ nuova variante A/Brisbane/10/);) in termostato a 35°C al 5% di CO₂ agitando la piastra ogni 15 minuti, è stato aggiunto 0,5 ml/pozzetto di DMEM addizionato con diverse concentrazioni di Mirto e Tea Verde e le colture sono state incubate a 35°C al 5% di CO₂.

Sono state preparate piastre da stoppare dopo 6 , 24, 48 e 72 ore. Tutti i giorni, sono state osservate le cellule al microscopio ottico per controllare la comparsa di un eventuale effetto citopatico.

Allo scadere dei tempi programmati il sovrinatante è stato centrifugato per 5 minuti a 1200 rpm per rimuovere il sedimento cellulare e conservato a -80°C per l'analisi della RT-Real Time

Estrazione dell'RNA totale da colture cellulari

L'RNA virale è stato estratto dal campione clinico con il metodo del TRIZOL.

Ad un'aliquota di 500 µl di campione sono stati aggiunti 700 µl di TRI-ZOL e 200 µl di cloroformio.

Dopo incubazione a temperatura ambiente per 5 minuti e centrifugazione a 12000 rpm a 4° C per 15 minuti, la fase acquosa, contenente l'RNA, è stata trasferita in un nuovo eppendorf con 500 µl di isopropanolo e 1 µl di glicogeno, messa a precipitare a -80° C per 15 min;

Dopo una centrifugazione a 12000 rpm sono stati eseguiti 2 lavaggi con etanolo al 75% e l'RNA è stato risospeso in 30 µl di H₂O contenente D-Etil-Piro-Carbonato (DEPC).

Amplificazione degli RNA mediante retrotrascrizione seguita da reazione di polimerizzazione a catena (RT-Real Time PCR)

La presenza dell'RNA virale è stata evidenziata mediante RT-PCR qualitativa.

A partire da 10 µl di RNA di ciascuna condizione sperimentale, è stato preparato un DNA complementare (cDNA) in un volume finale di 50 µl, utilizzando l'Uni12 (5'-AGCAAAGCAGG-3') come "primer" non-senso per la retrotrascrizione dell'RNA virale, utilizzando MRV-RT.

I cDNA così ottenuti sono stati sottoposti a Real time PCR per la quantificazione relativa del virus influenzali H₃N₂ con l'utilizzo di primers che amplificano una porzione del gene A/H3 con metodica di Real time PCR semiquantitativa.

Per evidenziare la corretta amplificazione e retrotrascrizione, un campione positivo è stato esposto all'estrazione dell'RNA e successiva amplificazione. Per ogni campione, il valore del ciclo soglia (Ct) del gene di interesse, ottenuto dalla Real time RT-PCR, è stato normalizzato dalla comparazione con il Ct del gene costitutivo GAPDH.

L'aumento o diminuzione dell'RNA virale è stata calcolata con il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$. La quantificazione relativa dei livelli di base dei trascritti di interesse (H3) è stata normalizzata con il gene invariante GAPDH, assumendo che sia uguale ad 1) una differenza di 1 tra Ct dei campioni signifi-

ca che il campione con il valore di Ct più basso ha una quantità doppia della sequenza bersaglio rispetto agli altri campioni; 2) l'efficienza di amplificazione è paragonabile per il RNA di interesse (controllo virus) /RNA virale dei pozzetti trattati col Mirto e col Te verde) e per il gene invariante (Valasek *et al.*, 2005; Livak *et al.*, 2001).

$$\Delta\Delta Ct = [Ct_{GI\text{campione trattato}} - Ct_{GAPDH\text{campione trattato}}] - [Ct_{GI\text{campione non trattato}} - Ct_{GAPDH\text{campione non trattato}}]$$

A/H3 : 5' AGC AAA GCT TTC AGC AAC TG 3' 591 bp

A/H3 : 3' GCT TCC ATT TGG AGT GAT GC 5'

Il protocollo per l'amplificazione del virus influenzale H₃N₂ comprende 40 cicli di PCR: denaturazione termica dell'acido nucleico a 94°C per 5 minuti; appaiamento dei "primers" a 48 °C per 30 secondi; reazione di polimerizzazione a 72°C per 30 secondi. Per evidenziare la corretta amplificazione e retrotrascrizione, è stato processato analogamente anche un campione positivo. Per ogni campione, il valore del ciclo soglia (Ct) del gene di interesse, ottenuto dalla Real time RT-PCR, è stato normalizzato dalla comparazione con il Ct del gene costitutivo GAPDH. L'aumento o la diminuzione dell'RNA virale è stata calcolata con il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$. La quantificazione relativa dei livelli di base dei trascritti di interesse (H3) è stata normalizzata con il gene invariante GAPDH, assumendo che:

Una differenza di 1 tra Ct dei campioni significa che il campione con il valore di Ct più basso ha una quantità doppia della sequenza bersaglio rispetto agli altri campioni

L'efficienza di amplificazione è paragonabile per l'RNA di interesse (controllo virus)/RNA virale dei pozzetti trattati con gli estratti di Mirto e di Te verde, e per il gene invariante.

Microscopia elettronica

Allo scopo di mettere in evidenza gli effetti protettivi di estratti di *M. communis* e *C. sinensis* in cellule MDCK infettate con i virus influenzali e, trattate con estratti delle piante su menzionate, sono stati preparati vetrini multi camera con cellule in condizioni sperimentali simili a quelle adottate per la rilevazione della replicazione virale e la determinazione della vitalità cellulare.

Tali vetrini sono stati processati per renderli idonei all'osservazione con Microscopia Elettronica a Scansione (SEM).

Le cellule MDCK SIAT1 sono state seminate in vetrini multi camera da 8 pozzetti alle concentrazioni di 50×10^3 cellule per ml di terreno.

Le cellule sono state risospese in terreno DMEM addizionato di siero fetale bovino (FBS) al 10% e antibiotici e, seminate in un volume di 500 μ l per pozzetto. Le piastre sono state poste in un incubatore a 37 °C in ambiente umidificato con il 95% di O₂ e il 5% CO₂.

Il giorno precedente l'infezione le cellule MDCK SIAT-1 sono state seminate in piastre da 48 pozzetti ad una concentrazione di 50×10^3 cel-

lule/pozzetto utilizzando terreno DMEM addizionato del 10 % FCS e antibiotici ma privo di G418.

Dopo 24 ore di incubazione a 37°C e al 5% di CO₂ il monostrato di cellule MDCK SIAT-1, confluenti all'80% circa, è stato lavato 2-3 volte con MEM senza siero (contenente il 3% di bicarbonato di sodio, pH 7.4) e infettato con 50 µl del sovrinatante virale H₃N₂ e tripsina TPCK (0,5 mg/ml).

Dopo un'ora di adsorbimento (50 microlitri di sovrinatante virale H₃N₂ nuova variante A/Brisbane/10/);) in termostato a 35°C al 5% di CO₂ agitando la piastra ogni 15 minuti, è stato aggiunto 0,5 ml/pozzetto di DMEM addizionato con diverse concentrazioni di Mirto e Tea Verde e le colture sono state incubate a 35°C al 5% di CO₂.

Le piastre sono state poi incubate per tempi differenti, 24h, 48h nelle stesse condizioni atmosferiche e di temperatura.

Allo scadere dei tempi previsti dalla sperimentazione le cellule sono state lavate con tampone fosfato (DPBS) e fissate con gluteraldeide all'1% per un'ora;

Lavaggio con DPBS e trattamento del campione con tetrossido di Osmio all'1% per un'ora;

Lavaggio con DPBS e trattamento del campione con Alcool a differenti concentrazioni (25-50-75-100 %) per 15 minuti ognuna.

Successivamente il campione fissato e disidratato è stato consegnato al Centro di Microscopia Elettronica.

RISULTATI

Risultati dell'attività antibatterica e antimicotica

Camellia sinensis

Gli estratti acquosi e metanolici della *C. sinensis* hanno mostrato attività antibatterica nei confronti di batteri enteropatogeni quali *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*. Inoltre tale attività antibatterica è stata riscontrata anche nei confronti di ceppi MDR di *S. Typhi* e *S. paratyphi A* di diversa provenienza geografica asiatica. Non si è riscontrata nessuna azione antibatterica degli estratti acquosi e metanolici del Te verde quando sono stati cimentati con gli isolati di *S. Enteritidis* ed *E. coli*.

La Tabella 3 riporta nel dettaglio i risultati dell'attività dell'estratto acquoso di *C. sinensis*, nei confronti di 28 ceppi sensibili agli antibiotici di *S. Typhi*. Si può notare che l'attività antibatterica corrisponde ad una MIC pari a 2,5 mg/ml, mentre l'estratto metanolico mostra una MIC verso gli stessi ceppi sensibili con un valore più basso che è pari a 1,25 mg/ml.

Nei confronti dei 44 ceppi MDR testati, l'estratto acquoso mostra una MIC pari a 2,5 mg/ml mentre l'estratto metanolico ha una MIC molto inferiore pari a 0,625 mg/ml, a prescindere dalla distribuzione geografica (Tab. 4) degli isolati e dal pattern di resistenza multipla ai diversi antibiotici.

Strain	n	Camellia sinensis mg/ml	
		Aq	MeOH
MDR S. Typhi	44	2,5	0,625
S. Typhi	28	2,5	1,25
S. Paratyphi A	37	5	5

Tab. 3 - Riassunto dell'attività antibatterica degli estratti acquoso emetanolico di *Camellia sinensis* nei confronti dei ceppi di Salmonella e le rispettive MIC

SSM	Country	Strain	R.type	MIC ac mg/ml	MIC MeOH mg/ml
2282	Pakistan	S.typhi	ACCoST	2,5	0,625
2284	Pakistan	S.typhi	ACCoST	2,5	0,625
2864	Pakistan	S.typhi	ACCoST	2,5	0,625
2873	Pakistan	S.typhi	NA,ACCoST	2,5	0,625
2877	Pakistan	S.typhi	NA,ACCoST	2,5	0,625
3703	India	S.typhi	NA,ACCoST	2,5	0,625
3721	India	S.typhi	NA,ACCoST	2,5	0,625
3729	India	S.typhi	NA,CipCoT	2,5	0,625
3730	India	S.typhi	ACCoS	2,5	0,625
3731	India	S.typhi	ACCoS	2,5	0,625
3755	India	S.typhi	NA,CipCoT	2,5	0,625
3758	India	S.typhi	ACCoS	2,5	0,625
3816	India	S.typhi	ACCoS	2,5	0,625
3817	India	S.typhi	NA,ACCoS	2,5	0,625
3830	India	S.typhi	NA,ACCoST	2,5	0,625
3871	India	S.typhi	NA,Cip,CoT	2,5	0,625
3911	Giordania	S.typhi	ACCoST	2,5	0,625
4332	Giordania	S.typhi	ACCoST	2,5	0,625
2279	Pakistan	S.typhi	-	2,5	1,25
2287	Pakistan	S.typhi	-	2,5	1,25
3699	India	S.typhi	-	2,5	1,25

Tab. 4 - Distribuzione geografica di alcuni isolati con rispettivi pattern di resistenza e MIC.

