

**Abstract Giornata Formativa
SAPIENZA-SIROE
Roma, 8 Settembre 2017**

Applicazione di metodi machine learning agli oli essenziali per identificare i componenti più importanti per l'attività antimicrobica/antibiofilm

A. Patsilidakos^{1,2}, M. Sabatino¹ e R. Ragno^{1,2*}

*Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, Sapienza Università di Roma, Italia
Alchemical Dynamics srl, 00125 Roma, Italia*

Introduzione. Gli oli essenziali sono miscele complesse che sempre più suscitano l'interesse dei ricercatori. Nel caso di oli essenziali biologicamente attivi la complessità chimica rende difficoltosa l'attribuzione del meccanismo di azione attraverso il quale queste miscele esplicano la loro attività.

Scopi. In questo studio sono state applicate diverse tecniche di *machine learning* a alcune serie di oli essenziali per sviluppare modelli matematico-statistici per focalizzare sui componenti chimici maggiormente responsabili dell'attività microbiologica.

Materiali e Metodi. Oli essenziali distillati da *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *glandulosa* (Req.) Ball (CG), *Foeniculum vulgare* Miller (FV), *Ridolfia segetum* Moris (RS) e *Mentha suaveolens* (MS) biologicamente attivi nei confronti di *Candida albicans* (CA) e *Pseudomonas aeruginosa* (PA). Implementazione di algoritmi in linguaggio python per lo sviluppo di modelli di classificazione con la tecnica di *Gradient Boosting Regression* (GBR) della libreria sklearn. Uso di librerie PLS-DA implementate nel linguaggio Matlab.

Risultati. Sono stati sviluppati dei modelli di classificazione capaci di discriminare tra oli essenziali biologicamente attivi da quelli che non hanno mostrato un'apprezzabile potenza antimicrobica. In il GBR applicato ad un dataset di 89 oli essenziali provenienti da tre diverse piante (CG, FV e RS) ha evidenziato che estragolo e fellandrale sono particolarmente importanti nell'inibire o rallentare la formazione di biofilm di PA, mentre altri componenti sono invece responsabili di aumentarne la produzione (limonene, pulegone and crisantenone). L'applicazione della PLS-DA alla serie di oli essenziali di MS ha fornito un modello di classificazione statisticamente robusto a 9 variabili in grado di discriminare gli oli essenziali attivi da quelli inattivi. Analizzando poi i vari coefficienti calcolati da questo modello, è stata individuata la sostanza determinante per ciascuna classe, il piperitenone ossido per gli oli attivi e la demelverina per la classe degli inattivi.

Conclusioni. L'applicazione di tecniche di *machine learning* come GBR e PLS-DA hanno permesso di evidenziare quali componenti sono importanti per l'attività microbiologica degli

* E-mail: rino.ragno@uniroma1.it

oli essenziali. Questi risultati sono un primo approccio che applicato in modo sistematico per determinate patologie potrà indirizzare la scelta degli oli essenziali più efficaci non solo in base alla provenienza (pianta) ma anche soprattutto al loro profilo chimico. Ulteriori integrazioni scientifiche tra dati microbiologici, biochimici, chemiometria e docking molecolare sono in fase di sviluppo e permetteranno di svolgere indagini sul meccanismo di azione degli oli essenziali.

Keywords: Oli Essenziali, machine learning, gradient boosting regression, PLS-DA

Attività di olii essenziali e miscele complesse nei confronti di microrganismi multi-antibiotico resistenti

A. Oliva^{1†}, M. Božović², M. De Angelis¹; A. Cipolla¹, R. Ragno² e V. Vullo¹

¹ *Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, Sapienza Università di Roma, Piazzale Aldo Moro 5 - 00185 Rome (Italy)*

² *Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, Sapienza Università di Roma, Piazzale Aldo Moro 5 - 00185 Rome (Italy)*

Introduzione. Le infezioni causate da microrganismi multi-antibiotico resistenti rappresentano un problema di emergenza di sanità pubblica, dal momento che sono caratterizzate da elevata mortalità e le opzioni terapeutiche sono allo stato attuale limitate. Gli olii essenziali (OE) e le miscele complesse presentano attività antiossidanti e antibatteriche, che ne rendono l'uso nel campo medico particolarmente interessante.

Scopi. Scopo del presente studio è stato quello di valutare l'attività antibatterica di OE e di miscele complesse nei confronti di microrganismi Gram negativi e Gram positivi multi-antibiotico resistenti.

Materiali e Metodi. Sono stati utilizzati i seguenti isolati batterici (ceppi clinici): *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA), *Klebsiella pneumoniae* produttrice di beta lattamasi ad ampio spettro ma sensibile ai carbapenemi, *Klebsiella pneumoniae* produttrice di beta lattamasi ad ampio spettro e resistente ai carbapenemi, *Acinetobacter baumannii* resistente ai carbapenemi. Sono stati testati: Tea Tree Oil (TTO), *Coristospermum cuneifolium* (Guss.) Bertol., *Sideritis romana* L. subsp. *purpurea* e suoi estratti, *Chaerophyllum coloratum* L. e suoi estratti, estratti di *Punica granatum* L. L'attività antibatterica è stata misurata dopo incubazione per 24h mediante l'analisi della MIC (minima concentrazione inibente) e della MBC (minima concentrazione battericida) utilizzando 2 inoculi batterici: 5×10^3 CFU/mL (*low inoculum*, che rappresenta la probabile carica infettante delle infezioni localizzate); 5×10^5 CFU/mL (*high inoculum*, che rappresenta la probabile carica infettante delle infezioni sistemiche). L'attività battericida è stata misurata mediante la differenza in termini di log₁₀ CFU/mL tra l'inoculo iniziale e il termine dell'incubazione.

[†] E-mail: alessandra.oliva@uniroma1.it

Risultati. Per quanto riguarda MRSA, elevata attività battericida è stata riscontrata per *S. romana* subsp. *purpurea* e per alcuni dei suoi estratti (metanolo e 1,2-dichloroethane), *C. coloratum*, *C. cuneifolium* ed estratti di *P. granatum*. Rispetto ai microrganismi Gram positivi, e in modo particolare MRSA, l'attività degli OE e di miscele complesse nei confronti dei microrganismi Gram negativi multi-antibiotico resistenti appare meno marcata; tuttavia, elevata azione battericida è stata osservata nei confronti di *A. baumannii* per *P. granatum* mentre *C. cuneifolium* presentava un'azione batteriostatica. Per quanto riguarda *K. pneumoniae*, solo un estratto di *P. granatum* mostrava attività battericida, mentre assenza di attività è stata riscontrata per *S. romana*, *C. coloratum* e *C. cuneifolium*. TTO ha mostrato un'elevata azione battericida sia sui microrganismi Gram negativi multi-antibiotico resistenti, in modo particolare *A. baumannii*, sia su MRSA.

