

# ESTRATTO SECCO DI MAGNOLIA OFFICINALIS: efficacia sull' "uptake" del cloruro GABA-mediato



Foto di H. Toyama

Magnolia officinalis

mentale ma è originaria della Cina occidentale e centrale dove è usata nella medicina tradizionale (Bruni e Nicoletti 2003).

La droga è costituita dalla corteccia dei rami, delle radici e degli steli. Il nome cinese per indicare tale droga è HOUPU che si riferisce appunto alla spessa (HOU) corteccia che è la parte disadorna (PU) della pianta.

La prima descrizione delle proprietà curative della Magnolia officinalis fu fatta nel primo importante testo cinese di farmacoterapia ovvero lo: "Shennong Bencao Jing". Il testo dice: "houpu è amara e calda, non tossica, principalmente usata nel trattamento di: colpi di vento, malattie da freddo, mal di testa, spavento del Qi (panico, ansia), freddo e caldo. Ferma il sangue e l'atrofia muscolare. Rimuove i tre tipi di vermi. Cresce in montagna e nelle valli." (Hong-Yen Hsu et al. 1980).

\* Agnese Nardi

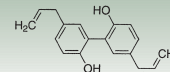
## INTRODUZIONE

La Magnolia officinalis appartiene alla famiglia delle magnoliacee che comprende ottanta specie di piante arboree o arbustive fiorifere, a foglie decidue o sempreverdi. Si presenta come un albero che può raggiungere una altezza di ventidue metri.

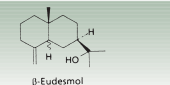
La magnolia off. ha una corteccia molto aromatica, grandi foglie e bei fiori dal colore bianco-crema. Si ritrova in molte parti del mondo come pianta orna-

**Formula dell'honokiolo:**  
5,3'-Diallyl-2,4'-dihydroxybiphenyl

**Formula del magnololo:**  
5,5'-Diallyl-2,2'-biphenoldiol



**Struttura dell'eudesmolo:**



Da questo si può notare l'importante ruolo che ha rivestito la corteccia di Magnolia officinalis nell'antichità e che tuttora riveste in quanto in Cina viene ancora utilizzata come rimedio per il raffreddore, la flatulenza, la dissenteria, le infezioni batteriche ma, soprattutto, come cura per l'ansia e come mio-rilassante (Bruni e Nicoletti 2003).

## PRINCIPI ATTIVI

La corteccia di Magnolia officinalis ha una fragranza inconfondibile dovuta, principalmente, alla presenza di due gruppi di composti che sono: BIFENOLI, fra cui i principali sono magnololo e honokiolo (vedi formule nel riquadro sopra) e TRITERPENI, fra cui il più importante è un olio essenziale chiamato eudesmolo (vedi struttura nel riquadro sopra).

In tutti i campioni di corteccia di Magnolia officinalis, provenienti da diverse aree della Cina, il contenuto di magnololo rientra in un range che va dal 2% al 11% mentre l'honokiolo va dallo 0,3% al 4,6%. L'eudesmolo, invece, non supera l'1% (Tang W. et al. 1992 e Zhu YP 1998).

I due bifenoli, l'eudesmolo e i loro metaboliti sono i principi attivi responsabili dei vari effetti farmacologici attribuiti alla corteccia di Magnolia off. Tali effetti sono:

- azione ansiolitica dovuta principalmente all'honokiolo ed ai suoi metaboliti (Kuribara H, et al., 2000)
- aumento nella produzione di steroidi la quale azione è da attribuirsi al magnololo (Wang SM, et al., 2000)
- attività antifungina (Bang KH, et al., 2000) ed antibatterica (Zhu YP, 1998) dovuta ai due bifenoli
- attenuazione del dolore e di stati infiammatori sempre a carico del magnololo (Wang JP, et al., 1999)
- azione antiossidante dovuta al magnololo (Kong CW, et al., 2000)
- azione dell'eudesmolo quale antidoto contro l'in-

# Biotinta Phito®

18 splendide nuances.



CONFEZIONE DA 180 ML.  
UNA CONFEZIONE DI GUANTI INCLUSA

Qualità  
e Risparmio  
**SOLO**  
**€ 6,50**

**Crema colorante cosmetica  
per capelli agli estratti vegetali  
arricchita con Semi di Lino,  
Burro di Karité e Olio di Jojoba  
(puro al 100%).**

- Copre perfettamente i capelli bianchi.
- Mantiene a lungo la colorazione

**Senza Ammoniaca,  
Nonoxinol, o-Aminophenol**



DER MAYER s.a.s.