Per quanto riguarda invece l'attività antibatterica esplicita da questi estratti nei confronti dei 37 ceppi di *S. Paratyphi A* (sia sensibili che resistenti agli antibiotici), i due estratti mostrano una MIC esattamente identica e pari a 5 mg/ml.

Diplodia cupressi

L'estratto grezzo ottenuto da *D. cupressi* ha mostrato una spiccata attività antibatterica ed anche un potere antimicotico.

La sua attività antibatterica è stata ritrovata sia nei confronti di batteri Gram negativi che di batteri Gram positivi. Infatti dalla sperimentazione condotta è risultato che i valori delle MIC riscontrate sia nei confronti di *S. Typhi* che *S. Paratyphi A* sono pari a 1 mg/ml, sia negli isolati clinici sensibili agli antibiotici che in quelli MDR.

L'estratto fungino ha inoltre un'attività antibatterica contro i batteri Gram positivi *S. agalactiae*, *S. viridans* ed *E. faecalis* con un valore della MIC pari a 1 mg/ml. L'attività antimicotica è stata rilevata solo nei confronti di *C. krusei* con un valore di MIC di 1 mg/ml.

Valutazione dell'attività antibatterica e antimicotica dei purificati derivati da estratti fungini

Le indagini sperimentali effettuate per valutare se l'attività riscontrata nell'estratto grezzo fosse di tipo sinergico o dovuta ad una singola sostanza presente nel composto hanno previsto l'utilizzo di due purificati quali la

Sphaeropsidina A e lo Sphaeropsidone, di cui è nota l'attività antifungina (Evidente,1996).

I risultati ottenuti indicano che entrambe le sostanze purificate esplicano attività antibatterica anche verso batteri Gram positivi e Gram negativi inseriti nel piano sperimentale.

Nel dettaglio la Sphaeropsidina A e lo Sphaeropsidone mostrano una notevole attività antibatterica ad una MIC di 0,25 mg/ml nei confronti di *S. Typhi* sensibili agli antibiotici, *S. Typhi* MDR, *S. Paratyphi* A sia sensibili che MDR. Tale attività è stata riscontrata anche nei confronti dei batteri Gram positivi *S. agalactiae*, *S. viridans* ed *E. faecalis* con valori di MIC pari a 0,25 mg/ml.

I risultati raggiunti indicano anche che la Sphaeropsidina A e lo Sphaeropsidone sono in grado di esercitare attività anticandida nei confronti di *C. krusei* con una MIC di 0,25 mg/ml.

Valutazione dell' attività dell'efflusso di pompa (Efflux pump activity EPA) in *S. Typhi* MDR

Gli esperimenti condotti per valutare se fosse presente una over espressione del sistema di efflusso di pompa (EPA) in batteri MDR in isolati di *S. Typhi*, sono stati valutati in base all'intensità della fluorescenza prodotta dall'isolato batterico posta a confronto con quella prodotta da un ceppo di riferimento sensibile ai farmaci utilizzati.

I dati sperimentali ottenuti hanno confermato l'ipotesi iniziale, ovvero nei ceppi MDR di *S. Typhi* vi è una over espressione del sistema di efflusso capace di estrarre gli antibiotici.

Questo risultato è stato osservato direttamente esponendo le piastre a radiazione UV e confermato in base all'applicazione della formula matematica di Carthwell sotto riportata.

$$\text{Index} = \frac{\text{MC EB(MDR)} - \text{MC EB(ref)}}{\text{MC EB(ref)}}$$

MC EB = la minima concentrazione di bromuro d'etidio (EB) alla quale si osserva fluorescenza

Nella figura 1 si può notare che in tutte le piastre contenenti diverse concentrazioni di bromuro di etidio il ceppo batterico di riferimento (*E. coli* ATCC25922) ha emesso fluorescenza in presenza della più bassa concentrazione di bromuro d'etidio utilizzata nell'esperimento, 0,05 mg/l. Solo tre ceppi di *S. Typhi* SSM 2873, SSM 2874, SSM 3703 hanno emesso fluorescenza a concentrazioni di bromuro pari a 1,5 mg/l. Questi ceppi hanno quindi un valore di over espressione elevato (index 2) . I risultati ottenuti indicano che gli isolati batterici di *S. Typhi* MDR presentano il meccanismo d'azione capace di estrudere gli antibiotici tramite il meccanismo di efflusso di pompa rendendoli resistenti agli antibiotici.

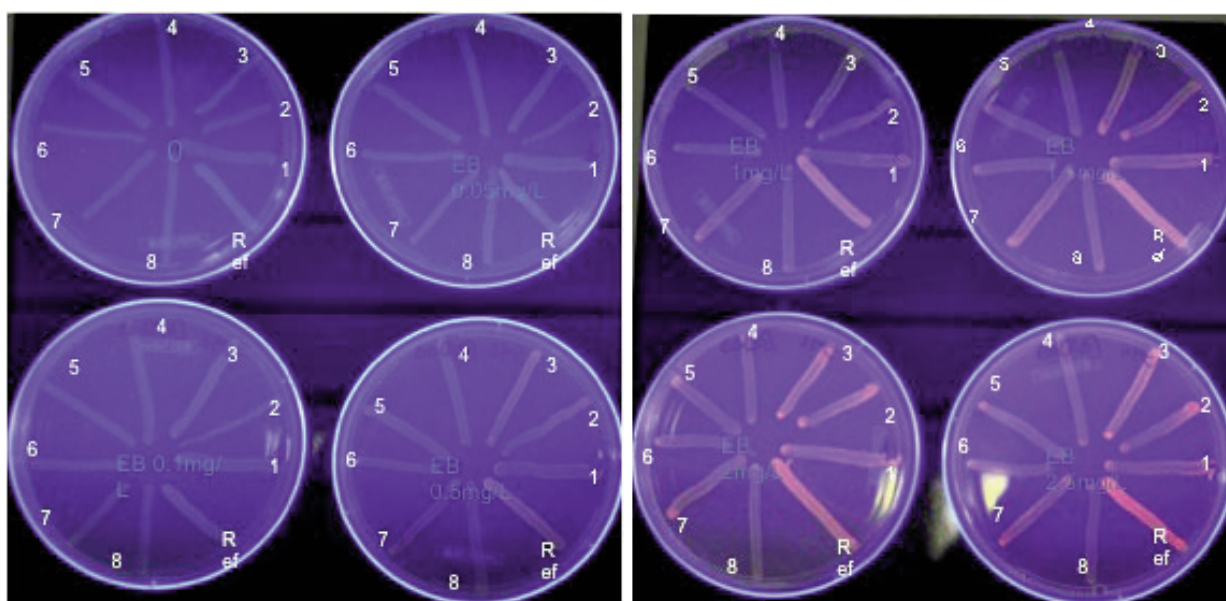


Fig. 1 - Acquisizione fotografica delle piastre, alla radiazione UV, ottenute con l'esperimento secondo il metodo di Carthwell.

I tre ceppi che hanno mostrato una attività maggiore sono stati selezionati per gli studi successivi per valutare se le pompe di efflusso fossero

coinvolte in questi ceppi MDR nella suscettibilità all'azione antimicrobica degli estratti di *C. sinensis* e *D. cupressi*.

Per valutare se tale attività fosse dovuta ad un loro ruolo quali inibitori del sistema EPA si è proceduto ad una sperimentazione dove gli estratti di *C. sinensis* e *D. cupressi* sono stati confrontati con degli inibitori noti per le attività di efflusso di pompa PABN e CCCP.

Questo esperimento si basa sul seguente assunto, se un inibitore dell'efflusso di pompa riduce significativamente la resistenza dell'isolato MDR ad un antibiotico o lo rende sensibile allora è altamente probabile che il fenotipo MDR dell'isolato sia dovuto proprio ad una over espressione del sistema di efflusso.

In tutte le sperimentazioni condotte i tre ceppi di S.Typhi MDR selezionati hanno mostrato una reversione della resistenza alla tetraciclina quando posti a contatto con gli estratti di *C. sinensis* (metanolico) e di *D. cupressi*.

Per gli altri antibiotici testati, il meccanismo di resistenza sembra non sia dovuto all'estrusione degli antibiotici dal sistema di efflusso di pompa.

RISULTATI ATTIVITÀ ANTIVIRALE

Esperimento di Cinetica sugli estratti di Mirto acquoso e metanolico.

I risultati sono espressi come dose-dipendenza dell'azione degli estratti di Mirto metanolico e acquoso sul rilascio virale del virus influenzale H₃N₂.

Nelle figure 2-7 sono riportati i risultati ottenuti in Real Time PCR che mostrano il rilascio di virus da parte di cellule MDCK SIAT-1 esposte a tempi diversi e a varie concentrazioni (0,375/0,198/0,037 mg/ml) di Mirto acquoso e metanolico.

Le cellule MDCK sono state raccolte ad intervalli di 6, 24 e 48 ore, e trattate per l'estrazione degli RNA virali, seguita da retrotrascrizione e amplificazione, mediante Real Time PCR utilizzando primers e sonde specifiche, come descritto in materiali e metodi. I valori sono riportati come incremento relativo, delle condizioni con estratto di Mirto e Te verde rispetto ai controlli non trattati e normalizzati rispetto ai livelli di espressione del gene costitutivo GAPDH.

Effetto protettivo del Mirto acquoso

I dati, riportati nella Figura 2, sono riferiti alle 6 ore postinfezione e mostrano un abbattimento totale della carica virale alla concentrazione di 0.375 mg/ml dose massima utilizzata nell'esperimento; una minima ripresa del rilascio di particelle virali si evidenzia al decrescere delle concentrazioni di estratto acquoso aggiunto alla coltura cellulare.

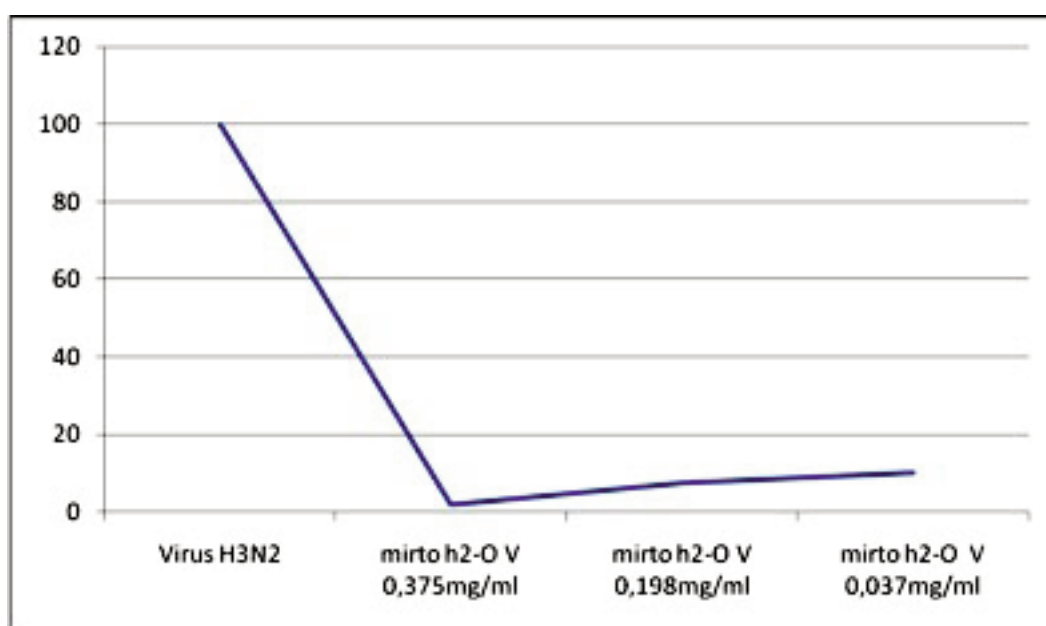


Figura 2 - Replicazione virale in cellule MDCK-SIAT1 infettate con il virus influenzale H₃N₂ e trattate con estratti acquosi di Mirto. Dopo 6 h dall'infezione si può notare una marcata riduzione della carica virale dovuta all'effetto antivirale esercitato dall'estratto di Mirto.

