

ABSTRACT

Negli ultimi dieci anni si è osservato un ritorno allo studio di piante officinali per cercare di scoprire nuove molecole con attività farmacologica, rivolgendo particolare interesse agli antiossidanti, ad esempio, che sono stati proposti come ingredienti funzionali per le formulazioni anti-età, con lo scopo di prevenire e modulare il danno ossidativo sistemico e cutaneo.

Il nostro gruppo di ricerca, coordinato dal Prof. Manfredini, da anni si occupa dello studio e della valorizzazione di principi attivi di origine naturale noti in letteratura per possedere capacità curative, al fine di modificarli chimicamente e valutarne le relazioni struttura-attività.

Il presente progetto di ricerca in particolare rientra in un progetto più ampio, NTF (Non Timber Forest), e si pone l'obiettivo di sviluppare materie prime sostenibili puntando sulle filiere locali corte; oltretutto, i composti naturali studiati, in collaborazione con aziende esterne, sono stati isolati da prodotti di scarto di diversa origine.

Le molecole in questione sono Verbascoside (da colture cellulare di *Buddleja davidii*), Florizina, Rutina e Salicina che vengono descritte in letteratura per le molteplici capacità benefiche (antiossidante, antiinfiammatoria, antimicrobica ecc.).

Nonostante le diverse attività dimostrate, essendo sostanze molto idrofiliche, risultano difficili da utilizzare in vivo per via del ridotto assorbimento nonché per l'inserimento nelle diverse formulazioni farmaceutiche.

Per questo ci si è posti l'obiettivo di aumentarne la lipofilia, mediante l'ausilio di gruppi lipofili che vanno ad esterificare i molteplici ossidrili presenti in queste strutture, lasciando però libera la componente fenolica (farmacoforo). Ottenuti i derivati semisintetici, è stata indagata la relazione struttura-attività tra il composto naturale ed il suo derivato semisintetico; in particolare è stata valutata la capacità antiossidante, antimicotica, la stabilità in formulazione. Inoltre in collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. Gambari abbiamo valutato la capacità antinfiammatoria della Florizina e del derivato di semisintesi (F2). Invece, in collaborazione con il Prof. Valacchi abbiamo studiato l'attività del Verbascoside della Florizina e, dei loro rispettivi derivati di semisintesi, nel processo del wound healing cutaneo.

INDICE

1_INTRODUZIONE	6
1.1 I Polifenoli	6
2_SCOPO	17
3_VERBASCOSIDE	18
3.1 La molecola	18
3.2 Risultati e discussioni	21
3.2.1 Tecnologie IRB per la produzione di Verbascoside	21
3.2.2 Sintesi del derivato del verbascoside	22
3.2.3 Coefficiente di ripartizione ottanolo-H ₂ O	23
3.2.4 Analisi antiossidanti	23
3.2.4.1 Analisi ORAC	23
3.2.4.2 Analisi PCL	25
3.2.5. Stabilità in formulazioni dermocosmetiche	27
3.2.6 Attività antifungina	28
3.2.7 Wound Healing	30
3.2.7.1 Vitalità e citossicità cellulare	31
3.2.7.2 Wound healing in vitro	32
3.2.7.3 Wound healing in vivo	34
4_FLORIZINA	36
4.1 La molecola	36
4.2 Risultati e discussioni	37
4.2.1 Sintesi del derivato della Florizina	37
4.2.2 Coefficiente di ripartizione ottanolo-H ₂ O	38
4.2.3 Analisi antiossidanti	39
4.2.3.1 Analisi ORAC	39
4.2.3.2 Analisi PCL	39
4.2.4 Stabilità in formulazioni dermocosmetiche	41
4.2.5 Attività antifungina	42
4.2.6 Attività antinfiammatoria (Fibrosi Cistica)	42
4.2.7 Wound Healing	48