info@dermayer.it  
Tel e fax 0175 44599  
www.dermayer.it

COMPONENTI	PARTE DI PIANTA DOVE SI TROVANO I COMPONENTI (quantità espressa se misurata)
$\alpha$ -eudesmolo	Olio essenziale
$\alpha$ -pinene	Totalità della pianta
Anonaina	Totalità della pianta
$\beta$ -eudesmolo	Olio essenziale
$\beta$ -pinene	Totalità della pianta
Bornil-acetato	Olio essenziale
Bornil-magnoliolo	Totalità della pianta
Acido caffeico	Totalità della pianta
Calcio	Corteccia (6,350ppm)
Camfene	Olio essenziale
Cariofillene epossido	Olio essenziale
Rame	Corteccia (8 ppm)
Criptomeridiolo	Olio essenziale
Cianidina	Totalità della pianta
Olio essenziale	Corteccia (3-10ppm)
Eudesmolo	Corteccia (2,820-2,940ppm)
Honokiolo	Totalità della pianta
Ferro	Corteccia(120ppm)
Canferolo	Totalità della pianta
Liriodenina	Totalità della pianta
Magnesio	Corteccia(690ppm)
Magnocurarina	Totalità della pianta
Magnoflorina	Totalità della pianta
Magnololo	Corteccia
Manganese	Corteccia(120ppm)
Michelarbina	Totalità della pianta
Potassio	Corteccia (2,560ppm)
Quercetina	Totalità della pianta
Salicifolina	Totalità della pianta
Sodio	Corteccia (27ppm)
Zinco	Corteccia(9ppm)

TABELLA 1 DEI COSTITUENTI CHIMICI DI MAGNOLIA OFFICINALIS Modificata da: "Zhu YP, Chinese Materia Medica: Chemistry, Pharmacology, and Applications" anno 1998

tossicazione da pesticidi organofosforici dell'eudesmolo (Chiu LC, et al., 1995)

Oltre a questi componenti, da considerarsi i più importanti, la corteccia di Magnolia off. contiene anche una piccola quantità di alcaloidi benzoisochinolinici quali magnoflorina, magnocurarina e salicifolina (e tracce di oxoshinsunina, anonaina, midhelarbina che non sono considerati importanti dal punto di vista terapeutico). Gli alcaloidi si ritrovano nella corteccia di magnolia in una quantità che

non supera l'1% mentre l'alcaloide magnocurarina, che fra tutti è il più potente, va dallo 0,1% allo 0,2% nei maggiori prodotti a base di corteccia di magnolia in commercio (Lou Zhičen and Qin Bo, 1995). Dal punto di vista terapeutico tali alcaloidi possono avere effetto antispasmodico, mentre usati in alte dosi, sotto forma di decotto di corteccia, alleviano gli spasmi bronchiali ed intestinali. In Giappone degli studi condotti sulla magnocurarina hanno dimostrato la sua potenzialità come rilassante muscolare (Matsuki A, 1982).

### INDAGINI SULL'ATTIVITÀ ANSIOLITICA DELLA CORTECCIA DI MAGNOLIA OFFICINALIS

La corteccia di Magnolia off. è utilizzata da secoli in preparati con spiccati effetti ansiolitici, e tale attività è stata oggetto di diversi studi sperimentali riportati in letteratura. In particolare una équipe giapponese ha indagato a fondo l'attività ansiolitica della corteccia di Magnolia off.. Un loro primo studio, condotto nel 1998, ha preso in esame una popolare medicina cinese, Saiboku-to, composta da molte piante fra cui la corteccia di Magnolia off. Questo rimedio viene utilizzato per curare diverse sintomatologie soprattutto ansia e tensione nervosa. Dopo aver indagato e testato a fondo i componenti di Saiboku-to fu trovata la frazione che era responsabile dell'effetto ansiolitico. In seguito alla separazione effettuata con HPLC, si evidenziò che tale frazione era formata da tre componenti: Honokiolo, Magnololo e una terza componente eluita non nota. Individuati nell'Honokiolo e nel Magnololo i responsabili di tale azione, questi vennero messi a confronto utilizzando un caratteristico test in vivo, normalmente condotto su topi, per la valutazione dell'attività ansiolitica di un composto, il plus-maze test. Tale studio ha rilevato che, per quanto riguarda l'azione ansiolitica, l'Honokiolo è molto più efficace del Magnololo, anche aumentando la dose (Muruyama, Y., et al., 1998). Nel secondo articolo, sempre del 1998, è stata presa in esame l'attività ansiolitica del solo Honokiolo, mediante il plus-maze test. L'Honokiolo è stato somministrato sia nella singola dose di 20mg/kg che per

7 giorni consecutivi, con dosi di 0,2mg/kg e 0,5mg/kg. I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'Honokiolo ad alte dosi possiede un'azione sedativa sul sistema nervoso centrale, mentre a basse dosi, ripetute nel tempo, ha un'azione ansiolitica. Nel medesimo studio è stato inoltre paragonato l'effetto della somministrazione di Honokiolo per 7 giorni consecutivi, con quello prodotto da 1mg/kg di diazepam ed i risultati sono stati quasi equivalenti con l'unica differenza che l'Honokiolo non porta cambiamenti nell'attività motoria (Kuribara H. et al.,1998). Sempre in riferimento al diazepam, in uno studio successivo, pubblicato nel 1999, gli autori hanno preso in esame la possibilità che l'Honokiolo avesse affetti collaterali diazepam-simili. A tal proposito, dosi di 1-10 mg/kg di diazepam e di 0.1-2 mg/kg di Honokiolo sono state somministrate per 12 giorni consecutivi su gruppi diversi di topi: dopo somministrazione di flumazenil intra-peritoneale solo i topi trattati con diazepam hanno mostrato i tipici sintomi di withdrawal (astinenza), come l'iperattività e l'ipercinesia. Tali risultati hanno evidenziato quindi