Alle 24 ore (vedi fig 3) l'estratto acquoso possiede ancora un spiccata attività antivirale alla sua massima concentrazione, infatti il controllo del virus ha una carica virale maggiore di circa il 90% rispetto alle cellule infette trattate.

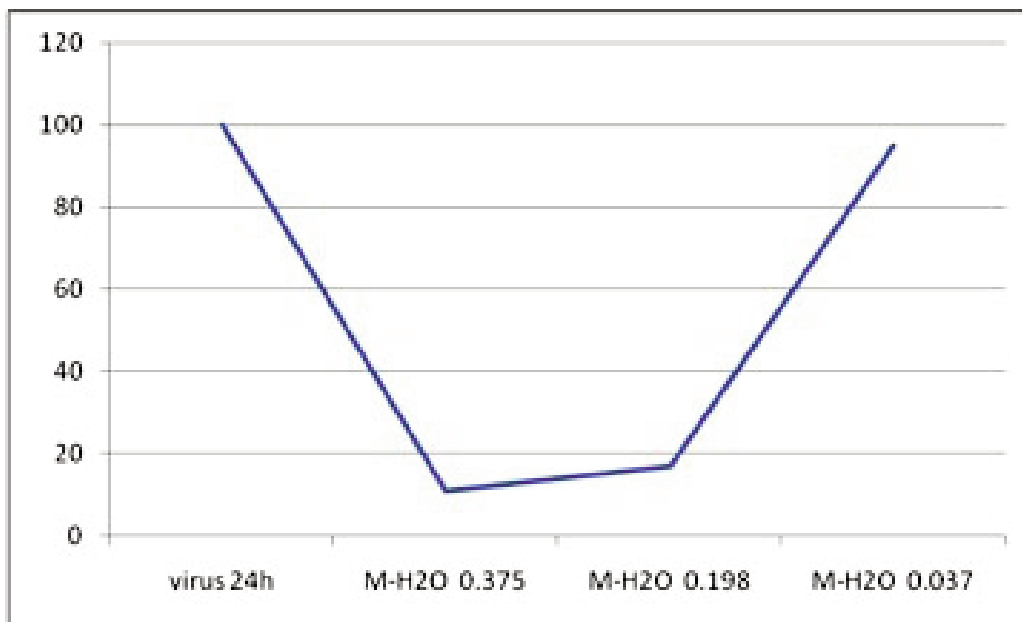


Figura 3 - Replicazione virale in cellule MDCK-SIAT1 infettate con il virus influenzale H₃N₂ e trattate con estratti acquosi di Mirto. Dopo 24 h dall'infezione si può notare una marcata riduzione della carica virale dovuta all'effetto antivirale esercitato dall'estratto di Mirto.

Anche alle 48 ore post infezione (fig. 4) l'estratto di Mirto acquoso, ad una concentrazione 0,375 mg/ml, ha un'ottima capacità di contrasto alla replicazione virale che si manifesta con un'abbattimento di circa l'80 % delle particelle virali rilasciate nel terreno dalle cellule infette e trattate.

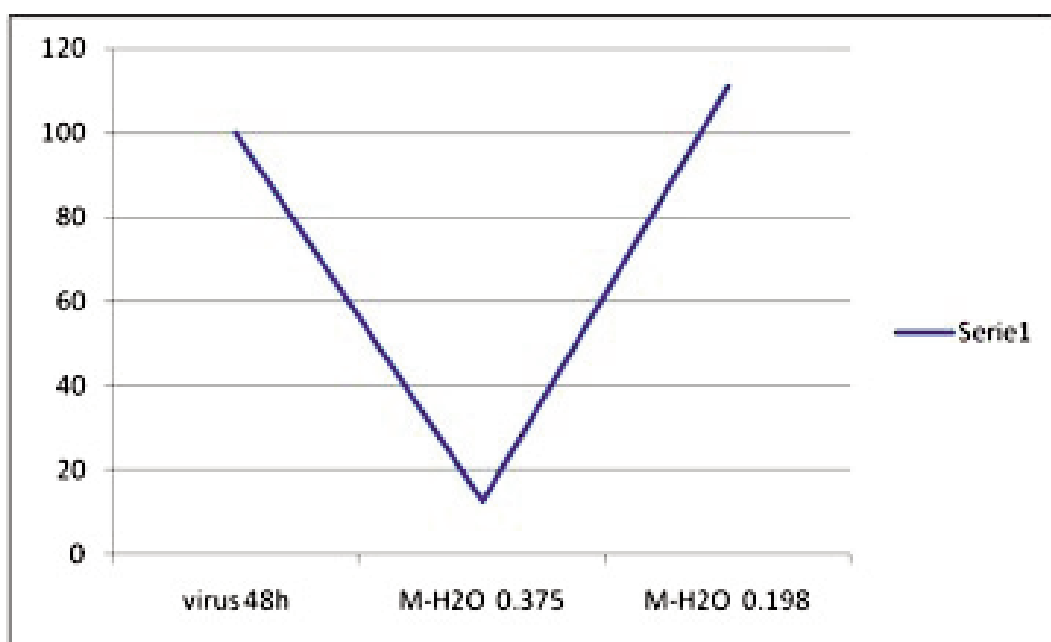


Fig. 4 - Valori della carica virale ottenuti tramite RT-PCR da cellule MDCK SIAT-1 infettate con il virus influenzale H₃N₂ e trattate con estratti acquosi di Mirto, dopo 48 ore dalla infezione.

Attività protettiva del Mirto metanolico nei confronti del virus influenzale

Nella fig. 5 sono riportati i risultati ottenuti con l'estratto metanolico del Mirto alle 6 ore di infezione; si evidenzia una sorprendente attività antivirale a tutte le concentrazioni testate. L'estratto di Mirto preparato in soluzione alcolica blocca completamente la replicazione del virus influenzale.

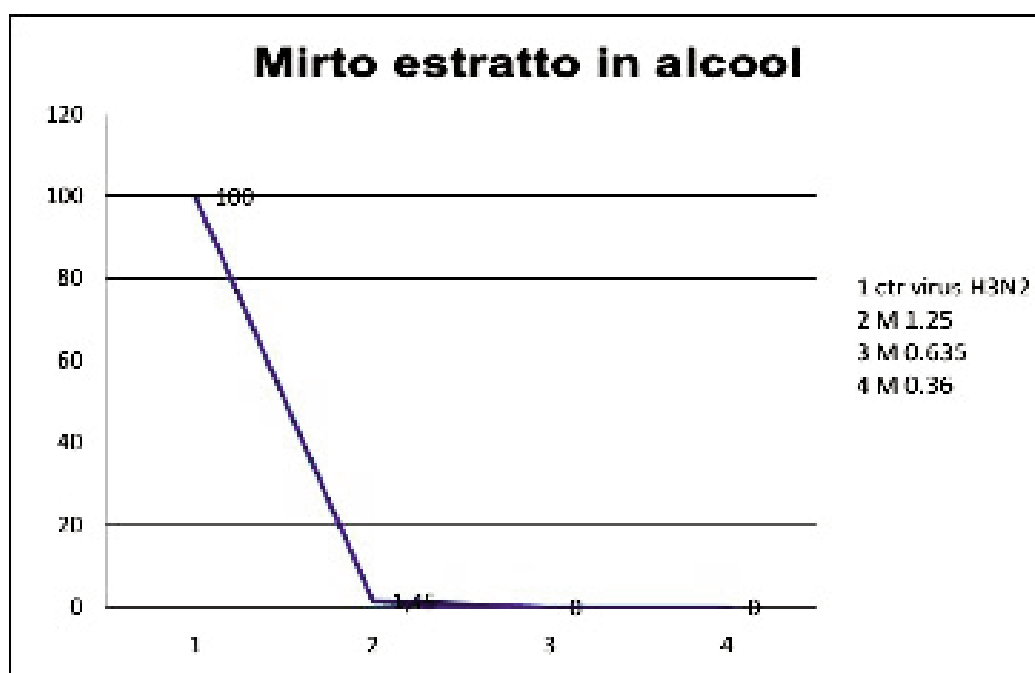


Fig. 5 - Valori della carica virale ottenuti tramite RT-PCR da cellule MDCK SIAT-1 infettate con il virus influenzale H₃N₂ e trattate con estratti alcolici di Mirto, dopo 6 ore dalla infezione si può notare una marcata riduzione della carica virale dovuta all'effetto antivirale esercitato dall'estratto di Mirto.

Tesi di Ilaria Borghetto

Studio dell'attività antimicrobica di estratti da piante e altri prodotti naturali
Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche, Università degli Studi di Sassari

L'estratto metanolico del Mirto sembra mantenere l'efficacia antivirale anche alle 24h (Fig. 6). La percentuale di abbattimento dell'infezione è pari al 100% alla massima concentrazione somministrata e permane totale anche alla concentrazione minima pari a 0,036 mg/ml. Si evidenzia un minimo effetto paradosso alla concentrazione di 0,198 mg/ml.