4.2.7.1 Vitalità e citossicità cellulare	48
4.2.7.2 Wound healing in vitro	49
4.2.7.3 Wound healing in vivo	50
5_RUTINA	52
5.1 La molecola	52
5.2 Risultati e discussioni	53
5.2.1 Sintesi del derivato della Rutina	53
5.2.2 Coefficiente di ripartizione ottanolo-H ₂ O	54
5.2.3 Analisi antiossidanti	55
5.2.3.1 Analisi ORAC	55
5.2.3.2 Analisi PCL	55
5.2.4 Stabilità in formulazioni dermocosmetiche	56
5.2.5 Attività antifungina	58
6_SALICINA	59
6.1 La molecola	59
6.2 Risultati e discussioni	61
6.2.1 Sintesi del derivato della Salicina	61
6.2.2 Coefficiente di ripartizione ottanolo-H ₂ O	66
6.2.3 Analisi antiossidanti	67
6.2.3.1 Analisi ORAC	67
6.2.3.2 Analisi PCL	67
6.2.5 Attività antifungina	67
7_PARTE SPERIMENTALE	69
7.1 Materiali e metodi	69
7.2 Procedure sintetiche generali	70
7.2.1 Sintesi del verbascoside Nanopropionato (ES1)	70
7.2.2 Sintesi del derivato pentapropionato (VPP)	70
7.2.3 Sintesi della Florizina Eptapropionata (F1)	71
7.2.4 Sintesi della Florizina Tetrapropionata (F2)	71
7.2.5 Sintesi della Rutina Decapropionata (R1)	71
7.2.6 Sintesi della Rutina Sestapropionata (R2)	72
7.2.7 Sintesi della Salicina Pentapropionata (S1)	72

7.2.8 Sintesi della Salicina Tetrapropionata (S2)	73
7.3 Coefficiente di ripartizione ottanolo/Acqua	73
7.4 Analisi antiossidanti	74
7.4.1 Metodica PCL (Protocollo ACL)	74
7.4.2 Metodica PCL (protocollo ACW)	74
7.4.3 Metodica ORAC	75
7.5 Studi di stabilità	75
7.5.1 Matrici cosmetiche	75
7.5.2 Metodiche HPLC	76
7.6 Valutazione dell'attività antimicotica	77
7.6.1 Preparazione del terreno di coltura e crescita dei miceti	77
7.6.2 Preparazione del terreno trattato	77
7.6.3 Trasporto e trapianto dei funghi	78
7.6.4 Osservazioni e misure	78
7.7 Infiammazione	78
7.7.1 Modello cellulare IB3-1	78
7.7.2 Trattamento delle cellule IB3-1	79
7.7.3 Attività antiproliferativa	80
7.7.4 Estrazione dell'RNA totale	80
7.7.5 Analisi qualitativa e quantitativa dell'RNA estratto	81
7.7.6 Retrotrascrizione	81
7.7.7 Real Time Q-PCR	82
7.8 Wound healing	83
7.8.1 Colture cellulari	83
7.8.2 Trattamento con i composti	83
7.8.3 Vitalità cellulare	83
7.8.4 Conta cellulare	84
7.8.5 Wound healing in vitro	84
7.8.6 Animali	84
7.8.7 Wound healing in vivo	85
8 CONCLUSIONI	86
9 BIBLIOGRAFIA	89
10 LAVORI PUBBLICATI DURANTE IL DOTTORATO	97

ABBREVIAZIONI

ISC: Complessi ferro-zolfo

PLA2: Fosfolipasi A2

NF-KB: Fattore di trascrizione

TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α

CDK: Chinasi ciclina dipendenti

LPS: Lipopolisaccaride

4-DMAP: 4-dimetilaminopiridina

TEA: N,N,N-trietilamina

VPP: Verbascoside Pentapropionato

ES1: Verbascoside Nonapropionato

F1: Florizina Eptapropionata

F2: Florizina Tetrapropionata

R1: Rutina Decapropionata

R2: Rutina Sestapropionata

S1: Salicina Pentapropionata

S2: Salicina Tetrapropionata

PCL: Foto chemiluminescenza

ORAC: Oxygen Radical Adsorbance Capacity

AAPH: 2,2'-azobis-(2-amidinopropano)-cloridrato

CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator

FC: Fibrosi Cistica

AP-1: Proteina Attivatrice-1

PGE2: Prostaglandina E2

IB3-1: Cellule bronchiali di FC

LDH: Enzima lattato deidrogenasi

BHT: Butilidrossitoluene

HDL: High Density Lipoprotein

LDL: Low Density Lipoprotein

1_INTRODUZIONE

1.1 I Polifenoli

I polifenoli naturali costituiscono il gruppo di composti antiossidanti più abbondanti nella dieta umana. Questa classe di molecole, che presenta più di 8000 varianti strutturali, comprende vari metaboliti secondari di piante caratterizzati dalla presenza di anelli aromatici con una o più funzionalità fenoliche. Sono in genere suddivisi in gruppi diversi in base al numero di cicli aromatici ed agli elementi strutturali ad essi legati (figura 1.9) e si dividono in:

- 1) **acidi fenolici** di cui fanno parte gli acidi benzoici come l'acido gallico e gli acidi idrossicinnamici come l'acido caffeico, ferulico o cumarico
- 2) **flavonoidi** che includono in antocianidine, Flavanolo (flavan 3-olo), Flavandiolo (Flavan 3,4diolo), Flavanone (Flavanone 3-olo), Flavanonolo, Flavone, Isoflavone, Flavonolo (Flavone 3-olo) e Calcone. flavonoli, flavoni, isoflavoni, flavanoni, antociani e flavanoli
- 3) **polifenoli a struttura non-flavonoica** come gli stilbeni il cui rappresentante più conosciuto è sicuramente il *trans*-resveratrolo.