come l'Honokiolo non induca, a differenza del diazepam, dipendenza fisica (Kuribara H., et al., 1999). Nel 2000, sempre la solita équipe in un ulteriore lavoro ha studiato più in profondità l'attività ansiolitica dell'Honokiolo trovando che un metabolita idrogenato dell'Honokiolo: il Diidrohonokiolo-B (DHH-B) è il principale responsabile di tale azione. Tale composto ha mostrato un'attività ansiolitica efficace dopo la sua somministrazione in singola dose orale di 0,04 mg/kg; nella dose di 1 mg/kg l'effetto ansiolitico cominciava dopo un'ora dalla somministrazione e si manteneva per 4 ore, raggiungendo il picco massimo nelle 3 ore. Da tale studio è emerso anche che il DHH-B esplica la sua azione legandosi al recettore delle benzodiazepine del complesso recettoriale GABAA e che, come l'Honokiolo, non porta cambiamenti nell'attività motoria (Kuribara H. et al.,2000). Nel 2001, basandosi sui risultati degli studi sul DHH-B, gli studiosi hanno voluto verificare l'attività di tale composto attraverso studi in vivo (Vogel's conflict test) e in vitro (uptake del <sup>36</sup>Cl). I risultati ottenuti con il Vogel's conflict test hanno confermato l'a-

## ERBORISTERIA AROMATICA E MEDICINALE

# A. MINARDI & FIGLI s.r.l.

48012 BAGNACAVALLO (RA)  
Via Boncellino 32

Tel. 0545.61460  
Fax 0545.60686  
P.IVA 00916310394  
Casella Postale 70  
e-mail: info@minardierbe.it  
www.minardierbe.it

# 80

anni di attività  
ed esperienza  
nel commercio e nella  
lavorazione all'ingrosso  
delle erbe medicinali  
ed aromatiche

### PRODUZIONE ♦ IMPORTAZIONI ♦ ESPORTAZIONI

Produzioni proprie - Controlli di raccolta - Essicazioni naturali ♦ Stabilimento attrezzato con impianti moderni per taglio, contusioni, polverizzazioni ♦ A richiesta si forniscono i prodotti elencati in listino in polvere, tagliati, contusi ecc. ♦ Preparazioni di tisane su richiesta.



zione ansiolitica del composto in esame. Nell'esperimento in vitro, l'effetto del DHH-B sull'ingresso del cloruro in particolari costrutti vescicolari (sinaptoneurosomi) è stato determinato in presenza ed in assenza di muscimolo, un agonista del GABAA. I risultati sono stati positivi in quanto il DHH-B aumenta l'uptake del cloruro sia in assenza che in presenza di muscimolo. Perciò si deduce da tali risultati che nel meccanismo di azione del DHH-B è coinvolto il complesso recettoriale GABA<sub>A</sub> (Muruyama Y., et al. 2001). Oltre ai lavori svolti dall'equipe di ricercatori giapponesi esistono altri studi in letteratura che hanno

chiarito e ulteriormente investigato il meccanismo d'azione dell'Honokiolo e del Magnololo. In un articolo pubblicato nel 1999 da Squires e colleghi, è stata investigata l'interazione dell'Honokiolo e del Magnololo con i recettori del GABA<sub>A</sub>, comparandone gli effetti mediante binding del 3H-MUS (muscimolo) e <sup>3</sup>H-FNM (flunitrazepam) su membrane di corteccia cerebrale e cerebellare di ratto. I risultati ottenuti hanno evidenziato che entrambi i bifenoli aumentano allostericamente l'affinità del recettore GABA<sub>A</sub> per il GABA e per il muscimolo, esplicando quindi un'azione potenziatrice della trasmissione gabaergica (Squires et al., 1999).

**SCOPO DELLA TESI**

Alla luce di tali considerazioni è stato testato in vitro l'intero estratto secco di Magnolia officinalis in quanto in letteratura non si trovano lavori svolti sull'intero estratto e in commercio non esistono formulazioni contenenti i bifenoli isolati bensì il fitocomplesso totale di corteccia di Magnolia. Questo esperimento è stato svolto presso i laboratori del dipartimento di psichiatria, neurobiologia, farmacologia e biotecnologie della facoltà di farmacia di Pisa. Lo scopo della tesi è stato quello di indagare l'attività ansiolitica di un estratto secco di Magnolia off. titolato al 2% in Honokiolo presente nei maggiori fitopreparati in commercio partendo da concentrazioni di Honokiolo trovate nei pochi studi in vitro presenti nella letteratura internazionale. Tali studi, infatti, hanno dimostrato l'influenza dell'Honokiolo e del suo derivato idrogenato DHH-B sulla funzionalità del recettore GABA<sub>A</sub> impiegando concentrazioni che vanno da 1 µM a 30 µM (Kuribara et al. 2001 Ai J. Et al 2001 B). Per cui in questa tesi sono state prese come punto di partenza le concentrazioni di Honokiolo riportate in letteratura per poi salire a concentrazioni più alte investigandone gli effetti attraverso un esperimento eseguito in vitro (uptake del <sup>36</sup>Cl).