Conclusioni. Tra i microrganismi multi-antibiotico resistenti, i Gram positivi e in modo particolare MRSA presentano una maggiore sensibilità all'azione battericida degli OE e delle miscele complesse testate, ipotizzandone un possibile ruolo terapeutico nell'ambito di infezioni sostenute da tali microrganismi. Sebbene i Gram negativi (in modo particolare *K. pneumoniae*) appaiano molto più resistenti all'azione antibatterica degli OE e/o dei loro estratti, la spiccata attività battericida di TTO e degli estratti di *P. granatum* nei confronti di *A. baumannii*, il cui ruolo come patogeno causa di infezioni nosocomiali e di difficile cura si rivela sempre più importante, appare meritevole di attenzione.

Keywords: MRSA, *Acinetobacter baumannii*, microrganismi multi-antibiotico resistenti, oli essenziali, estratti, miscele complesse

Azione anti-virulenza di oli essenziali e/o loro componenti vs batteri patogeni umani

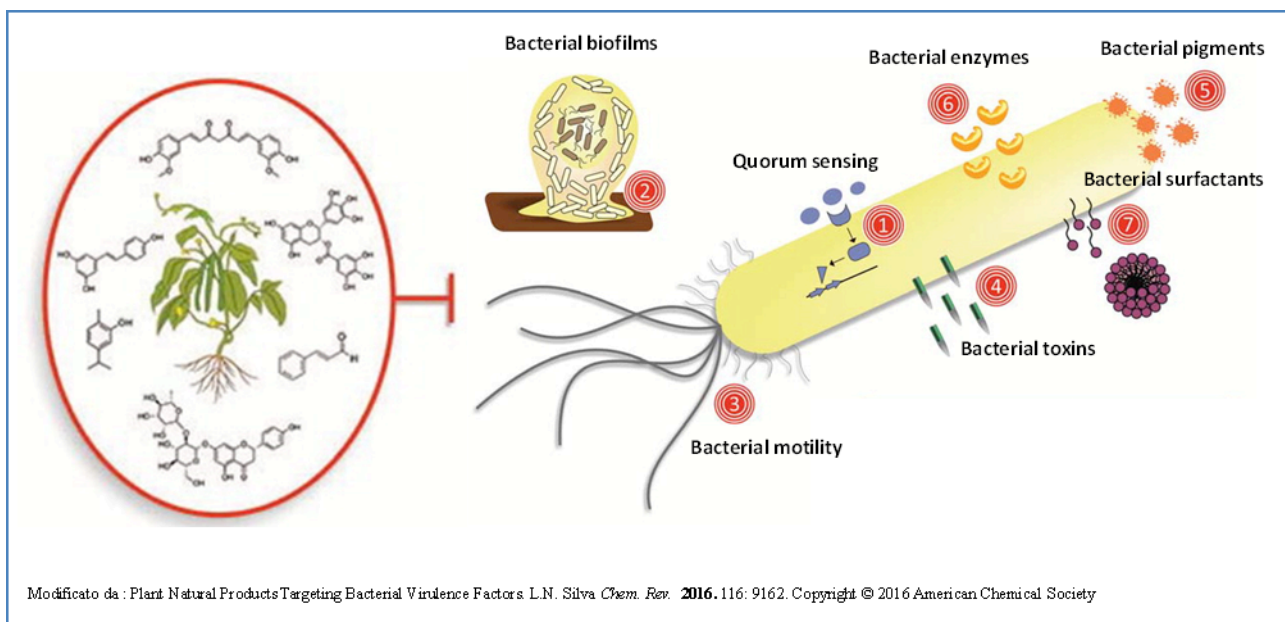
Bruna Facinelli ‡

Dipartimento Scienze Biomediche e Sanità Pubblica - Sezione Microbiologia-UNIVPM – Ancona

L'emergenza globale dell'antibiotico-resistenza, unitamente al mancato/ridotto sviluppo di nuove molecole antibiotiche, rappresenta attualmente un grave problema di salute pubblica in quanto può significare il ritorno ad un'era pre-antibiotica in cui le infezioni causate da patogeni resistenti a tutti gli antibiotici risultano intrattabili. L'aumento e la diffusione dell'antibiotico resistenza ha risvegliato l'interesse nei confronti di fitocomposti come possibili agenti antimicrobici adiuvanti e/o alternativi agli antibiotici. Gli oli essenziali e/o alcuni loro componenti sono molto interessanti dal punto di vista microbiologico in quanto, oltre all'azione battericida e a quella sinergica con antibiotici, possono avere un'azione anti-virulenza. I patogeni possiedono numerosi fattori di virulenza necessari alla colonizzazione e

‡ E-mail: b.facinelli@univpm.it

diffusione all'interno dell'ospite, quali flagelli, adesine, invasive e tossine nonché la capacità di formare biofilm, una struttura inaccessibile all'azione di molti antibiotici. Alcuni fitocomposti, tra cui gli oli essenziali, sono in grado di ridurre la virulenza batterica interferendo con il *quorum sensing*, il sistema di comunicazione utilizzato dai batteri per coordinare l'espressione di geni di virulenza. Tra gli oli essenziali con documentata attività anti-virulenza troviamo quelli estratti da Tea tree (*Melaleuca alternifolia*), chiodi di garofano (*Syzygium aromaticum*), origano (*Origanum vulgare*), rosa (*Rosa damascena*), geranio (*Geranium spp.*), lavanda (*Lavandula angustifolia*), rosmarino (*Rosmarinus officinalis*), cannella (*Cinnamomum spp.*), e coriandolo (*Coriandrum sativum*). Nella relazione verranno discusse le proprietà anti-virulenza di alcuni oli essenziali nei confronti di *Listeria monocytogenes*, un importante patogeno alimentare umano ed animale, in grado di invadere cellule eucariotiche e di attraversare il filtro placentare. In particolare, verranno presentati i risultati ottenuti da un nostro studio condotto utilizzando olio essenziale di *Cannabis sativa* L (canapa industriale a basso contenuto di delta-9-tetraidrocannabinolo o THC) nei confronti di ceppi clinici di *L. monocytogenes*, isolati da sangue e liquor nel corso di un *outbreak* di listeriosi invasiva verificatosi in provincia di Ancona all'inizio del 2016 e legato al consumo di alimenti contaminati di origine suina. L'olio essenziale dimostrava di possedere un'attività anti-virulenza sia *in vitro* che *in vivo*. L'utilizzo di una strategia antimicrobica che abbia come bersaglio la virulenza sembra attualmente molto interessante sia per la bassa pressione selettiva che per la conseguente scarsa propensione allo sviluppo di resistenze. Questo approccio può avere dei vantaggi rispetto agli antibiotici tradizionali poiché, anziché agire direttamente sulla vitalità o la crescita, disarmo il patogeno e si rivolge a fattori specifici legati alla patogenicità, limitando di fatto danni collaterali al microbiota residente.