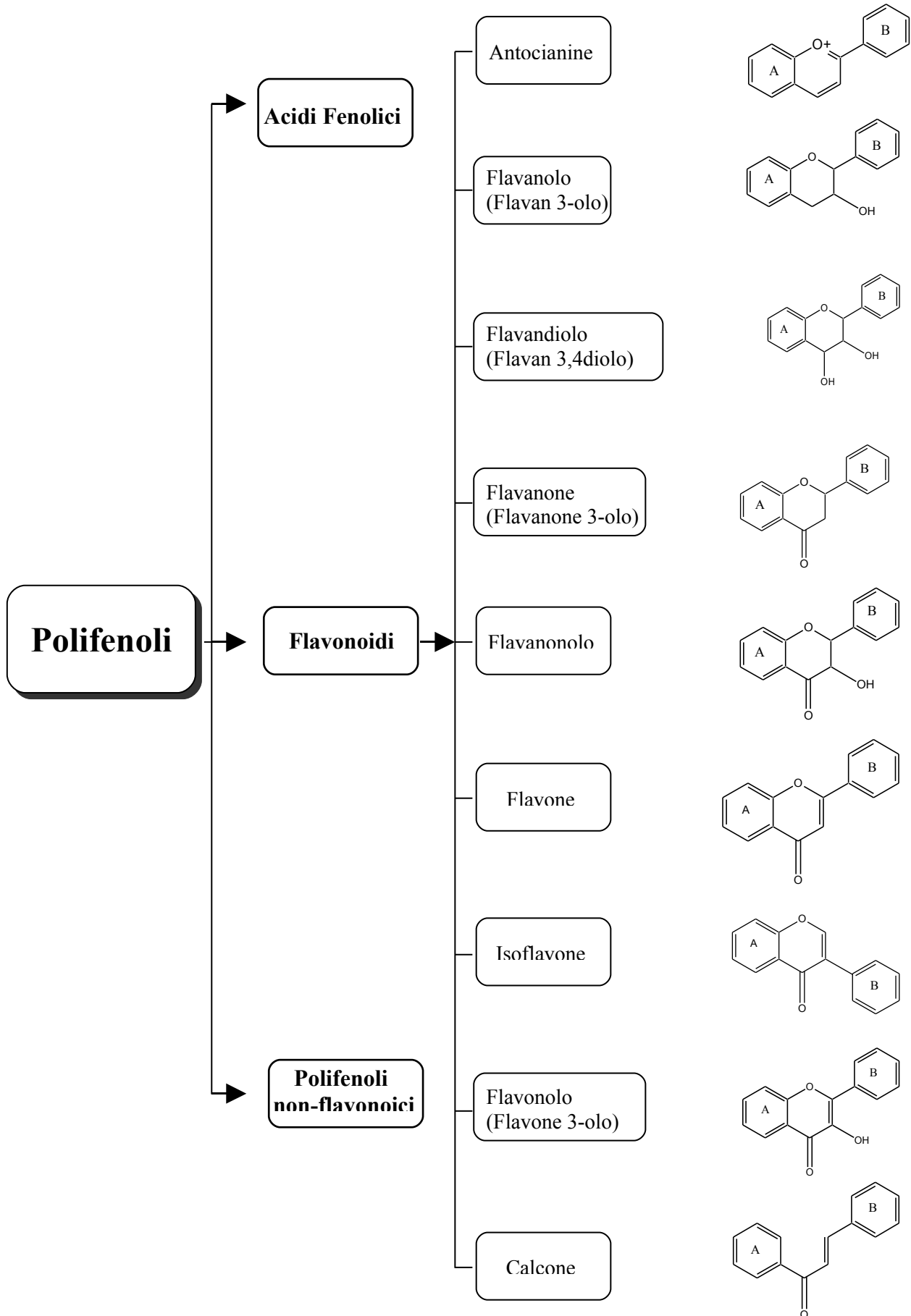


Figura 1: Classificazione dei polifenoli naturali. I FLAVONOIDI in particolare sono caratterizzati da gruppi fenolici presenti nei due anelli aromatici, A e B, legati tra di loro da un eterociclo C. Il termine è stato introdotto nel 1952 da GEISSMAN e HINREINER. La radice flavone significa giallo in latino. L'espressione composti flavonoidi indica generalmente l'intera classe dei fenoli vegetali, che hanno struttura C6-C3-C6, che significa due anelli aromatici legati da una catena di 3 atomi di carbonio (o anello).