REAGENTI	CONCENTRAZIONI
NaCl	145mM
MgCl2	5mM
KCl	5mM
Glucosio	10mM
CaCl2	1mM

Una magnolia con i semi prima della dispersione



Foto di H. Toyama

**MATERIALI E METODI**

**DROGA**

Si utilizza un estratto secco di Magnolia officinalis titolato al 2% in Honokiolo (il controllo può eseguirsi secondo la Monografia "Cortex Magnoliae officinalis" della farmacopea Cinese Edizione 2005, Volume I, pag. 44).

**Solubilizzazione della droga**

Vengono fatte 4 pesate di estratto secco (10mg, 5mg, 2mg e 1mg) e solubilizzate in 40 µl di etanolo assoluto e successivamente diluite in 3,4ml di un tampone a pH 7,5 (tampone di saggio) così composto: Eseguite le soluzioni, se ne preleva un' aliquota per il dosaggio radioattivo, ottenendo 4 campioni contenenti nel volume finale di 500 µl concentrazioni di Honokiolo pari a 150 µM, 75 µM, 30 µM e 15 µM rispettivamente (e una concentrazione di EtOH di ca 1 %).

**PREPARAZIONE DEI SINAPTONEUROSOMI DI CAVIA**

Si separa la sostanza bianca dalla corteccia cerebrale operando in ghiaccio, la quale, sminuzzata e posta in un omogenizzatore in vetro Potter Elvehjem, viene diluita 1:10 (gr/ml) con tampone di saggio. La corteccia viene poi omogenata mediante un pestello in fibra di teflon con 12 strokes; l'omogenato viene poi passato su tre strati di nylon (160 µm) e l'eluato viene filtrato sotto pressione con azoto su filtri millipore 10 µm LCWP 047 utilizzando una cella per ultrafiltrazione della Amicon. Segue una prima centrifugata a 900 x g per 15 minuti a 4° C. Viene scartato il sovranatante e il pellet viene ripreso con il tampone di saggio (1:10), si agita su vortex e si effettua una seconda centrifugata a 900 x g per 15 minuti a 4°C. Il pellet ottenuto, ripreso con il tampone di saggio (1:3), si agita su vortex ottenendo il preparato dei sinaptoneurosomi.

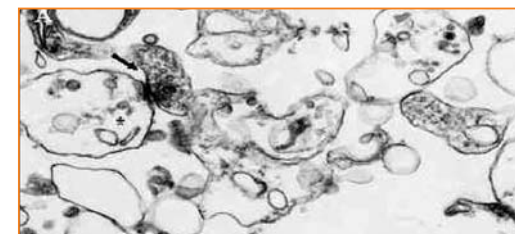


Figura 3: la freccia indica un sinaptoneurosoma

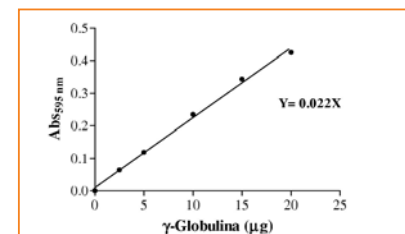



Fig. 4: Retta di taratura del dosaggio proteico

**DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DELLE PROTEINE NEI SINAPTONEUROSOMI**

Per determinare le proteine totali presenti nella preparazione di sinaptoneurosomi è stato effettuato un dosaggio, che prevede l'utilizzo del reattivo commerciale Bio-rad Protein Assay. Tale dosaggio si basa sul metodo colorimetrico di Bradford (1976), ovvero sul cambiamento di colore del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 in seguito al legame a residui amminoacidici, quali, principalmente, quelli aromatici o basici, come l'arginina.

Il dosaggio viene effettuato aggiungendo ad aliquote di sinaptoneurosomi e acqua ultrafiltrata, 200 µl del reattivo, raggiungendo un volume finale di 1 ml. Immediatamente i campioni sviluppano una colorazione tendente al blu, la cui intensità è direttamente proporzionale alla concentrazione di proteine. Viene



**dialfarm**  
S.r.l.

Tel. 06.92.01.20.78 - 06.92.01.42.51  
Fax 06.92.01.32.26  
Via Dei Mille, 8 - 04011 Aprilia (LT)  
www.dialfarm.it  
Servizi di consulenza per prodotti dietetici e di erboristeria

Assistenza presso il Ministero della Sanità  
Studio e messa a punto formulazioni  
Messa a punto testi di legge per etichette ed astucci  
Stesura schede tecniche  
Stesura e revisione testi materiali pubblicitari  
Formazione tecnico scientifica della rete di vendita  
Pratiche di notifica prodotti dietetici ai sensi del D.L. 111  
Pratiche di autorizzazione Ministeriale per officine di produzione  
Ricerca fornitori qualificati  
Fornitura capsule gelatina molle