Oli essenziali e malattie infettive

Francesca Mondello^{1§}, Antonietta Girolamo¹, Maura Di Vito²

¹Dipartimento di Malattie Infettive, Istituto Superiore di Sanità, , Roma, Italia

²Dipartimento di Scienze Agrarie, Università di Bologna, Roma, Italia

Introduzione. Recentemente il mondo scientifico ha considerato le sostanze naturali quale possibile fonte di molecole potenzialmente terapeutiche per fronteggiare varie problematiche di sanità pubblica, tra cui le continue emergenze infettive con fenomeni associati di farmacoresistenza. Secondo l'OMS, per non arrivare ad un'epoca "pre-antibiotica", sono necessarie e urgenti, oltre a misure di prevenzione e di controllo delle infezioni a livello globale, anche nuove classi di molecole sicure ed efficaci quale possibile alternativa o integrazione per la risoluzione di alcune patologie infettive. Alla luce di ciò gli oli essenziali (OE), complesse miscele estratte da piante aromatiche, possono costituire dei candidati potenziali promettenti per la prevenzione e il trattamento di diverse infezioni microbiche.

Scopi. Mettere in evidenza le potenziali applicazioni degli OE e dei loro principali costituenti, nei confronti di infezioni da microrganismi batterici e fungini patogeni per l'uomo, anche resistenti ai farmaci convenzionali e nei confronti di altri patogeni quali virus e parassiti.

Materiali e Metodi. Per valutare l'attività antimicrobica *in vitro* degli OE sono stati utilizzati, con alcune modifiche, i metodi convenzionali prescritti per testare gli antibiotici, secondo EUCAST e CLSI; per studi antimicrobici *in vivo* sono stati utilizzati differenti modelli sperimentali. Molte indagini sono state condotte più frequentemente con OE di Lamiaceae e di Myrtaceae, o con i loro componenti, nei confronti di *Staphylococcus aureus*, batterio patogeno ad elevato grado di morbilità e mortalità e nei confronti del patogeno fungino opportunisto *Candida albicans*. Gli stessi OE sono stati testati *in vitro* anche nei confronti di alcuni virus con involucro pericapsidico e di alcuni protozoi e metazoi patogeni per l'uomo.

Risultati. Gli OE estratti da Lamiaceae, come *Zataria multiflora*, *Ocimum sanctum*, le specie *Thymus*, le specie *Origanum* (*O. vulgare*, *O. majorana*), *Rosmarinus officinalis*, *Mentha piperita*, *M. suaveolens* ed estratti da Myrtaceae quali *Melaleuca alternifolia* Cheel (Tea tree oil-TTO), *Myrtus communis*, con i loro componenti principali, oltre ad avere attività antibatterica, hanno mostrato anche forte attività antifungina, in particolare anti-*Candida*, anche nei confronti di ceppi resistenti. Gli OE testati in combinazione con un antibiotico o con altri OE hanno mostrato effetti sinergici sia contro *Staphylococcus aureus* meticillino resistente (MRSA), sia contro *Candida*, in molti casi con una riduzione sostanziale della MIC. Solo per fare qualche esempio, OE di Lamiaceae e di Myrtaceae, e i loro componenti, hanno mostrato anche attività *in vitro* nei confronti di herpes virus, virus influenzale A/PR/8 sottotipo H1N1, virus Epstein-Barr e nei confronti di parassiti quali *Trichomonas vaginalis*, *Giardia lamblia*, *Plasmodium falciparum*, *Echinococcus granulosus* e acari umani. Alcuni studi preclinici hanno dimostrato soprattutto l'efficacia di OE estratti da timo, perilla, geranio, tea tree per infezioni mucosali e sistemiche da *Candida* e per infezioni da dermatofiti. Gli studi clinici in letteratura hanno indicato come alcuni OE (es. OE di *Melaleuca alternifolia*) possano

[§] E-mail: francesca.mondello@iss.it

essere efficaci come agenti terapeutici nei confronti di MRSA e *Candida albicans*, ma purtroppo non sono ancora esaustivi.

Conclusioni. Gli OE, oltre a dimostrare una notevole attività antimicrobica anche nei confronti di microbi multi-resistenti, possiedono un vasto potenziale terapeutico tramite effetti biologici multipli e proprietà additive o sinergiche, come riportato dalla letteratura scientifica. I risultati sono molto incoraggianti, ma la qualità della ricerca e le evidenze scientifiche disponibili sono spesso scarse. Oltre alla necessità di standardizzazione dei criteri di qualità degli OE e delle varie metodiche *in vitro* sono richiesti ulteriori studi *in vivo* (studi pre-clinici, clinici, farmacocinetici, tossicologici) per confermare le loro proprietà terapeutiche e gli eventuali effetti collaterali.

Keywords: oli essenziali, farmaco-resistenza, batteri, funghi, virus, parassiti

Identificazione di componenti naturali di oli essenziali mediante l'ausilio di piattaforme chemo-informatiche

S. Alcaro**

Laboratorio di Chimica Farmaceutica, Dipartimento di Scienze della Salute, Università "Magna Græcia", Catanzaro, Italia

Introduzione. Gli oli essenziali sono, per definizione, miscele di composti organici a basso peso molecolare che, grazie alle proprietà chimico-fisiche di cui dispongono, riescono a diffondere con facilità in fase gassosa e spesso anche attraverso le membrane biologiche. Pur trattandosi di piccole molecole, riescono in alcuni casi a modulare l'azione di target di interesse farmaceutico, agendo spesso in maniera non selettiva, ma contemporaneamente su più bersagli biologici. Questo concetto è alla base di un nuovo paradigma utilizzato nel processo di scoperta di nuovi farmaci che porta il nome di *multi-target* o *poli-farmacologia*. La complessità che da esso deriva richiede l'ausilio di strumenti in grado di processare contemporaneamente una grande quantità di dati ovvero lo sviluppo di piattaforme chemoinformatiche.