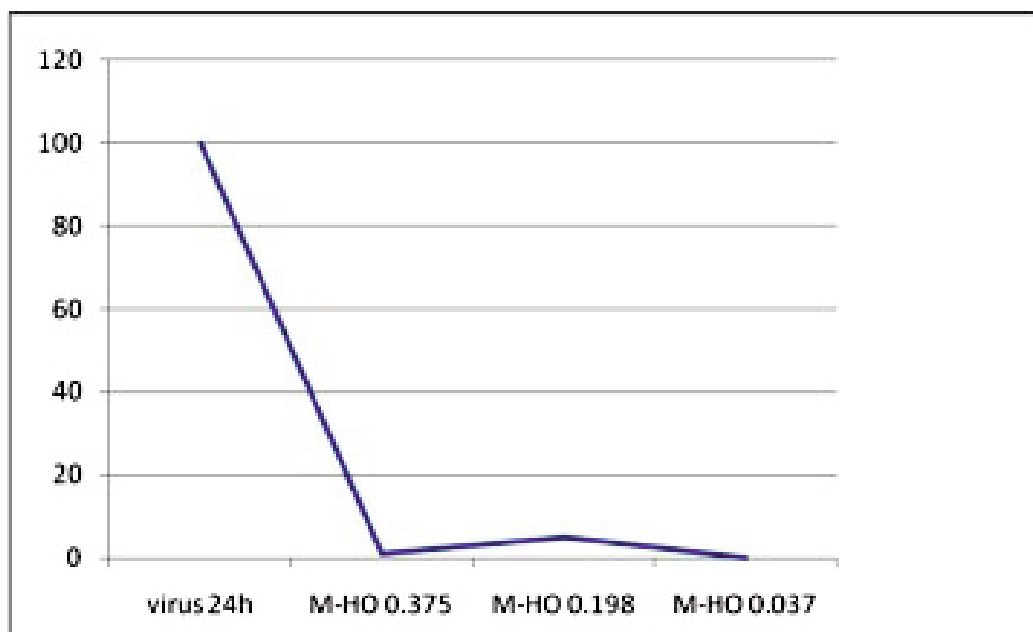


Fig. 6 - Replicazione virale in cellule MDCK-SIAT1 infettate con il virus influenzale H₃N₂ e trattate con estratti metanolici di Mirto. Dopo 24 h dall'infezione si può notare una marcata riduzione della carica virale dovuta all'effetto antivirale esercitato dall'estratto di Mirto.

La fig. 7 mostra l'effetto protettivo esercitato dall'estratto alcolico di Mirto dopo 48 ore dall'infezione. I dati mostrati nel grafico evidenziano la spiccata attività antivirale esplicata dal preparato. La concentrazione di 0,375 mg/ml è infatti in grado di inibire completamente l'infezione virale e anche le concentrazioni più basse sono in grado di controllare l'infezione mantenendo una percentuale di infezione minima pari a circa il 12% e il 18% di particelle rilasciate.

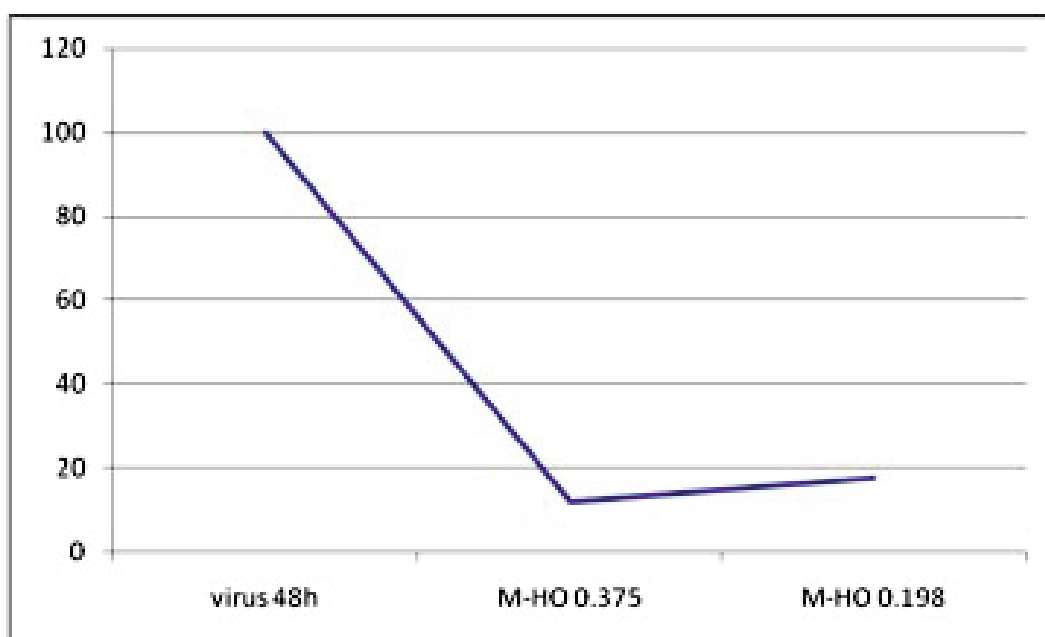


Fig 7 - Valori della carica virale ottenuti tramite RT-PCR da cellule MDCK SIAT-1 infettate con il virus influenzale H₃N² e trattate con estratti metanolici di Mirto, dopo 48 ore dalla infezione. Si osserva una marcata riduzione della carica virale dovuta all'effetto antivirale esercitato dall'estratto a concentrazione di 0,375 mg/ml di Mirto, tale riduzione non viene rilevata alla concentrazione inferiore.

Esperimento di Cinetica sugli estratti di Te verde acquoso e metanolico.

Nella figura 8 vengono riportati i risultati ottenuti somministrando gli estratti acquosi di Te verde 6 ore dopo l'infezione. Come si può osservare i composti presenti nella miscela acquosa hanno un forte potere antivirale che si esplica alla concentrazione di 1,25mg/ml, tale attività non è presente alle concentrazioni inferiori.

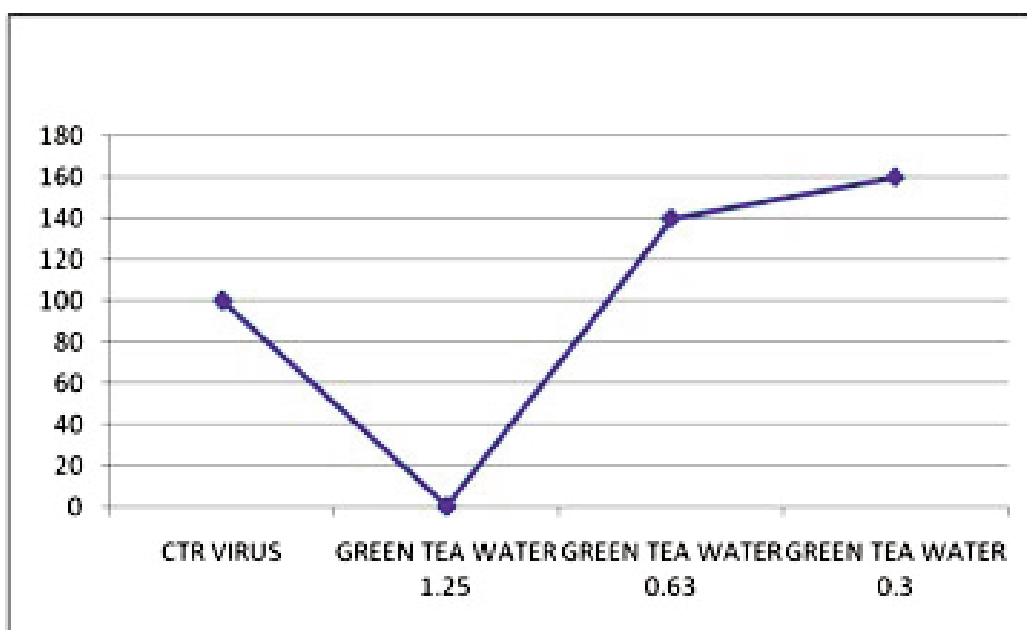


Fig. 8 - Valori della carica virale ottenuti tramite RT-PCR da cellule MDCK SIAT-1 infettate con il virus influenzale H₃N₂ e trattate con estratti acquosi di Te verde, dopo 6 ore dall'infezione.

I dati ottenuti dalla sperimentazione con il Te verde in soluzione alcolica a 6 ore dall'infezione (Fig. 9) mostrano avere effetti antivirali notevoli, infatti alla concentrazione di 1,25 mg/ml. Il Te verde metanolico è in grado di abbattere totalmente la carica virale e tale effetto appare solo leggermente diminuito alla concentrazione di 0,635 mg/ml.

Gli estratti di Te verde non esplicano l'attività ricercata alle 24 ore e alle 48 ore.

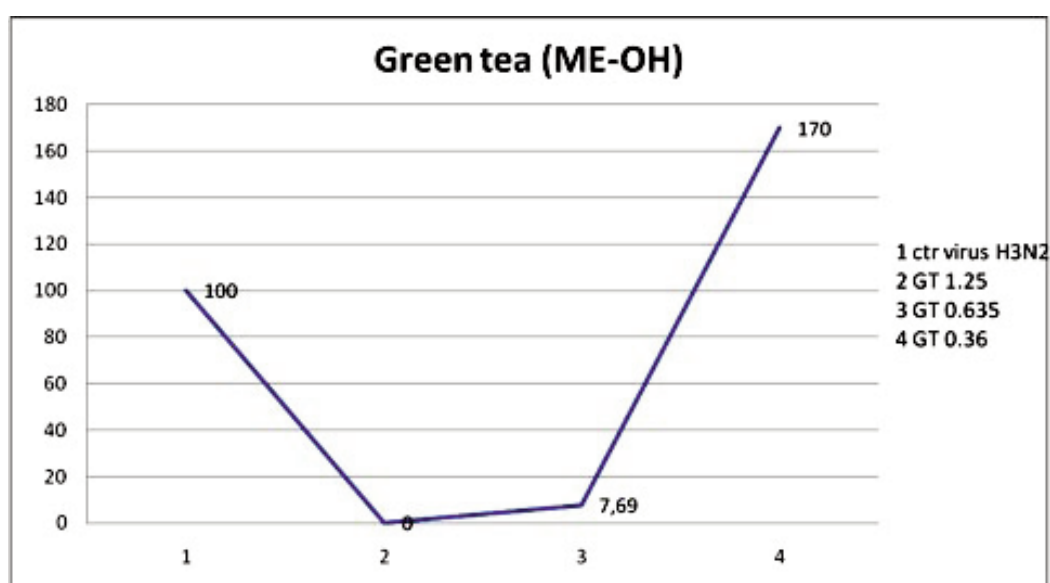


Fig. 9 - Valori della carica virale ottenuti tramite RT-PCR da cellule MDCK SIAT-1 infettate con il virus influenzale H₃N₂ e trattate con estratti estratti metanolici di Te verde, dopo 6 ore dall'infezione.

Microscopia elettronica

Le sperimentazioni condotte per valutare la tossicità degli estratti acquosi e metanolici di Te verde e Mirto indicano che le sostanze utilizzate non hanno effetti citotossici. Ciò risulta evidente dai campioni osservati al Microscopio Elettronico a scansione

In particolare si evidenzia che le strutture cellulari del controllo, cellule non infettate, hanno una morfologia totalmente paragonabile a quelle delle cellule infettate con il virus H₃N₂ e trattate con l'estratto di Mirto sia acquoso che metanolico. Altresì le cellule infettate con il virus influenzale e prive di trattamento con gli estratti di Mirto appaiono aver perso la loro forma originale ed il tappeto cellulare è completamente distrutto (Fig. 10-11-12).