CAMPIONI	SINAPTO-NEUROSONI	TAMPONE DI SAGGIO (1% ETOH)	GABA 2,5 mM	SOSPENSIONE DI MAGNOLIA OFF.	<sup>36</sup> Cl 0,56 µCi
PROVA 1 ( BASALE)	100 µl (1,5 mg)	350 µl	-----	-----	50µl
PROVA 2 (GABA 50 µM)	100 µl (1,5 mg)	340 µl	10 µl	-----	50µl
PROVA 3 (GABA 50 µM e HONOKIOLO 15 µM)	100 µl (1,5 mg)	-----	10 µl	340 µl	50µl
PROVA 4 (GABA 50 µM e HONOKIOLO 30 µM)	100 µl (1,5 mg)	-----	10 µl	340 µl	50µl
PROVA 5 (GABA 50 µM e HONOKIOLO 75 µM)	100 µl (1,5 mg)	-----	10 µl	340 µl	50µl
PROVA 6 (GABA 50 µM e HONOKIOLO 150 µM)	100 µl (1,5 mg)	-----	10 µl	340 µl	50µl

Tabella 2

Prova	% (medie)	SEM
1	100,000	0,5773503
2	120,000	1,154701
3	153,500	18,500
4	122,000	10,10775
5	93,750	6,289873
6	93,250	6,992556

LEGENDA: PROVA 1 (BASALE), PROVA 2 (GABA 50 µM), PROVA 3 (GABA 50µM e HONOKIOLO 15µM), PROVA 4 (GABA 50µM e HONOKIOLO 30µM), PROVA 5 (GABA 50µM e HONOKIOLO 75µM), PROVA 6 (GABA 50µM e HONOKIOLO 150µM)

Tabella 3

quindi misurata l'assorbanza con uno spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 595 nm. Dal valore dell'assorbanza viene ricavata la concentrazione di proteine presenti nel campione, facendo riferimento ad una retta di taratura, ottenuta utilizzando soluzioni standard di  $\gamma$ -globulina a concentrazioni crescenti (2,5-20 µg) (Fig.4).

### DETERMINAZIONE DELL'UPTAKE DEL <sup>36</sup>Cl DEI SINAPTONEUROSONI

Aliquote di sinaptoneurosoni (100 µl), pari a circa 1,5-2 mg di proteine, vengono riscaldati a 30° C per 15 minuti a bagnomaria. Trascorso tale periodo vengono fatte delle aggiunte in sequenza di GABA 2,5mM, Magnolia off., a diverse concentrazioni di Honokiololo, e <sup>36</sup>Cl (0,56 µCi – micro Curie, unità di misura della radioattività) (vedi tabella 2). Si attendono 10 secondi misurati attentamente con il cronometro (che corrispondono al tempo di incubazione) e si aggiungono 4ml di tampone di saggio addizionato di picrotossina 10mM, per bloccare la reazione di uptake. I campioni vengono filtrati sottovuoto su filtri di fibra di vetro Whatman GF/C che vengono lavati per due volte in successione con 4 ml di tampone di saggio. Avvenuta la filtrazione i filtri vengono messi in vials di plastica e addizionati con 4 ml di liquido di scintillazione Ultima Gold MV (Perkin Elmer). La lettura della radioattività contenuta in ciascun campione viene eseguita con uno scintillatore liquido Tri-Carb 2800TR (Perkin Elmer).

### MODIFICAZIONE E CALCOLO DELL'UPTAKE <sup>36</sup>Cl IN SINAPTONEUROSONI AD OPERA DEL GABA E DELL'ESTRATTO SECCO DI MAGNOLIA OFF.

L'influenza della presenza del neurotrasmettitore GABA e dei componenti dell'estratto secco di Magnolia off, principalmente di Honokiololo, sull'uptake del <sup>36</sup>Cl viene valutata incubando i sinaptoneurosoni con <sup>36</sup>Cl (0,56 µCi) in presenza di GABA alla concentrazione di 50µM e di sospensione di magnolia off., con Honokiololo pari a 15 µM, 30 µM, 75 µM e 150 µM, alla temperatura di 30°C per 10 secondi.

Dopo filtrazione sottovuoto, la radioattività, letta su filtro tramite scintillatore in fase liquida ed espressa in cpm (count per minute), viene normalizzata come percentuale: il 100% dell'uptake si riferisce ai cpm del basale in assenza di Gaba (contenente sinaptoneurosoni, tampone di saggio e <sup>36</sup>Cl).

### RISULTATI E DISCUSSIONI

La corteccia di rami e radici derivante da varie specie di Magnolia è da sempre usata nella medicina tradizionale cinese per il trattamento di vari disturbi legati all'ansia. Da molto tempo è conosciuta l'azione mio-rilassante e ansiolitica di cui sono responsabili i due bifenoli estratti dalla corteccia di Magnolia

off, Honokiololo e Magnololo, e i loro metaboliti. Tra i principi attivi appena menzionati, quello che ha mostrato un'azione maggiore e più efficace è l'Honokiololo. Alcuni studi hanno evidenziato che basse dosi di tale composto, inferiori a quelle in grado di produrre sedazione, esplicano una caratteristica azione ansiolitica in topi sottoposti all'elevated plus maze test (Kuribara H. et al., 1998). Inoltre è stato dimostrato che l'effetto ansiolitico dell'Honokiololo viene inibito dal flumazenil, una imidazobenzodiazepina antagonista delle benzodiazepine, e dall'alcaloide bicucullina, antagonista del recettore GABA<sub>A</sub>.