Scopi. Il primo scopo del lavoro è avviare il processo di catalogazione chemo-informatica di componenti bioattivi presenti negli oli essenziali. Il secondo scopo è condurre screening *in silico* per evidenziarne la capacità di interazione con bersagli terapeutici. Il terzo è stabilire il profilo poli-farmacologico che i singoli componenti di un olio essenziale possono presentare in una cascata di eventi fisiopatologici di interesse farmaceutico.

Materiali e Metodi. I materiali relativi alle componenti derivano dall'analisi di oli essenziali reperite da fonti bibliografiche o sperimentali. Stabilita una concentrazione minima sono chemo-catalogate quelle componenti presenti in maggiore percentuale. I target biologici sono derivati da studi di biologia strutturale che corrispondono a modelli molecolari certificati, come quelli riportati nella Protein Data Bank (PDB). I metodi di calcolo fanno capo alle

** E-mail: alcaro@unicz.it

tecniche di modellazione molecolare, ovvero di *conformational analysis*, *docking* e *virtual screening*.

Risultati. Studi *in silico* preliminari, confermati da prove enzimatiche, hanno consentito al nostro laboratorio l'identificazione di componenti bioattive di vari oli essenziali che agiscono su isoforme specifiche della Anidraasi Carbonica (Costa, G. et al *J Agric Food Chem.* **2016**, *64*, 5295-300). Altri studi in corso che si rivolgono a target differenti sono implementati nelle azioni della COST Action CA15135 MuTaLig (www.mutalig.eu).

Conclusioni. L'approccio *in silico* consente di accelerare il processo di identificazione di componenti bioattive presenti in oli essenziali. La chemo-catalogazione, estesa su più campioni ed estratti, può consentire di chiarire i meccanismi di azione di tali preparati, di ottimizzarne le caratteristiche in funzione dell'impiego e del bersaglio terapeutico.

Keywords: *Essential oils, in silico prediction, chemo-catalog, MuTaLig, multi-targeting*

Nuove strategie terapeutiche integrate in oncologia

M. Colone¹, S. Muran¹ e A. Stringaro^{1††}

¹ *Istituto Superiore di Sanità, Centro Nazionale per la Ricerca e la Valutazione Preclinica e Clinica dei Farmaci, Roma, Italia*

Introduzione. Diversi sono i farmaci che derivano da prodotti naturali e che sono utilizzati per applicazione clinica e attualmente molti altri sono stati inseriti in protocolli di sperimentazione clinica. Gli oli essenziali (OE) sono essenzialmente miscele di molecole che appartengono a due distinte famiglie biosintetiche: terpenoidi e fenilpropanoidi. Ad oggi, sono conosciuti approssimativamente 3000 OE, di cui 300 sono presenti in commercio. Queste sostanze da secoli trovano impiego soprattutto per le loro proprietà antimicrobiche, analgesiche, antinfiammatorie, spasmolitiche ed anestetiche locali anche se studi recenti hanno dimostrato che i loro componenti possiedono anche attività antitumorale sia *in vitro* che *in vivo*.

Scopo. Nel corso degli anni l'obiettivo dei nostri studi è stato quello di individuare nuove molecole antitumorali caratterizzate da un'alta selettività nei confronti delle cellule tumorali ed una bassa tossicità nei confronti di quelle normali.

Materiali e Metodi. Nel corso dei nostri studi sono state utilizzate le cellule SKBR3, una linea cellulare tumorale umana isolata per la prima volta nel 1970 da un versamento pleurico in una donna caucasica di 43 anni affetta da un adenocarcinoma della mammella presso il Memorial Sloan-Kettering Cancer Center da G. Trempe e L. J. Old. In questo studio questa linea cellulare è stata fornita dall'American Type Culture Collection (Manassas, Virginia, Usa). Gli effetti di diversi OE sono stati valutati mediante un saggio biochimico colorimetrico: il saggio del composto bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT assay). Inoltre, le indagini condotte mediante microscopia a fluorescenza e microscopia elettronica a scansione (SEM) ed a trasmissione (TEM) hanno permesso di valutare le alterazioni

†† E-mail: annarita.stringaro@iss.it

morfologiche-ultrastrutturali subite dalle cellule SKBR3 dopo trattamento con gli OE per diversi tempi ed a diverse concentrazioni.

Risultati. Il nostro lavoro sperimentale svolto *in vitro* ha dimostrato che tutti gli OE utilizzati sono in grado di ridurre sensibilmente la proliferazione cellulare delle cellule tumorali SKBR3. I risultati hanno dimostrato che gli OE sono in grado di indurre una significativa riduzione della vitalità cellulare in maniera dose-tempo dipendente, causando diversi e variabili danni a livello cellulare e provocando delle importanti alterazioni morfologiche-ultrastrutturali.

Conclusioni. I risultati ottenuti da questi studi indicano che gli OE potrebbero avere buone possibilità di impiego in combinazione con i farmaci convenzionali già usati in clinica. Sono già in corso degli studi per valutare *in vitro* l'efficacia di nuovi trattamenti integrati proprio con lo scopo di aumentare l'attività antitumorale dei farmaci di sintesi.

Keywords: adenocarcinoma mammario umano, oli essenziali, morte cellulare, microscopia elettronica

Studio clinico sul trattamento delle fistole anali trans-sfinteriche idiopatiche con olio essenziale di *Lavandula angustifolia*: risultati intermedi

H.Bouzari, M.Mineccia

*Struttura Complessa di Chirurgia Generale ed Oncologica
Ospedale Mauriziano "Umberto I", Torino, Italia*

Introduzione. Il trattamento chirurgico delle fistole perianali trans-sfinteriche ha come obiettivo primario la guarigione della fistola, ma contestualmente è mandatorio il rispetto delle strutture sfinteriali. L'olio essenziale (OE) di lavanda risulta molto studiato in letteratura scientifica per la sua attività antimicrobica, spasmolitica, antidolorifica, miorelaxante. A nostra conoscenza non vi sono studi clinici che prevedano l'utilizzo degli OE nel trattamento delle ferite di fistole perianali.

Scopo. Valutare l'efficacia terapeutica dell'OE di *Lavandula angustifolia* (L.a.) inteso come capacità di accelerare la guarigione della ferita dopo la chirurgia rispetto al trattamento standard. Gli *endpoints* secondari sono: tollerabilità topica ed eventuali effetti collaterali.