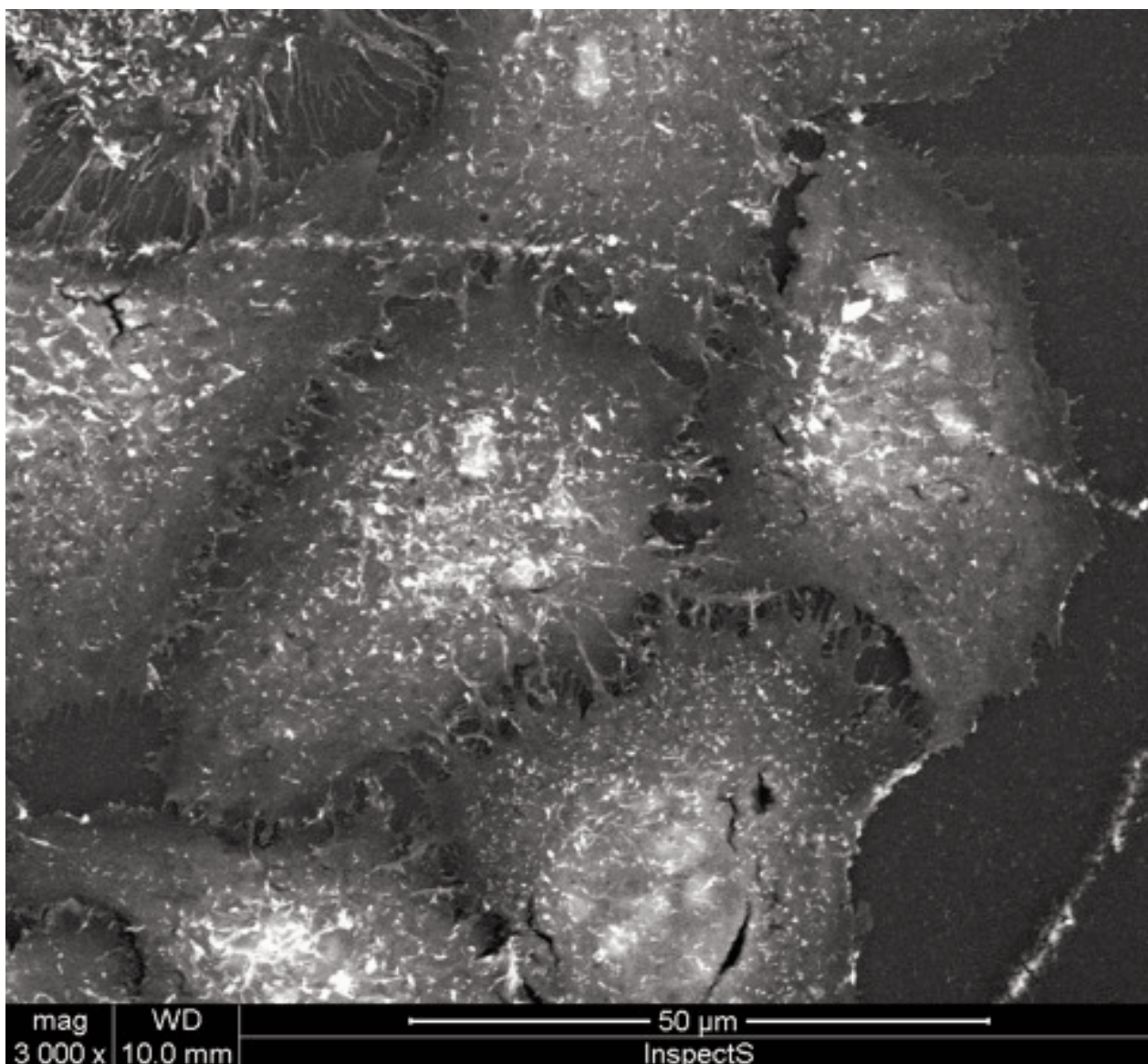


Fig. 10 - Immagine al SEM di cellule MDCK SIAT1 infettate con il virus H₃N₂ e trattate con *Myrtus communis* alla concentrazione di 0,375 microgrammi /ml 48 ore dopo l'infezione. Come si può vedere il tappeto cellulare è omogeneo e non si evidenziano effetti citopatici

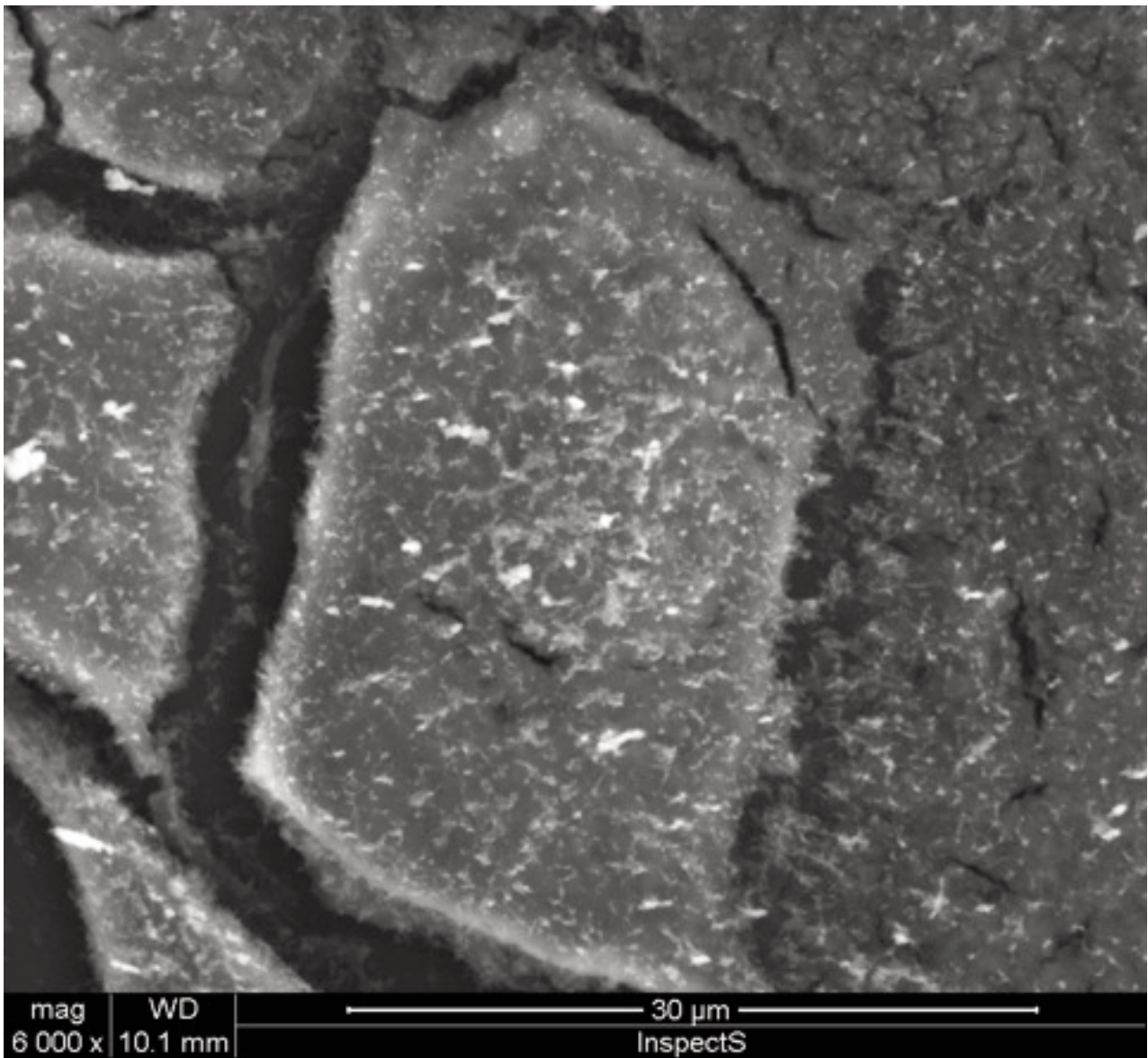


Fig. 11 - Particolare di cellula MDCK SIAT1 di controllo 48 h dopo la semina.

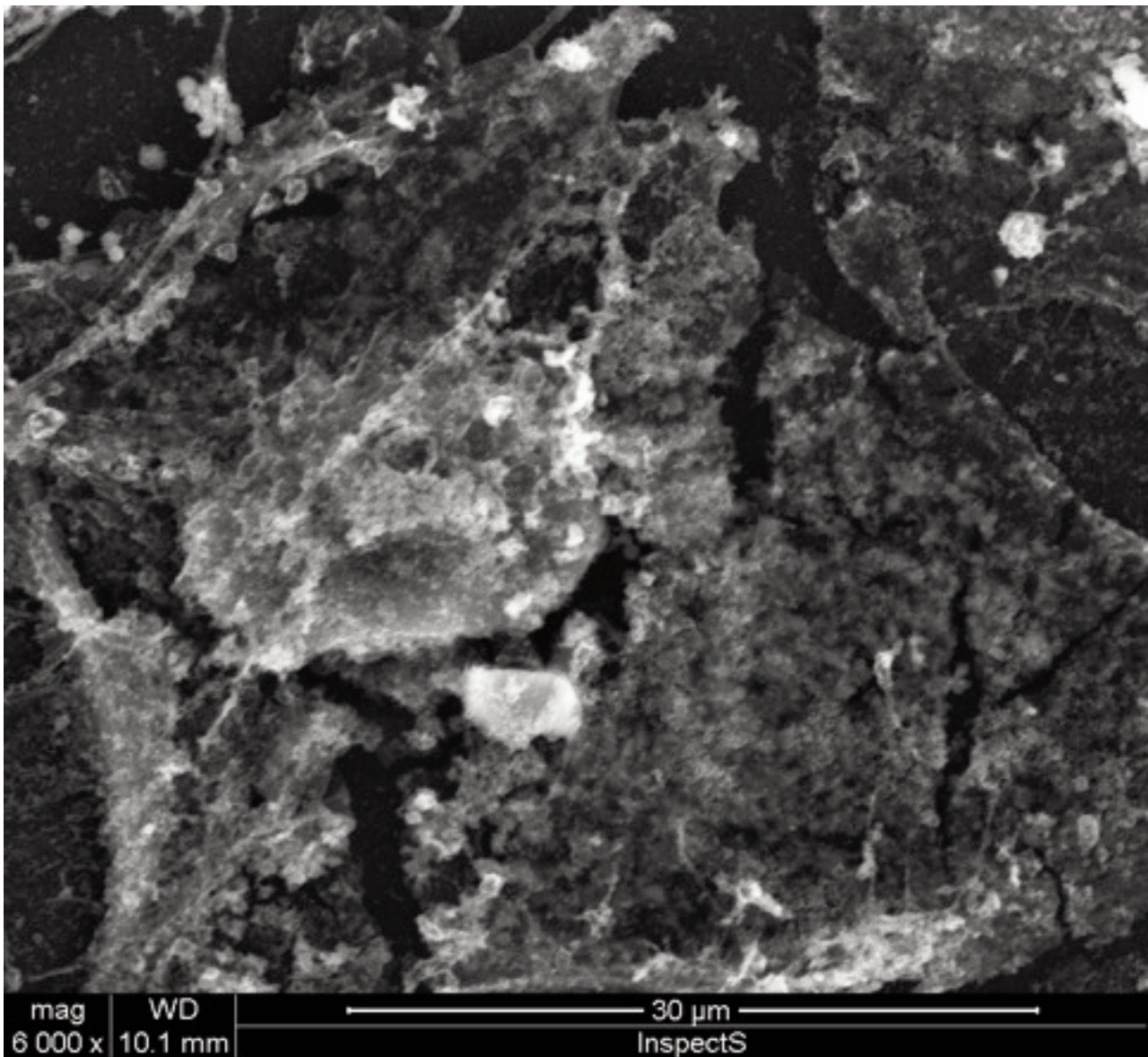


Fig. 12 - La fotografia mostra cellule MDCK SIAT1 infettate con il virus H_3N_2 e 48 ore dopo l'infezione. Come si può vedere il tappeto cellulare è completamente disgregato e si evidenziano gli effetti citopatici dovuti all'infezione virale.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Sebbene nel passato la medicina tradizionale con l'uso di infusi vegetali fosse molto diffusa, in epoca moderna è stata abbastanza trascurata in quanto la ricerca scientifica si è rivolta quasi esclusivamente alla scoperta di nuovi medicinali di sintesi.