A differenza del diazepam, l'Honokiololo induce in modo selettivo l'effetto ansiolitico, senza causare ne' sedazione ne' disfunzioni nell'attività motoria, grazie probabilmente al fatto che l'Honokiololo agisce principalmente su una sola subunità del recettore GABA<sub>A</sub>. Inoltre l'honokiololo non provoca dipendenza fisica, depressione centrale e amnesia, rispetto all'ansiolitico di sintesi diazepam (Kuribara H. et al., 1999). Studi condotti su recettori GABA<sub>A</sub> ricombinanti espressi in sistemi Sf-9/baculovirus hanno mostrato che l'Honokiololo è in grado di aumentare il legame del muscimolo ai recettori ricombinanti che contengono la subunità  $\alpha 2$  (Ai J. et al., 2001). L'Honokiololo aumenta di preferenza il legame del muscimolo a membrane di ippocampo murino rispetto a membrane ottenute dalla corteccia cerebrale o dal cervelletto di topo. L'apparente aumento nel numero dei siti di legame del muscimolo può essere dovuto al fatto che l'Honokiololo è in grado di incrementare in maniera allosterica l'affinità dei siti di legame a bassa affinità (Squires et al., 1999). L'effetto dell'Honokiololo sui recettori GABA<sub>A</sub> contenenti la subunità  $\alpha 2$  è in accordo con il fatto che tali recettori siano associati ad attività ansiolitica piuttosto che sedativa.

Alla luce di queste considerazioni è stata indagata l'influenza dell'estratto di Magnolia off, titolato al 2% in Honokiololo sull'attività del recettore GABA<sub>A</sub>. Tale influenza è stata verificata tramite studi di uptake del <sup>36</sup>Cl- condotti su sinaptoneurosoni preparati a partire da corteccia cerebrale di ratto. I sinaptoneurosoni sono infatti costruiti vescicolari in cui è possibile mimare il funzionamento dei canali gabaergici nei confronti del cloroione. Sulla membrana delle vescicole sono presenti i complessi recettoriali GABA-ionofori del cloroione; quando è presente un

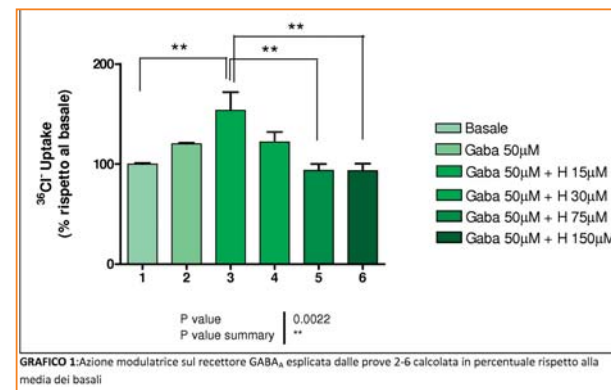
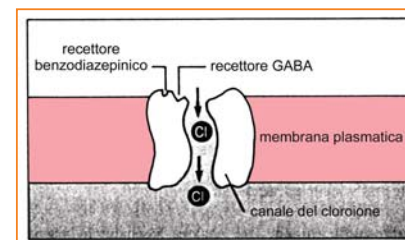


GRAFICO 1: Azione modulatrice sul recettore GABA<sub>A</sub>, esplicitata dalle prove 2-6 calcolata in percentuale rispetto alla media dei basali



Meccanismo delle Benzodiazepine

agonista o un modulatore positivo del complesso recettoriale GABA<sub>A</sub>, il recettore-canale si apre permettendo l'ingresso del <sup>36</sup>Cl per gradiente di concentrazione all'interno dei sinaptoneurosoni. Dopo un breve periodo d'incubazione (10 secondi) la reazione viene interrotta dall'aggiunta di picrotossina, antagonista del recettore. In seguito a filtrazione sottovuoto, la radioattività intrappolata all'interno dei sinaptoneurosoni, che per le loro dimensioni non passano attraverso i pori del filtro, può essere conteggiata in cpm attraverso un apposito strumento. I dati vengono poi calcolati in percentuale rispetto alla media del basale.

Le percentuali medie dei risultati, ottenuti da due esperimenti dove ogni prova è stata condotta in doppio, sono riportate in tabella 3.