Materiali e metodi. Lo studio complessivamente si proponeva di reclutare 60 pazienti (30 per trattamento con OE e 30 per trattamento standard). Da aprile a dicembre 2015, presso il reparto di Day-Surgery del Dipartimento di Chirurgia Generale ed Oncologica dell'Ospedale Mauriziano Umberto I di Torino, trenta pazienti sono stati sottoposti allo stesso tipo di intervento chirurgico con tecnica "Legation of Intersphincteric Fistula Tract" (LIFT) per una fistola trans-sfinterica e sono stati dimessi nello stesso pomeriggio o il giorno seguente all'intervento. 16 pazienti (braccio A) sono stati trattati con OE di L.a. all'8% in olio vegetale di *Prunus amygdalus dulcis* e 14 pazienti (braccio B) hanno ricevuto un trattamento standard

post-operatorio con soluzione di Dakin. In seguito sono stati visitati e medicati 3 volte/settimana nelle prime due settimane post-operatorie e successivamente 1 volta/settimana fino a guarigione completa. Il *follow-up* medio è stato di 24 settimane. Da gennaio 2016 lo studio è stato temporaneamente sospeso per mancato consenso da parte del comitato etico interaziendale.

Risultati. Tutti i pazienti (gruppo A e B) sono guariti. Nel gruppo A la guarigione completa delle ferite ischio-rettali si è osservata con un tempo medio di 20,5 (14-28) giorni, mentre nel gruppo B il tempo medio è stato di 34,3 (21-42) giorni ($p=0,0003$). Il tasso di recidiva nel gruppo A è stato del 6.2% (1/16) VS 0% del gruppo B ($p= 0,34$). I risultati intermedi dei nostri pazienti del gruppo B, si sovrappongono a quelli della letteratura con tempi medi di guarigione intorno alle 4-5 settimane (34 giorni). Nel gruppo A si è assistito a guarigione completa significativamente più precoce con tempo medio di guarigione di 20 giorni ($p= 0,0003$). L'unica recidiva avvenuta nel gruppo A non rappresenta un dato significativo.

Conclusioni. Il trattamento topico-locale con OE di *L. angustifolia* dopo chirurgia per fistola perianale riduce in modo significativo i tempi di guarigione completa delle ferite ischio-rettali. E' necessario attendere la conclusione dello studio per poter trarre considerazioni riguardo l'efficacia e la sicurezza del trattamento.

Keywords: *Fistola perianale, Olio essenziale, Lavandula angustifolia*

Associazione di oli essenziali e idrolati: Studi *in vitro* per una loro potenziale applicazione in patologie quali le IBS

M. Di Vito^{1-2††}, M.G. Bellardi¹, M. Sanguinetti², I. Palucci², M. Modesto¹, H. De Togni³,
F. Mondello⁴, F. Bugli² & P. Mattarelli¹

¹*Dipartimento di Scienze Agrarie, Università di Bologna, Italia*

²*Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, Italia*

³*Pegaso srl, Verona, Italia*

⁴*Dipartimento di Malattie Infettive, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia*

Introduzione. Numerose evidenze scientifiche mostrano come il microbiota sia in grado di influenzare e mantenere l'omeostasi del sistema immunitario, fungere da barriera per i microrganismi patogeni e supportare l'ospite grazie alla produzione di composti nutrizionali. La variazione della composizione del microbiota, generalmente nota come disbiosi, può compromettere gravemente questa complessa interazione mutualistica e influenzare negativamente la fisiologia dell'ospite alterandone lo stato di salute. Disbiosi intestinali sono strettamente legate ad importanti patologie umane incluso quelle infiammatorie e autoimmuni, come IBD (*Intestinal Bowel Disease*) e IBS (*Intestinal Bowel Syndrome*), metaboliche, come l'obesità e il diabete, e neurologiche. L'IBS è un disordine gastrointestinale associato a dolore addominale, cambiamenti dell'habitat intestinale, manifestazioni ricorrenti/remittenti. Analogamente, l'IBD è associata all'alterazione dell'asse intestino-cervello, nonché a

†† E-mail: wdivit@gmail.com

microbiota e sistema immunitario alterati. Recenti studi mostrano come pazienti con IBD presentano un microbiota differente rispetto ai soggetti sani. In particolare, Sokol et al (2016) descrivono che in pazienti con IBD alcune specie fungine (Ascomycetes, specialmente *Saccharomyces cerevisiae*) diminuiscono in percentuale, mentre altre aumentano (Basidiomycetes, come *Mallasezia sympodialis*). Inoltre, nei soggetti malati, specie appartenenti al genere *Candida* incrementano in percentuale pur non causando patologie infettive.

Scopi. In questo lavoro si è cercato di: (i) Individuare oli essenziali (OE) che siano più attivi su ceppi di *Candida* spp. piuttosto che su ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*; (ii) Valutare gli effetti degli OE selezionati, su ceppi probiotici comunemente usati nelle formulazioni commerciali; (iii) Studiare l'effetto immunomodulante di alcuni idrolati (Id) su polimorfonucleati (PBMC) isolati da donatori sani.

Materiali e Metodi. Per lo studio sono stati usati 7 OE e 4 Id (di composizione nota). Sono stati allestiti esperimenti di micro-brodo diluizione vs 54 ceppi fungini (38 *Candida* spp., 8 *Galactomyces* spp., 4 *S. cerevisiae*) e 7 ceppi probiotici. Lo stesso test, combinato con la conta delle cfu/ml, è stato usato per studiare l'effetto modulante di 4 OE selezionati vs 5 ceppi di *Candida* spp. e 4 di *S. cerevisiae*, e per valutarne l'effetto degli stessi su mix caratterizzati da un ceppo di *C. albicans* e uno di *S. cerevisiae*. Infine, per valutare l'effetto immunomodulante degli Id, concentrazioni scalari (da 1/4 a 1/32) sono state incubate con PBMC ottenuti da due donatori, e i terreni di coltura sono stati analizzati per l'espressione di 4 citochine pro e anti-infiammatorie con test ELISA.