Con l'insorgere sempre più di fenomeni di resistenza ai farmaci, spesso anche multipli, da parte dei microrganismi patogeni ai chemioterapici utilizzati nella pratica medica comune, l'attenzione è stata riportata alla ricerca di metodi alternativi basati sull'utilizzo di rimedi naturali. La fitoterapia, ha così assunto un nuovo valore e la sua riscoperta non rappresenta un passo indietro, piuttosto un ritorno alla natura fondato su solide basi scientifiche, come si evince dalle numerose pubblicazioni esistenti sull'argomento (Bone, 2004).

Inoltre anche l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha raccomandato agli stati membri di mettere a punto delle strategie per preservare l'uso della medicina tradizionale.

La tesi oltre che valutare l'effetto protettivo nei confronti di microrganismi patogeni di due piante Te verde e Mirto (*C. sinensis* e *M. communis*) comunemente utilizzate non solo nella tradizione medica popolare, ma come bevande balsamiche di uso quotidiano, ha esteso lo studio su un fungo *D. cupressi* nei confronti di un vasto range di patogeni, che includono batteri Gram positivi, Gram negativi e miceti.

Tesi di Ilaria Borghetto

Studio dell'attività antimicrobica di estratti da piante e altri prodotti naturali

Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche, Università degli Studi di Sassari

Lo studio del potenziale effetto antimicrobico di *C. sinensis* finora è stato limitato in quanto è stato studiato principalmente solo su microrganismi Gram positivi ed in maniera superficiale e frammentaria con risultati contrastanti (Mbata *et al.*, 2006, Hamilton-Miller, 1995). In questo studio l'indagine sull'attività del Te verde è stata estesa nei confronti dei batteri Gram negativi, soprattutto enteropatogeni e multiresistenti ai farmaci antibatterici. Infatti *S. Typhi*, agente eziologico della febbre tifoidea che ancora oggi nel mondo causa la morte di circa 217000 persone (Crump, 2010), soprattutto bambini, è diventata resistente ai comuni farmaci utilizzati in terapia ed è emersa recentemente in India per la prima volta la presenza di ceppi resistenti alla ciprofloxacina che negli ultimi anni veniva utilizzata in sostituzione dell'Acido Nalidixico. (Gand, *et al.*, 2006). Interessante quindi la dimostrazione per la prima volta, che il Te verde non solo agisce sui ceppi sensibili agli antibiotici ma ha una forte azione antibatterica soprattutto nei confronti di ceppi MDR di *S. Typhi*, con una MIC quattro volte inferiore a quella rilevate nei ceppi sensibili agli antibiotici, facendo quindi ipotizzare una sua possibile utilizzazione medica quale adiuvante nella terapia della febbre tifoidea, in quanto attivo anche nei confronti dei ceppi di *S. Paratyphi A*, anche essi responsabile di questa patologia. Un empirico uso del Te verde nella profilassi contro il tifo era stato suggerito da un medico militare ai soldati di stanza nel continente indiano già nel 1923 (Anonymous, 1923). Inoltre la sicurezza del suo utilizzo è dimostrata dal quotidiano uso come bevanda e dal fatto che è appunto la bibita più

Tesi di Ilaria Borghetto

Studio dell'attività antimicrobica di estratti da piante e altri prodotti naturali

Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche, Università degli Studi di Sassari

utilizzata nel mondo, soprattutto in Asia (Stagg GV, 1980) e come dimostrato sperimentalmente nei test di citotossicità nei confronti *in vitro* di cellule eucariotiche.

La maggiore efficacia del Te verde si ha quando l'estratto è di origine alcolica dovuta all'efficienza come solvente del metanolo, che probabilmente permette di estrarre composti con una maggiore attività antimicrobica come è stato dimostrato in altre piante medicamentose indiane (Ahmad et al 1998). Sono quindi necessari ulteriori studi per identificare quali sono i possibili composti attivi.

Gli esperimenti effettuati utilizzando il metodo descritto da Cartwhell hanno permesso di evidenziare uno dei meccanismi che determina la sensibilità dei ceppi di *S. Typhi* MDR all'azione dell'estratto di Te verde in preparazione alcolica. Tale estratto ha una indiscussa attività di inibizione del sistema che presiede all'estrusione degli antibiotici. Infatti le sperimentazioni condotte mostrano che il Te verde metanolico ha una attività sovrapponibile a quella di inibitori utilizzati per bloccare il sistema EPA ovvero è in grado di invertire la resistenza alla tetraciclina in ceppi di *S. Typhi* MDR. Questo meccanismo è stato descritto per la Berberine, una pianta usata dai nativi americani e nella medicina tradizionale cinese come potente anti-batterico e anti fungino (Amin *et al.*, 1969; Nelson ML, 2002) che ha dimostrato tale meccanismo in *S. aureus* resistente alla norfloxacin.

Il lavoro svolto ha evidenziato le spiccate proprietà antibatteriche dell'estratto miceliale del fungo *D. cupressi*, di cui si conosceva l'effetto di due

suoi metaboliti la Sphaeropsidina A e lo Sphaeropsidone nei confronti di miceti di interesse agronomico (Evidente *et al.*, 1996) per la prima volta nei confronti di patogeni per l'uomo ed in particolare di ceppi di *S. Typhi* e *S. Paratyphi A* sensibili e MDR, mentre non ha avuto effetto nei confronti dei gram positivi saggiati. Tale effetto è esplicito anche dai purificati ottenuti da *D. cupressi*, ovvero la Sphaeropsidina A e lo Sphaeropsidone. È stato dimostrato nella tesi che questi metaboliti ottenuti da *D. cupressi* hanno un'azione antibatterica nei confronti non solo della Salmonella, di cui si è dimostrato un effetto in ceppi multiresistenti, ma anche nei confronti di gram positivi non inibiti dall'estratto grezzo ed anche nei confronti della sola *C. krusei*.

La MIC alla quale l'estratto grezzo risulta essere attivo è 4 volte maggiore della MIC misurata per i singoli purificati. Questo dato è estremamente importante poiché per la prima volta si è dimostrata l'efficacia di questi due metaboliti, nei confronti di patogeni per l'uomo. Per poter dare un'indicazione dell'uso di questi metaboliti nella terapia umana saranno necessari ulteriori studi di citotossicità e di valutazione della loro innocuità nell'uomo.

La ricerca si è rivolta inoltre a verificare se il Te verde ed il Mirto avessero un effetto antivirale in particolare nei confronti del virus influenzale H₃N₂ visto che la ricerca in questo settore utilizzando piante medicinali è diffusa in tutto il mondo (Martin, 2003).

Interessanti sono i risultati ottenuti in quanto è stato dimostrato che soprattutto il Mirto possiede una capacità di inibire la replicazione del

virus H₃N₂ abbattendo la carica virale quando cellule MDCK infettate con il virus H₃N₂ vengono trattate con estratti metanolici e acquosi a basse concentrazioni. Il fenomeno registrato è molto probabilmente dovuto alla presenza di polifenoli, flavonoidi come del resto già riportato in letteratura per altri estratti con analoghe proprietà (Perva, *et al.*, 2006).

I risultati parzialmente negativi ottenuti con il Te verde sono probabilmente dovuti alle modalità dell'infezione in quanto è stato visto che il Te verde inibisce la replicazione del Rotavirus ed enterovirus quando il virus viene incubato contemporaneamente agli estratti delle piante e non somministrato una volta che è avvenuto l'assorbimento virale come nel nostro caso con il virus influenzale (Mukoyama, 1991). Non possiamo escludere che l'efficacia minore sia dovuta alla una non completa inibizione della maturazione delle particelle virali del virus influenzale.

In conclusione la tesi ha dimostrato il potenziale uso di piante quali Te verde e Mirto come potenziali agenti alternativi all'uso degli antibiotici tradizionali per combattere le infezioni batteriche soprattutto per i ceppi di *S. Typhi* multi resistenti agli antibiotici. Questo effetto è stato dimostrato anche utilizzando il fungo *D. cupressi*, agente patogeno del cipresso comune e i suoi estratti Sphaeropsidina e Sphaeropsidone anche nei confronti di batteri Gram positivi e negativi e di alcuni miceti patogeni per l'uomo.

Infine è stato dimostrato che il Mirto ha un potente effetto di inibizione della crescita del virus influenzale H₃N₂.

BIBLIOGRAFIA

- ABATE G., ABBATE G., ALTUCCI P., BLASI A., BOMBARDIERI S., CASCIO G., *Medicina Clinica*, volume 2, resistenza batterica ai chemio antibiotici 72: 2304-2309, 1996.
- AHMAD *et al.* *Screening of some indian medicinal plants for their antimicrobial properties.* J. ethnopharmacol. 62:183-193, 1998.
- AKIN M., AKTUMSEK A. AND A. NOSTRO. *Antibacterial activity and composition of the essential oils of Eucalyptus camaldulensis Dehn. and Myrtus communis L. growing in Northern cyprus.* Afr. J. Biotechnol., 9: 531-535, 2010.
- ALMAGBOUL A.Z., BASHIR A.K., FAROUK A., SALIH A.K.M. *Antimicrobial activity of certain Sudanese plants used in folkloric medicine. Screening for antibacterial activity.* Fitoterapia 56, 331-337, 1985.
- ALMAGBOUL A.Z., BASHIR A.K., FAROUK, A., SALIH A.K.M. *Antimicrobial activity of certain Sudanese plants used in folkloric medicine. Screening for antifungal activity.* Fitoterapia 59, 393-396, 1988.
- ALONSO-PAZ E., CERDEIRAS M.P., FERNANDEZ J., FERREIRA F., MOYNA P., SOUBES M., VAZQUEZ A., VEROS S., ZUNNO L. *Screening of Uruguayan medicinal plants for antimicrobial activity.* J. Ethnopharmacology 45, 67-70, 1995.
- AMIN *et al.* *Barberine sulfate: antimicrobial activity, bioassay, and mode of action.* Can J Microbiol 15:1067-1076, 1969.
- ANESINI E., PEREZ C. *Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity.* J. Ethnopharmacol. 39, 119-128, 1993.
- AQIL F. *et al.* *Effect of certain bioactive plant extracts on clinical isolates of beta-lactamase producing methicillin resistant Staphylococc aureus.* J. Basic Microbiol. 45: 106-114, 2005.