In ciascuna prova è stato utilizzato come agonista aprente il canale al cloro il neurotrasmettitore Gaba, per poter così verificare l'azione modulatrice sul recettore GABA<sub>A</sub> dei derivati bifenolici della Magnolia off. I risultati mostrano che l'Honokiololo è



TIPO DI DOSE	DIAZEPAM	ESTRATTO SECCO DI MAGNOLIA (2% HONOKIOLO)
DOSE MEDIA PER PAZIENTI ADULTI	Da 2mg due-tre volte/die a 5mg una-due volte/die (4mg-10mg per die)	250mg di estratto secco di cortecci a di Magnolia che equivalgono a 10mg/die di Honokiolo
DOSE LETALE NEL 50% DELLA POPOLAZIONE (LD 50)	<b>orale:</b> 720mg/kg nei topi 1240mg/kg nei ratti <b>Somministrazione intraperitoneale:</b> 400mg/kg in scimmie (morte entro 6 giorni)	<b>DECOTTO DI CORTECCIA DI MAGNOLIA (non titolato in honokiolo)</b> <b>Iniezione intraperitoneale:</b> 6.12gr/kg nei topi <b>Iniezione subcutanea:</b> 51gr/kg nei topi <b>HONOKIOLO</b> <b>MAGNOFLUORINA</b> Iniezione: 98mg/kg nei topi Iniezione: 45mg/kg nei topi

Tabella 4: paragone fra le dosi letali e quelle consigliate di Honokiolo e diazepam

in grado di incrementare l'ingresso di  $^{36}Cl^-$  all'interno dei sinaptoneuroso, in particolare se presente in concentrazioni pari a 15  $\mu M$  e 30  $\mu M$ . L'analisi ha infatti evidenziato un aumento statisticamente significativo nella prova numero 3 e un trend di aumento nella prova numero 4 (grafico 1).

In particolare il valore di P, calcolato mediante il test statistico One-way Anova (Newman-Keuls test), è risultato di 0,0022 per la prova contenente una concentrazione di Honokiolo pari a 15  $\mu M$ , evidenziando un'attività modulatrice positiva per l'Honokiolo e gli altri derivati eventualmente presenti nell'estratto secco di partenza.

Tale dato è in accordo con recenti esperimenti di patch-clamp condotti sui recettori GABA<sub>A</sub> ricombinanti che hanno evidenziato per l'Honokiolo 10  $\mu M$  una potenza comparabile a quella del diazepam 10  $\mu M$  nel potenziare le correnti al cloro GABA-indotte. (Ai J., et al. 2001)

Per quanto riguarda le concentrazioni di Honokiolo superiori a 30  $\mu M$ , mai prese in esame nei precedenti studi in vitro sull'efficacia ansiolitica della Magnolia riportati in letteratura, i nostri risultati offrono la possibilità di comprendere più a fondo il meccanismo d'azione dei bifenoli derivati dalla Magnolia Off. Infatti, prendendo in esame le concentrazioni più alte testate, 75  $\mu M$  e al 150  $\mu M$ , è stata riscontrata una riduzione dell'ingresso di  $^{36}Cl^-$  di circa il 27%, rispetto alla normale stimolazione operata dal GABA. Quindi, con concentrazioni di Honokiolo inferiori a 30  $\mu M$  si otterrebbe una modulazione positiva sulle correnti del cloro GABA-mediate, mentre a concentrazioni superiori si manifesterebbe una modulazione negativa.

Un'analoga tipologia d'azione modulatoria è quella operata dai neurosteroidi a livello del recettore GABA<sub>A</sub>; mentre concentrazioni nanomolari di neurosteroidi sono sufficienti a modulare positivamente le correnti del cloro, la modulazione negativa dei canali ionici attivati dal GABA richiede concentrazioni micromolari (Rupprecht R. et al.1999). Tali risultati indirizzano lo studio verso esperimenti in vitro in grado di indagare più approfonditamente le modalità d'azione dell'Honokiolo, in particolare analizzandone gli effetti concentrazione-dipendenti.

### CONCLUSIONI

Dai dati trovati nella letteratura internazionale si evince che l'estratto secco della corteccia di Magnolia off. titolato al 2% in honokiolo ha effetti quasi equivalenti al diazepam ma a dosi inferiori a quest'ultimo ovvero: 0,2 e 0,5 mg/kg per l'Honokiolo e 1mg/kg per il diazepam.

In commercio si trovano fitopreparati con estratto secco di corteccia di Magnolia off. la cui dose in Honokiolo è pari a quella massima consigliata per il diazepam.

Paragonando la dose letale di diazepam a quella di honokiolo ritrovata in letteratura e considerando i risultati ottenuti con l'uptake del cloruro, sarebbe meglio, a livello precauzionale, abbassare le dosi di Honokiolo fin quando studi mirati di farmacodinamica e farmacocinetica non indagheranno sull'indice terapeutico dell'Honokiolo.