Risultati. I nostri risultati preliminari mostrano che ceppi di *Candida* spp. e *S. cerevisiae* sono ugualmente modulati dagli OE di *Monarda didyma*, *Citrus aurantium* var amara e *C. zeylanicum*. Tra questi, quello di *C. aurantium* var amara, quando usato in sub-MIC e testato su miscele contenenti ceppi appartenenti ad entrambi i generi, è capace di inibire maggiormente *C. albicans* rispetto a *S. cerevisiae*. Inoltre, le concentrazioni attive sui ceppi fungini sono innocue sui ceppi probiotici usati generalmente nelle formulazioni commerciali. Infine, lo studio eseguito con gli Id mostra come quelli di *Vitis vinifera* siano in grado di stimolare maggiormente la produzione di citochine anti-infiammatorie rispetto a quelle pro-infiammatorie.

Conclusioni. I nostri dati preliminari, se confermati, potranno essere di grande interesse nel trattamento di patologie quali l'IBS al fine di ripristinare il corretto equilibrio dei ceppi microbici caratterizzanti il microbiota normale. Ulteriori indagini dovranno essere sviluppate affinché, in futuro, possa essere applicata l'azione antimicrobica degli OE selezionati in associazione con quella immunomodulante degli Id nei trattamenti delle IBS.

Keywords: IBS, *Citrus aurantium*, *Monarda didyma*, *Vitis vinifera*

Etnofarmacia: oli essenziali da usi tradizionali come sostanze attive per uso dermo-cosmetico

Piergiacomo Buso,¹ Anna Baldisserotto,¹ Paola Ziosi,¹ Silvia Vertuani,^{1,4} Matteo Radice,^{2,1} Paco Noriega,^{1,3} Alessandra Guerrini,¹ Gianni Sacchetti,¹ Stefano Manfredini^{1,4§§}

1. Department of Life Sciences and Biotechnology, Master Course in Cosmetic Science and Technology, University of Ferrara, Ferrara, Italy
2. Universidad Estatal Amazónica, Puyo, Pastaza, Ecuador
3. Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad (CIVABI), Universidad Politécnica Salesiana, Wilson, Quito-Ecuador.
4. Ambrosialab Srl, Ferrara, Italy

Introduzione. Gli usi tradizionali sia per finalità mediche che alimentari di piante aromatiche, ricche quindi di olii essenziali, Rappresenta una fonte inesauribile di ispirazione nella scoperta ed applicazione di principi attivi per uso dermo-cosmetico.

Scopi. Il presente lavoro ha avuto come finalità la selezione e studio di piante medicinali aromatiche, utilizzate nella pratica tradizionale (Etno-Farmacia) dal popolo indigeno della foresta amazzonica del sud dell'Ecuador, in un ottica di opportunità di sviluppo sostenibile per le popolazioni locali.

Materiali e Metodi. Per questo lavoro, da un panel di circa 2000 piante presenti presso l'erbario della Università Politecnica Salesiana, sono state selezionate cinque piante, per il loro contenuto in olii essenziali e quindi per l'aroma molto pronunciato: *Siparuna aspera*, *Siparuna macrotepala*, *Piper augustum*, *Piper leticianum* e *Hedychium coronarium*. è stato incentrato sull'ottimizzazione dei processi di estrazione, lo studio dei componenti chimici (HPTLC, GC-MS, RMN) e valutazione della attività biologica (antiossidante, antimicrobica) ed applicazioni in campo cosmetico (anti-foto-ageing).

Resultati. Mentre per *H. coronarium* esiste ampia letteratura di confronto, per *Piper augustum* esiste un unico lavoro condotto in Costa Rica, mentre per i rimanenti tre oli questa risulta la prima indagine ad oggi condotta sulla composizione chimica. Gli oli qui investigati non hanno mostrato attività citotossiche o genotossiche mentre hanno dimostrato interessanti attività antiossidanti ed antimicrobiche. I più promettenti tra questi oli per entrambe le proprietà sono stati inseriti in formulazioni cosmetiche per valutarne il potenziale applicativo, portando ad indicare in almeno uno di questi oli un possibile utilizzo come conservante/preservante naturale.

Conclusioni. Le piante oggetto di questo studio sono state selezionate tra un ampio catalogo tra quelle che non rappresentano un problema per la conservazione della specie, anzi la loro valorizzazione rappresenta un opportunità di sviluppo per le popolazioni locali.

La lavorazione dei campioni è stata condotta sul sito stesso di raccolta, in accordo con i principi di filiera corta e sostenibilità ambientale e sociale. I risultati ottenuti indicano possibili applicazioni nel settore dermo-cosmetico come attivi anti photo age, antimicrobici e possibili conservanti naturali.

Keywords: oli essenziali, dermo-cosmesi, antimicrobici, conservanti

§§ E-mail: mv9@unife.it

Oli essenziali nel settore farmaceutico e cosmetico

F. Corbo¹, A. Rosato¹

¹*Dipartimento di Farmacia-Scienze del Farmaco, Università degli Studi Aldo Moro, Bari, Italia.*

Introduzione. Le proprietà biologiche degli oli essenziali sono ormai largamente documentate da una vasta letteratura che ascrive a queste miscele di composti volatili, azioni sull'uomo, sugli animali e sulle piante. Sono documentate in vitro attività anticancro, antinocicettive, antivirali, antiflogistiche, antiossidanti e soprattutto antimicrobiche. Interessanti risultano le evidenze scientifiche relative a proprietà psicoattive (soprattutto stimolanti o sedative) e neurologiche che ne hanno incrementato l'uso fitoterapico negli ultimi 30 anni.

Scopo della comunicazione è illustrare quali oli essenziali sono riconosciuti ad uso farmaceutico e cosmetico, passando in rassegna le monografie di quelli riportati sia nella Farmacopea Italiana che Europea, ma anche quelli attualmente consentiti, per uso cosmetico, alla luce del recente Regolamento sui Cosmetici che ne regola l'uso.

Gli oli essenziali sono formulati in varie forme farmaceutiche e cosmetiche (in queste ultime a volte usati solo per le proprietà organolettiche o antiossidanti) grazie all'evoluzione nelle tecniche di incapsulamento che li rendono più maneggevoli e ne conservano le componenti volatili. Le formule commerciali sono infinite come le aziende che le producono o che le formulano. A tal proposito saranno presentati alcune formulazioni prodotte da aziende che vantano prodotti di alta qualità e con composizione definita e standardizzata, cercando di fornire una panoramica delle indicazioni terapeutiche e dei campi di applicazione.

Infine saranno presi in esame gli aspetti regolatori del recente regolamento europeo su "Flavors e Fragrance" per valutarne l'impatto sull'uso degli oli essenziali.