Tesi di Ilaria Borghetto

Studio dell'attività antimicrobica di estratti da piante e altri prodotti naturali

Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche, Università degli Studi di Sassari

- ARTIZZU N., BONSIGNORE, L., COTTIGLIA F., LOY G. *Studies of the diuretic and antimicrobial activity of Cynodon dactylon essential oil*. *Fitoterapia* 66, 174-175, 1995.
- AUSUBEL F.M., BRENT R. AND KINGSTON R.E. *Current Protocols in molecular biology*, 2007.
- BAUER A.W., KIRBY, E., SHERRIS, E.M., TURK, M. *Antibiotic by standardized single disk method*. *Am. J. Clin. Path.* 45, 493-496, 1966.
- AJIBOYE RM, SOLBERG OD, LEE BM, RAPHAEL E., DEBROY C., RILEY L.W. *Clin Infect Dis.* Aug 1; 49-3:365-372, 2009.
- BHAN M.K., BAHL R., BHATNAGAR S. *Typhoid and paratyphoid fever*. *Lancet.* 366, 749-762, 2005.
- BRENNER F.W., VILLAR R.G., ANGULO F.J., TAUXE R., SWAMINATHAN B. *Salmonella nomenclature*. *J Clin Microbiol.* 38, 2465-2467, 2000.
- BHATIA I.S., BAJAJ K.L. *Chemical constituents of the seeds and bark of Syzium cumini*. *Planta Med.* 28, 347-352, 1975.
- BISSET N.M. *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*. CRC Press, London, 566, 1994.
- BOLAY A. *Un important dépérissement des Pins causé par le champignon Sphaeropsis sapinea*. *Station fédérale de recherches agronomiques de Changins.* 14, 1991.
- BONJAR S.G.H., S. ZAMANIAN, S. AGHIGHI, P. RASHID FARROKHI, M.J. MAHDAVI AND I. SAADOUN, *Antibacterial activity of Iranian Streptomyces coralus strain 63 against Ralstonia solanacearum*. *J. Biological Sci.*, 6: 127-129, 2006.
- BRUNA E.P., FERNANDES, B., BORGES A.C., ALMEIDA, J., BARROS N.F. *Effects of Eucalyptus litter extracts on microbial growth*. *Pesq. Agrop. Bras.* 24, 1523-1528, 1989.

- CARATTOLI A., *Plasmid-mediated antimicrobial resistance in Salmonella enterica*. Curr Issues Mol Biol. 5, 113-122, 2003.
- CARVALHO V., MELO, V.M., AGUIAR A., MATOS F.S. *Toxicity evaluation of medicinal plant extracts by the brine shrimp (Arthenus salina Leah) bioassay*. Ciência e Cultura 40, 1109-1111, 1988.
- CHANDLER R.F., HOOPER S.N., HARVEY M.J. *Ethnobotany and phytochemistry of yarrow, Achillea millefolium, Compositae*. Econ. Bot. 36, 203-223, 1982.
- CÍZEK A., LITERÁK I., HEJLÍČEK K., TREML F., SMOLA J., ZENTRALBL. *Salmonella contamination of the environment and its incidence in wild birds*. Veterinarmed B. Jul; 41-5: 320-7, 1994.
- COHEN M.L. *Epidemiology of drug resistance: implications for a postantimicrobial era*. Science 257, 1050-1055, 1992.
- COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE, volume I: comunicazione della commissione su una strategia comunitaria contro la resistenza agli agenti; volume II: proposta di raccomandazione del consiglio sull'uso prudente degli agenti antimicrobici nella medicina umana Bruxelles, 20.06, 2001.
- CRAVERO S., MORONE C., *Disseccamento del Pino nero*. L'Informatore Agrario 33, 71-73, 1995.
- DERIU, SECHI L., ZANETTI S. *Attività anti-microbica di oli essenziali estratti da piante aromatiche*, Bollettino di Microbiologia e Indagini di Laboratorio news vol. 10, n. 2, 2004.
- CRUZ F.G., ROQUE N.F., GIESBRECHT A.M. DAVINO S.C. *Antibiotic activity of diterpenes from Mikania triangularis*. Fitoterapia 67, 189-190, 1996.

- ELFELLAH MS., AKHTER MH., and KHAN MT. *Anti-hyperglycaemic effect of an extract of Myrtus communis in streptozotocin-induced diabetes in mice.* J Ethnopharmacol 11: 275-281, 1984
- ELLOF J.N. *Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants?* J. Ethnopharmacol. 60, 1-6, 1998.
- ESCHERICH T. *Die Darmbakterien des Neugeborenen und des Säuglings.* Fortschritte de Medizin. 3: 515-522. 547-554, 1885.
- EVANS C.W. *Trease and Evans' Pharmacognosy.* W.B. Saunders, London, 612, 1996,
- EVIDENTE A., SPARAPANO L., MOTTA A., GIORDANO F., FIERRO O. and FRISULLO S. *Aphytotoxic pimarane diterpene of Sphaeropsis sapinea f. sp. cupressi, the pathogen of a canker disease of cypress.* Phytochemistry 42:1541-1546, 1996.
- www.professionefarmacia.it/pdf
- FIRENZUOLI *et al.*, *Fitoterapia.* Guida all'uso clinico delle piante medicinali, IV Ed., Elsevier, Milano, 2008.
- GAIND R., PAGLIETTI B., MURGIA M., DAWAR R., UZZAU S., CAPPUCINELLI P., DEB M., AGGARWAL P., RUBINO S. *Molecular characterization of ciprofloxacin-resistant Salmonella enterica serovar Typhi and Paratyphi A causing enteric fever in India.* J Antimicrob Chemother. 58-6: 1139-44, 2006.
- GALLENBERG D., CHASE T., *Diplodia shoot blight of Pines.* South Dakota State University/U.S. Dept. of Agriculture. <http://plantsci.sdstate.edu>, 1992.
- GARDELI C., PAPAGEORGIOU V., MALLOUCHOS A., THEODOSIS K., & KOMAITIS M. *Essential oil composition of Pistacia lentiscus L. and Myrtus communis L.*, 2008.

- Gazzetta ufficiale delle comunità europee (98/C 407/02). Parere del Comitato economico e sociale sul tema: «La resistenza agli antibiotici: una minaccia per la salute pubblica» www.pri-asl3to.it, 1998.
- GOIDANICH G., *Manuale di patologia vegetale*. Edizioni Agricole, Bologna, 1978.
- GRAZIANI C., GALETTA P., BUSANI L., DIONISI A.M., FILETICI E., RICCI A., CAPRIOLI A., LUZZI I. *Le infezioni da Salmonella: diagnostica, epidemiologia e sorveglianza*. Rapporti ISTISAN. 05/27, 49, 2005.
- GUPTA M.P. *Plantas Medicinales Iberoamericanas*. CYTED-SECAB, Bogotá, 617, 1995.
- HAIDER MG., HOSSAIN MG., HOSSAIN MS., CHOWDHURY EH., DAS PM and HOSSAIN MM. *Isolation and characterization of Enterobacteria Associated with Health and Disease in Sonali Chickens*. Banganladesh Journal of Veterinary Medicine 2:15-21, 2004.
- HAMILTON-MILLER. *Antimicrobial properties of Tea (Camellia sinensis L.)*. Antimicrobial agents and chemotherapy, p. 2375-2377 vol. 39 n. 11, 1995.
- HARBONE J.B. *Phytochemical Methods*. Chapman & Hall, London, 288, 1983.
- HUANG DB., MOHANTY A., DUPONT HL., OKHUYSEN PC., CHIANG T. *A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative Escherichia coli* J Med Microbiol. 55:1303-11, 2006.
- IKRAM M., INAMUL H. *Screening of medicinal plants for antimicrobial activities*. Fitoterapia 55, 62-64, 1984.
- IZZO A.A., DI CARLO G., BISCARDI D., FUSCO R., MASCOLO N., BORRELI F., CAPASSO F., FASULO M.P., Autore G. *Biological screening of Italian medicinal plants for antibacterial activity*. Phytother. Res. 9, 281-286, 1995.

- JANSEN A.M., CHEFFER J.J.C., SVENDSEN A.B. *Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of test methods.* *Planta Med.* 40, 395-398, 1987.
- KALFON L., *et al.* *Journal of Neurochemistry.* 100: 992-1002, 2007.
- KAPER J.B., NATARO J. P., AND MOBLEY H. L. T. *Pathogenic Escherichia coli.* *Nature Rev.* 2: 123-140, 2004.
- KASPER, BRAUNWALD, FAUCI, HAUSER, LONGO, JAMENSON HARRISON. *Principi di Medicina Interna* 16° edizione 134:1002-1007 Volume II; 102:780 Volume I, 2005.
- KUBO I.; MUROI H.; HIMEJIMA M. *Antimicrobial activity of green tea flavor components and their combination effects.* *J. Agri. Food Chem.* 40, 245-248, 1992.
- KUBO L.; MUROI H.; HIMEJIMA M. *Structure-antibacterial activity relationships of anacardic acids.* *J. Agri. Food Chem.* 41, 1016-1019, 1993.
- KURT D. REED, JENNIFER K. MEECE, JAMES S. HENKEL, AND SANJAY K. SHUKLA. *BIRDS, Migration and Emerging Zoonoses: West Nile Virus, Lyme Disease, Influenza A and Enteropathogens.* *Clinical medicine & research ;* 1:5-12, 2003.
- LA PLACA, *Principi di microbiologia.* Soc. ed. Esculapio, 2010.
- LEATHERBARROW A.J.H., HART C.A., KEMP R., WILLIAMS N.J., RIDLEY A., SHARMA M., DIGGLE P.J., WRIGHT E.J., SUTHERST J., FRENCH N.P. *Genotypic and Antibiotic Susceptibility Characteristics of a Campylobacter coli Population Isolated from Dairy Farmland in the United Kingdom.* *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 822-830, 2004.
- LEMONS T.L.G., MONTE F.J.Q., MATOS F.J.A., ALENCAR J.W., CRAVEIRO A.A., BARBOSA R.C.S.B., LIMA E.D. *Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Brazilian plants.* *Fitoterapia* 63, 266-268, 1992.