\* **Autrice della tesi presentata**  
**Relatrici: Prof.ssa Claudia Martini e**  
**Dott.ssa Eleonara Da Pozzo**

### BIBLIOGRAFIA

- Ai J., Wang, Nielsen, Honokiolo and Magnolol selectively interact with GABAA receptor subtypes in vitro. Pharmacology 2001 63: 34-41
- Bang KH, et al. Antifungal activity of magnolol and honokiolo. Archives Pharmaceutical Research 2000; 23(1): 46-49.
- Bruni e Nicoletti, dizionario ragionato di erboristeria e di fitoterapia picnic 2003
- Chiu LC, Ling JY, and Chang CC. beta-Eudesmol as an antidote for intoxication from organophosphorus anticholinesterase agents. European Journal of Pharmacology 1995; 292(2): 151-156.
- Fratkin J. Chinese Herbal Patent Formulas: A Practical Guide, 1986 Shya Publications, Santa Fe, NM.
- Hong-Yen Hsu and Chau-Shin Hsu, Commonly Used Chinese Herb Formulas with Illustrations, 1980 rev. ed., Oriental Healing Arts Institute, Long Beach, CA.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). Some traditional herbal medicines. Some mycotoxins, naphthalene and styrene. In IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans. Vol. 52 IARC, Lyon, France, 2002.
- Kong CW, et al., Magnolol attenuates peroxidative damage and improves survival of rats with sepsis. Shock 2000; 13(1): 24-28.
- Kuribara H. et al., behavioural pharmacological characteristics of honokiolo, an anxiolytic agent present in extracts of Magnolia bark, evaluated by an elevated plus-maze test in mice. J. Pharm. Pharmacol. 1998 Jul; 50 (7): 819-826.
- Kuribara H., Stavinocha WB, Maruyama Y. Honokiolo, a putative anxiolytic agent extracted from magnolia bark, has no diazepam-like side-effect in mice. J Pharm Pharmacol. 1999 51 (1):97-103
- Kuribara H. et al.(2000A), The anxiolytic effect of two oriental herbal drugs in Japan attributed to honokiolo from magnolia bark. Journal of Pharmacy and Pharmacology; 52(11): 1425-1429.
- Kuribara H. et al. (2000B), comparative assessment of the anxiolytic-like activities of honokiolo and derivatives. J. Pharmacology, Biochemistry and Behavior 67: 597-601
- Le Prell CG, Hughes LE, Miller JM. Free radical scavengers vitamins A, C, and E plus magnesium reduce noise trauma. Free Radic. Biol. Med. 2007 May 1;42(9):1454-63.
- Lou Zhicen and Qin Bo, Study on Quality and Systematization on Category of Chinese Frequently Used Crude Herbs, Section II, 1995 Beijing Medical University and Peking Union Medical College Allied Press, Beijing.
- Tang W and Eisenbrand G, Chinese Drugs of Plant Origin, 1992 Springer-Verlag, Berlin.
- Matsuki A. Recent findings in the history of anesthesia: Discovery of muscle relaxant magnocurarine in Japan. Masui 1982; 31(12): 1414-1419.
- Milkya et al., A new sensitive method which unlike the Vogel test detects the anxiolytic effect of tofisopam. Pol. J Pharmacol Pharm. 1998 nov-dec; 40(6): 561-572.
- Muruyama, Y., Kuribara, H., Morita, M., Yuzurihara, M., Weintraub, S.T. (1998) Identification of magnolol and honokiolo in the anxiolytic extracts of Saiboku-to, an oriental herbal medicine. J. Nat. Prod. 61:135-138
- Muruyama Y., Kuribara H. et al., confirmation of the anxiolytic-like effect of dihydrohonokiolo following behavioural and biochemical assessments. J. Pharm. Pharmacol. (2001) 53(5):721-5
- Rupprecht R. e Holsboer F. 1999 neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. TINS 22: 410-16
- Stewart S, et al., A randomized trial of antioxidant therapy alone or with corticosteroids in acute alcoholic hepatitis J Hepatol. 2007 May 4;
- Squires et al., honokiolo and magnolol increase the number of 3H Muscimol binding sites three-fold in rat forebrain membranes in vitro using a filtration assay, by allosterically increasing the affinities of low-affinity sites. Neurochemical research, vol. 24, no.12, 1999, pp. 1593-1602.
- Takeuchi PL, Antunes LM, Takahashi CS. Evaluation of the clastogenicity and anticlastogenicity of vitamin B(6) in human lymphocyte cultures. Toxicol In Vitro. 2007 Jun;21(4):665-70
- Wang JP, et al., Antiinflammatory and analgesic effects of magnolol. Archives Pharmacology 1992; 346(6): 707-712.
- Wang SM, et al., Magnolol stimulates steroidogenesis in rat adrenal cells. British Journal of Pharmacology 2000; 131(6): 1172-1178.
- Vanhaelen M, et al., Identification of aristolochic acid in Chinese herbs. Lancet 1994; 343: 174.
- Vanherweghem JL, et al., Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women associated with slimming regimen including Chinese herbs. Lancet 1993; 34: 387-391.
- Zhu YP. Chinese Materia Medica: Chemistry, Pharmacology, and Applications, 1998 Harwood Academic Publishers, Amsterdam.

## Amare se stessi Rispettare la natura



Officinali di Montauto

BIO ECO-COSMESI

Formulazione naturale a base di oli vegetali  
Estratti e oli essenziali esclusivamente da agricoltura biologica  
Privi di paraben, nickel e alcool  
Processi produttivi ecosostenibili e non inquinanti

Per richiedere informazioni commerciali:  
Spaccio Agricolo Corso Magenta, 12 I-20123 Milano  
Tel/ Fax +39 02 36522069 E-mail: spaccioagricolo@officinalidimontauto.it

www.officinalidimontauto.it