Keywords: *Forme farmaceutiche, oli essenziali in farmacopea, applicazioni cosmetiche*

Impiego degli oli essenziali in alimenti e integratori alimentari: riferimenti normativi

M. Guidotti^{1*}**

*Dipartimento Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria
Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia*

E-mail: filomena.corbo@uniba.it

Le sostanze aromatizzanti, quali gli oli essenziali, sono al centro di forti interessi produttivi nel settore alimentare. Queste sostanze vengono utilizzate dall'industria per aromatizzare i prodotti alimentari quali: caramelle, confetteria, formaggi, carni preparate, gelati, bevande analcoliche e alcoliche, succhi di frutta e molti altri prodotti. L'Unione Europea, nel corso degli anni, ha emanato diverse norme per regolare il settore aromi, soprattutto al fine di tutelare la salute del consumatore, vista la presenza di alcune sostanze tossiche sia nelle piante allo stato naturale/originario, sia all'esito dei processi da cui sono ottenuti gli aromi. Il regolamento europeo n. 1334 del 2008, da una parte ha vietato l'uso negli alimenti di alcune sostanze e dall'altra ha fissato dei limiti massimi consentiti per l'utilizzo di talune sostanze nelle miscele aromatizzanti (annex III e V). Una fonte importante cui fare riferimento per monitorare la tossicità di alcune sostanze aromatizzanti impiegate nel settore alimentare sono i rapporti dell'EFSA (European Food Safety Agency) e del JEFCA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) in cui si riportano le valutazioni di tossicità di un numero elevato di classi di sostanze aromatizzanti. Negli ultimi anni poi è stata pubblicata una lista di aromi ammessi negli alimenti, riportata nella tabella 1 del regolamento europeo n. 872 del 2012 inoltre, si è provveduto a modificare la tabella 1 del suddetto regolamento n. 1334 del 2008 (vedi regolamenti 545/2013 e 985/2013). La Commissione Europea procede a continue revisioni dei propri regolamenti e della documentazione tecnica su cui si basano le diverse disposizioni emanate a tutela della salute e alla base di tale revisione vi sono le evidenze scientifiche delle due importanti agenzie che operano sulla valutazione del rischio delle sostanze aromatizzanti.

Keywords: oli essenziali, alimenti, normativa

Oli essenziali e idrolati: potenzialità antimicrobiche in ambito alimentare

Annalisa Serio*^{†††}, Clemencia Chaves López, Chiara Rossi, Serena D'Amato, Antonello Paparella

Facoltà di Bioscienze e Tecnologie Agro-alimentari e Ambientali, Università degli Studi di Teramo, Teramo, Italia

Introduzione. Per l'industria alimentare è fondamentale garantire la sicurezza dei prodotti e una shelf-life quanto più possibile estesa. Numerose sono le tecnologie di conservazione a disposizione, ma diventa sempre più necessario confrontarsi con le richieste dei consumatori, la cui preferenza si indirizza sempre più verso prodotti affidabili e "naturali". Di conseguenza, la potenziale applicazione di conservanti di origine vegetale, come oli essenziali e idrolati, stimola l'interesse delle aziende della ricerca.

Scopi. L'obiettivo della ricerca riguarda la valutazione dell'effetto di oli essenziali e idrolati su microrganismi patogeni o alteranti di interesse alimentare, partendo da studi *in vitro*, fino a considerarne l'applicabilità su prodotti alimentari.

^{†††} E-mail: aserio@unite.it

Materiali e Metodi. Generalmente la valutazione dell'efficacia antimicrobica viene effettuata *in vitro* mediante metodi come il *Disk Diffusion Assay* o la determinazione della *Minimal Inhibitory Concentration* (MIC). Più complessa è la valutazione *in situ*, direttamente nelle formulazioni alimentari, perché le matrici sono spesso disomogenee e gli oli essenziali necessitano di un emulsionante. Gli oli possono essere incapsulati oppure inclusi in film polimerici o ancora essere associati ad altre sostanze di origine naturale come chitosano, proteine del siero o amido, per facilitarne l'applicazione e la persistenza.

Risultati. Numerosi studi *in vitro* confermano l'efficacia antimicrobica di oli essenziali e, in misura minore di idrolati, su microrganismi sia patogeni che alteranti. Le dinamiche di inattivazione distinguono azioni battericide o batteriostatiche, in funzione del tipo di olio essenziale e della concentrazione applicata. In generale, gli oli essenziali più efficaci nei confronti di microrganismi (in particolare batteri Gram positivi) di interesse alimentare, risultano quelli ad elevato contenuto in carvacrolo, come quelli estratti da specie dei generi *Thymus* e *Origanum*. Per ottenere un'efficacia equiparabile, le applicazioni sugli alimenti comportano la necessità di incrementare fino a 100-1000 volte le concentrazioni impiegate *in vitro*, a causa di interazioni con la matrice. Tali concentrazioni spesso sono inconciliabili con le caratteristiche qualitative e sensoriali del prodotto alimentare. L'impiego in forma incapsulata o in formulazione con altri agenti antimicrobici, invece, rappresenta una valida strategia per contenere lo sviluppo microbico, con un minimo impatto sulle proprietà sensoriali. Buoni risultati sono stati ottenuti in particolare su carni fresche, prodotti a base di carne, alimenti ittici e vegetali. Pochi risultati sono disponibili sull'efficacia degli idrolati *in situ*, essendo tradizionalmente impiegati in ambito cosmetico o fitoterapico.

Conclusioni. La ricerca relativa all'impiego di oli essenziali come conservanti naturali in ambito alimentare sta fornendo risultati sempre più interessanti, sia in merito all'efficacia che alle diverse modalità di impiego, dimostrandone le concrete potenzialità applicative. I dati relativi agli idrolati richiedono invece ulteriori approfondimenti.

Keywords: oli essenziali, alimenti, sicurezza, idrolati

Strategie basate sull'uso di oli essenziali per il miglioramento della conservazione della frutta fresca e la prevenzione degli sprechi alimentari

G. Romanazzi^{*}, A. Servili, E. Feliziani**

Università Politecnica delle Marche, Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali, Via Breccie Bianche, 60131 Ancona, Italy

Introduzione. I prodotti ortofrutticoli freschi sono soggetti a rilevanti perdite in postraccolta a causa di attacchi di funghi fitopatogeni, che determinano rilevanti sprechi alimentari poiché interessano non solo il frutto infetto, ma si possono estendere all'intero contenitore per il fenomeno del cosiddetto "nesting". Pertanto, è necessario metter a punto strategie basate su

^{***} E-mail: g.romanazzi@univpm.it

sostanze con attività antimicrobica a basso impatto ambientale, in grado di proteggere i prodotti ortofrutticoli senza indurre fitotossicità ed alterarne le caratteristiche organolettiche.