Tesi di Ilaria Borghetto

Studio dell'attività antimicrobica di estratti da piante e altri prodotti naturali

Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche, Università degli Studi di Sassari

- WANNES WA., MHAMDI B., SRITI J., JEMIA MB., *et al.* *Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (Myrtus communis var. italica L.) leaf, stem and flower.* Journal Natural product communications, 48, 1362-1370, 2010
- MAY G., WILLUHN, G., *Antiviral effect of aqueous plant extracts in tissue culture.* Drug Res. 28, 1-7, 1978.
- MANNONI M.A. *Caratterizzazione morfofisiologica di Sphaeropsis spp. e loro interazione con le piante ospiti.* Tesi di dottorato di ricerca in patologia vegetale Università degli Studi di Sassari, 107, 2002.
- MARJUT EKLUND. *Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) Findings from Humans in Finland.* Publications of the National Public Health Institute A 23/2005. Department of Bacterial and Inflammatory Diseases National Public Health Institute Helsinki, Finland and Department of Applied Chemistry and Microbiology University
- MARTIN KW., ERNST E. *Antiviral agents from plants and herbs: a systematic review.* African journal of biotechnology, vol. 7: 1571-1573, 2008.
- MARTINS *et al.* *Antibiotic resistance protocols,* Methods in molecular biology, vol 642, 2010,
- MARTINS *et al.* *An instrument free method for the demonstration of efflux pump activity of bacteria.* In vivo 20: 657-664, 2006,
- MARTINEZ M.J., BETANCOURT, J., ALONSO-GONZALEZ, N., JAUREGUI A. *Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity.* J. Ethnopharmacol. 52, 171-174, 1996.
- MARTINEZ, M.J., VASQUEZ S.M., ESPINOSA-PEREZ C., DIAS M., HERRERA-SANCHEZ M. *Antimicrobial properties of argentatine A isolated from Parthenium argentatum.* Fitoterapia 65, 371-372, 1994.

- MATOS F.J.A., AGUIAR L.M.B.A., SILVA M.G.A. *Chemical constituents and anti-microbial activity of Vatairea macrocarpa Ducke*, 1988. *Acta Amazonica* 18, 351-352, 1988.
- MBATA T.I., DEBIAO LU and SAIKIA A. *Antibacterial activity of the crude extract of chinese green tea (Camellia sinensis) on Listeria monocytogenes*. Short communication. *African Journal of biotechnology*, 7: 1571-1573, 2008.
- MCMURRY LM, PETRUCCI RE JR, LEVY SB. *Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77: 3974-7, 1980.
- MCPHEE *et al.* *Current Medical Diagnosis and Treatment*, 2008.
- MIDDLETON, J. H., AMBROSE, A. *Enumeration and antibiotic resistance patterns of fecal indicator organisms isolated from migratory Canada geese (Branta canadensis)*. *J Wildl Dis.* 41: 334-341, 2005.
- MONTELLI A.C., LEVY C.E. Sistema COBA - Aspectos relativos aos dados dos laboratórios de referência. *Rev. Microbiol.* 22, 197-205, 1991.
- MONTORO P. *et al.* *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 41:1614-1619, 2006.
- MUHAMMAD M., MOHAMMAD A., MAHMOOD A, ROGER J., *Antiviral potentials of medicinal plants*, Pomerantz, Brian Wigdahl, Zahida Parveen. *Review.* 131, 111-120, 2008.
- MUKOYAMA *et al.* *Effect of pine seed shell extract on rotavirus and enterovirus*. *Letters in Applied microbiology*, 13, 109-111, 1991.
- MURGIA M., Tesi dottorato. *Caratterizzazione molecolare e studio dell'antibiotico-resistenza in ceppi di salmonella enterica*, 2007.
- MUROI H., KUBO I. *Antibacterial activity of anacardic acids and totarol, alone and in combination with methicillin, against methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Bacteriol.* 80, 387-394, 1996.

- MURRAY *et. al.*, “medical microbiology” 6°e diz. 2008, sezione 5,30 : 301 - 307.
- NASCIMENTO S.C., CHIAPPETA A., LIMA, R.M.O.C. *Antimicrobial and cytotoxic activities in plants from Pernambuco, Brazil*. *Fitoterapia* 61, 353-355, 1990.
- NELSON LM. *Modulation of antibiotic efflux in bacteria*. *Curr. med. chem-anti infective agents*, 1, 35-54 35, 2002.
- NEWALL C.A., ANDERSON L.A., PHILLIPSON J.D. *Herbal Medicines. A guide for health-care professionals*. Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, London, 296, 1996.
- OCHI A., DANESH A., SENEVIRATNE C., BANNER D., DEVRIES ME, ROWE T., XU L., RAN L., CZUB M., BOSINGER SE, CAMERON MJ, CAMERON CM, KELVIN DJ. *Cloning, expression and immunoassay detection of ferret IFN-gamma*. *Dev Comp Immunol*. 32: 890-7, 2008
- PARRY C.M., *Antimicrobial drug resistance in Salmonella enterica*. *Curr Opin Infect Dis*. 16, 467-472, 2003.
- PALMER M.A., MCROBERTS R.E., NICHOLLS T.H., *Sources of inoculum of Sphaeropsis sapinea in forest tree nurseries*. *Phytopathology* 78, 831-835, 1988.
- PATRICIA ESCOBAR-PÁRAMO, OLIVIER CLERMONT, ANNE-BÉATRICE BLANC-POTARD, HUNG BUI, CHANTAL LE BOUGUÉNEC and ERICK DENAMUR. *A Specific Genetic Background Is Required for Acquisition and Expression of Virulence Factors in Escherichia coli*. *MBE, molecular biology and evolution* . Advance Access originally published online on March 10, 2004.
- PENNYCOTT T. W., PARK A., MATHER H. A. *Isolation of different serovars of Salmonella enterica from wild birds in Great Britain between 1995 and 2003*. *Vet Rec*. 158: 817-820, 2006.

- PERVA *et al.* *Extraction of active ingredients from Green tea (Camellia Sinensis): Extraction from natural sources.* Journal of antimicrobial chemotherapy, 59, 1247-1260, 2007.
- PETERSON G.W. *Infection, epidemiology and control of Diplodia blight of Austrian, Ponderosa and Scots Pines.* Phytopathology 67, 511-514, 1977.
- PIOU D., CHANDELIER P., MORLET M. *Sphaeropsis sapinea, un nouveau problème sanitaire des Pins en France?* Rev. For. Fr. XLIII 3, 203-213, 1991.
- POURSHAFIE MR., SAIFI M., MOUSAVI S., SEDAGHT M., NIKBAKHT G., GHOLAMREZA H., RUBINO S. *Clonal diversity of Salmonella enterica serotype Typhi isolated from patients with typhoid fever in Tehran.* Scand J Infect Dis. 40 (1): 18-23, 1980.
- PRAHOVEANU E., ESANU V., ANTON G., FRUNZULICA S. *Prophylactic effect of a Betavulgaris extract on experimental influenza infection in mice.* Virologie 37, 121-123, 1986.
- PUNITHALINGAM E., WATERSTON J.M. *Diplodia pinea.* Descriptions of pathogenic fungi and bacteria n. 273, 1970.
- RAO M.C. *Toxins which activate guanylate cyclase: heat-stable enterotoxins.* Ciba Found. Symp. 112:74-93.), 1985.
- ROLAND *et al.* *Anti-Candida metabolites from endophytic fungi,* Phytochemistry 68 (2007), 886-892, 2007.
- SACCHETTI G., S. MAIETTI, M. MUZZOLI, M. SCAGLIANTI, S. MANFREDINI, M. RADICE and R. BRUNI. *Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in food.* Food Chem., 91: 621-632, 2005.
- SEELY D. *Integrative Cancer Therapies.* 4: 144-155, 2005

- SHAHLA MANSOURI *et al.* *Pharmaceutical Biology*. 39: 399-401, 2001.
- SHAZIA JABEEN, MUHAMMAD TAHIR SHAH, SARDAR KHAN and MUHAMMAD QASIM HAYAT *Determination of major and trace elements in ten important folk therapeutic plants of Haripur basin*, *Pakistan Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 4, 559-566, 2010.
- SHIN S. *et al.* *Journal of Food Science and Nutrition*. 12: 13-140, 2007.
- STAGG GV and MILLIN DJ. *The nutritional and therapeutic value of tea-a review*. *J. Sci. food. agric* 26:1439-1459, 1975.
- STAPLETON PD. *et al.* *Journal of Antimicrobial Agents*. 23: 462-467, 2004.
- STAVRI LAURA, J. V. PIDDOCK and SIMON GIBBONS. *Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59: 1247-1260, 2007.
- SUTTON B.C., DYKO B.J. *Revision of Hendersonula*. *Mycol. Res.* 93, 466-488, 1989.
- SWART W.J., WINGFIELD M.J. *Biology and control of Sphaeropsis sapinea on Pinus species*. *Plant Dis.* 75, 761- 766, 1991.
- SWART W.J., WINGFIELD M.J., GRANT W.S. *Comparison of Sphaeropsis sapinea and Sphaeropsis sapinea f. sp. cupressi*. *Mycol. Res.* 97, 1253-1260, 1993.
- SWART W.J., WINGFIELD M.J., KNOX-DAVIES P.S. *Conidial dispersal of Sphaeropsis sapinea in three climatic regions of South Africa*. *Plant Dis.* 71,1038-1040, 1987.
- UZZAU S., BROWN D.J., WALLIS T., RUBINO S., LEORI G., BERNARD S., CASADESUS J., PLATT D.J., OLSEN J.E. *Host adapted serotypes of Salmonella enterica*. *Epidemiol Infect.* 125, 229-255, 2000.

- VIDAL JE, CANIZÁLEZ-ROMÁN A., GUTIÉRREZ-JIMÉNEZ J., NAVARRO-GARCÍA F.
Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de Escherichia coli enteropatógena. Salud Publica Mex 49: 376-386, 2007.
- VIVEIROS M. *et al.*, *New Method for the identification of efflux mediated MDR bacteria, genetic assessment of regulators and efflux Pump Constituents, Characterization of Efflux Systems and Screening for inhibitors of Efflux Pumps*. Current drug targets, 9: 760-778, 2008.
- STAVRI *et al.*, *Antimicrobial constituents of Scrophularia deserti*. Phytochemistry 67: 1530-1533, 2006.
- TAUBENBERGER JK., MORENS DM., *The Pathology of Influenza Virus Infections Annual Review of Pathology*. Mechanisms of Disease 3: 499-522, 2008

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il mio tutor Prof. Salvatore Rubino per gli importanti insegnamenti e la collaborazione che mi ha dato in questi tre anni di lavoro insieme.

Ringrazio la prof.ssa Lucia Maddau e la prof.ssa Caterina Serra per il contributo a questo lavoro.

Ringrazio la dott.ssa Amber Farooqui per i preziosi insegnamenti scientifici e di vita durante il mio percorso di lavoro.

Ringrazio tutti i colleghi e collaboratori della sezione di Microbiologia Sperimentale e Clinica del Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università degli Studi di Sassari.

Devo fare un ringraziamento particolare alla dott.ssa Patrizia Marongiu, amica e insegnante, che mi ha sostenuto e guidato con la sua presenza costante, indispensabile e insostituibile.