Scopi. La ricerca ha avuto l'obiettivo di verificare l'efficacia di oli essenziali in forma di vapore nel contenimento delle infezioni di muffa grigia (*Botrytis cinerea*) su uva da tavola in postraccolta. Inoltre, è stata valutata mediante panel test la percezione del consumatore della presenza di oli essenziali.

Materiali e Metodi. Grappoli d'uva della varietà 'Italia' sono stati esposti a vapori di oli essenziali di *Rosmarinus officinalis* (rosmarino), *Mentha piperita* (menta piperita), e *Thymus vulgaris* (timo), a pressione atmosferica o in ambiente ipobarico (0,5 atm), per 24 ore. Di seguito, i grappoletti sono stati conservati a temperatura ambiente, oppure frigoconservati per una settimana a 4°C, quindi esposti a *shelf life* a 20°C. Inoltre, bacche di uva da tavola esposte per 24 ore a vapori di rosmarino, menta e lavanda (*Lavandula × hybrida*), quest'ultima usata come riferimento per il suo forte aroma, sono stati somministrati ad un panel di potenziali consumatori subito dopo il trattamento e dopo 24 e 48 ore.

Risultati. I vapori di rosmarino hanno ridotto l'incidenza, la gravità e l'indice di McKinney della muffa grigia su uva da tavola esposta per 24 ore e poi tenuta a temperatura ambiente. Quando lo stesso trattamento è stato applicato in ambiente ipobarico, oltre al rosmarino anche la menta ha significativamente ridotto la muffa grigia. Il rosmarino ha confermato la sua efficacia anche quando l'uva è stata frigoconservata e poi esposta a *shelf life*. Il panel test ha evidenziato una percezione dell'aroma di oli essenziali subito dopo il trattamento con rosmarino e menta e a distanza di 24 ore, sia su uva conservata a temperatura ambiente che frigoconservata, mentre a 48 ore di distanza dal trattamento il solo olio essenziale di lavanda è risultato percettibile.

Conclusioni. L'applicazione dell'olio essenziale di rosmarino ha ridotto le infezioni di muffa grigia sviluppatesi da inoculo naturalmente presente sulle bacche sia a pressione atmosferica sia in ambiente ipobarico, anche dopo frigoconservazione, che risulta la pratica usuale su uva da tavola. Su uva tenuta a temperatura ambiente, anche l'olio essenziale di menta ha mostrato una certa attività, mentre l'olio essenziale di timo non è risultato efficace in alcuna delle condizioni testate, evidenziando una più bassa volatilità. È necessario attendere almeno 48 ore dall'esposizione prima di proporre l'uva trattata con olio essenziale di timo e menta al consumatore.

Keywords: *essential oils, mint, postharvest decay, rosemary*

Oli essenziali in medicina veterinaria: saggi di alcuni oli essenziali e di una miscela nei confronti di ceppi di *Escherichia coli* multiresistenti

M. Scozzoli^{1§§§}, L. Antonelli², G. Tosi², P. Massi², L. Fiorentini²

¹ *Medico Veterinario, Centro Sperimentale APA-CT, Forlì (FC) Italy*

² *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna - Sezione Diagnostica di Forlì, Italy*

§§§ E-mail: maurizio@apabio.it

Introduzione. L'antibioticoresistenza è un fenomeno biologico naturale che si verifica per l'emergenza e la diffusione di fattori di resistenza batterica agli antibiotici ed è innescata ed amplificata dalla pressione selettiva esercitata sulle popolazioni microbiche attraverso l'uso di questi farmaci. L'utilizzazione inadeguata di antimicrobici terapeutici in medicina umana e veterinaria, l'impiego di queste molecole per fini non terapeutici (la cosiddetta "chemioprolifassi antibiotica") e l'inquinamento ambientale da antimicrobici accelerano la comparsa e la propagazione di microrganismi resistenti. Le maggiori criticità al momento riguardano i ceppi di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistenti (MRSA), i ceppi di enterococchi vancomicina-resistenti (VRE) e i ceppi batterici Gram negativi (in particolare *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*) produttori di beta-lattamasi ad ampio spettro (ESBL/AmpC). Il settore zootecnico è particolarmente coinvolto dal problema. L'Unione Europea e le autorità sanitarie nazionali hanno deciso di fronteggiare il problema attraverso misure restrittive ma soprattutto incentivando un impiego "prudente e ragionato" dell'utilizzo degli antibiotici. E' inoltre necessario implementare le misure di biosicurezza e, laddove possibile, di profilassi immunizzante nonché il ricorso a prodotti alternativi.

Scopi. L'obiettivo del presente lavoro è stato lo studio in vitro degli effetti di alcuni oli essenziali su ceppi di *Escherichia coli* multiresistenti. Si sono anche indagati gli eventuali effetti sinergici tra i singoli oli essenziali e la miscela di oli essenziali e tra queste ultime e alcuni antibiotici.

Materiali e Metodi. Nel presente lavoro è stata valutata, mediante la metodica di micro-brodo diluizione in piastre microtiter da 96 pozzetti, la minima concentrazione inibente (MIC) di alcuni oli essenziali ("Origano di Spagna" o *Coridotymus capitatus*, "Cajeput" o *Melaleuca leucadendron*, "Eucalipto" o *Eucalyptus globulus*) e di una miscela di oli essenziali nei confronti di una serie di ceppi di *Escherichia coli*. La prova è stata condotta su ceppi di campo multi-resistenti agli antibiotici isolati dalla specie suina e da specie avicole allevate (pollo, tacchino). E' stata inoltre indagata la MIC nelle varie combinazioni di oli essenziali e antibiotici e valutati gli eventuali effetti additivi, sinergici e antagonisti (F.I.C. e F.I.C. index).

Resultati. I ceppi di *Escherichia coli* multi-resistenti hanno manifestato sensibilità agli oli essenziali testati singolarmente e in miscela. Si sono evidenziate interessanti azioni additive e sinergiche tra i singoli oli essenziali, le miscele e gli antibiotici.

Conclusioni. Questo studio preliminare, tuttora in corso, necessita di ulteriori approfondimenti ma apre il campo al possibile impiego degli oli essenziali nell'ambito della medicina veterinaria. Gli oli essenziali possono essere uno strumento per ridurre l'impiego degli antibiotici, potenziarne l'efficacia e contribuire alla riduzione dei rischi di farmacoresistenza.