I polifenoli sono caratterizzati da una struttura chimica ideale per l'attività radical-scavenger ed è stato dimostrato che questi tipi di molecole svolgono un'attività antiossidante maggiore *in vitro* rispetto alle vitamine C ed E¹. La caratteristica strutturale responsabile della loro azione antiossidante, e quindi radical-scavenger, è appunto la presenza del gruppo ossidrilico di tipo fenolico. Infatti queste molecole sono in grado di donare l'atomo di idrogeno presente nell'OH fenolico ai radicali liberi interrompendo così la propagazione delle reazioni a catena tipiche dei processi ossidativi. La presenza di un secondo ossidrilico in posizione *orto*, presente nelle strutture catecoliche, comporta una diminuzione dell'entalpia di dissociazione del legame OH in questo modo sono ulteriormente facilitate le reazioni di trasferimento di idruri². Inoltre l'efficacia di questi composti è dovuta principalmente alla loro capacità di delocalizzare l'elettrone spaiato del radicale fenolico nell'anello aromatico ed alla possibile chelazione dei metalli di transizione¹.

Le informazioni sull'assorbimento, sulla distribuzione e sul metabolismo di queste molecole sono ad oggi ancora incomplete.

Molti polifenoli vengono assorbiti a livello intestinale come tali oppure in forme modificate; ad esempio alcuni composti esterificati o glicosilati non possono essere assorbiti come tali ma devono per forza essere idrolizzati da enzimi intestinali o dalla microflora batterica a livello del colon. Tali molecole vengono in un secondo momento vengono metabolizzate dando origine a prodotti che mantengono solo parzialmente la capacità antiossidante dei composti iniziali ed infine escrete. Le reazioni di glucurono-coniugazione, solfatazione e metilazione rappresentano in generale le principali modificazioni cui vengono sottoposti i polifenoli durante il metabolismo ed avvengono tutte nell'intestino, fegato e reni ad opera di enzimi specifici: rispettivamente UDP-glucuronosil transferasi, Solfono transferasi e Catecol-*o*-metil transferasi. La frazione di polifenoli che non viene assorbita, invece, rimane presente all'interno di tutto il tratto digestivo dove può esplicare la sua azione antiossidante nei confronti di vari radicali liberi presenti nell'apparato gastrointestinale³.

Le attività dei polifenoli riportate in letteratura possono essere molteplici, di seguito vogliamo ricordare alcune patologie nelle quali è possibile utilizzare i polifenoli per diminuire il decorso della malattia:

1_STRESS OSSIDATIVO

Lo stress ossidativo è la conseguenza diretta dell'azione dannosa esercitata da quantità elevatissime di radicali liberi sulle cellule e sui tessuti del nostro organismo.

I radicali liberi sono atomi o raggruppamenti di atomi che possono reagire con qualsiasi macromolecola organica presente nella cellula, portando a conseguenze dannose come alterazioni

funzionali e strutturali che si traducono nella morte cellulare. Il danno è causato dal fatto che sono molecole molto reattive che si stabilizzano, perdendo la potenziale lesività, solo quando riescono a strappare tali particelle dalle molecole con cui vengono a contatto (azione ossidante).

Una quota di radicali liberi viene prodotta naturalmente nell'organismo per effetto del metabolismo cellulare, tuttavia se i livelli di queste molecole si alzano possono costituire una seria minaccia per l'integrità delle cellule. I radicali pericolosi per l'organismo vengono classificati in specie reattive dell'ossigeno, definiti ROS (Reactive Oxygen Species) e specie reattive dell'azoto, RNS (Reactive Nitrogen Species). Tra questi ultimi, i composti di maggiore interesse sono l'ossido nitrico ed il perossinitrito; il primo viene prodotto dagli enzimi NO sintetasi che nell'uomo ne esistono di tre tipi: NO sintetasi neuronale (nNOS) presente nei neuroni e nel muscolo scheletrico, NO sintetasi inducibile (iNOS) nel sistema cardiovascolare e nelle cellule del sistema immunitario e NO sintetasi endoteliale (eNOS), presente nell'endotelio. L'ossido nitrico fisiologicamente è un neurotrasmettitore coinvolto nella risposta immunitaria ed un potente vasodilatatore. D'altro canto, il perossinitrito (ONOO-) può danneggiare lipidi, proteine e DNA, e si forma dalla reazione tra ossido nitrico e ione superossido, dove viene convertito in HNO₂ dalle perossiredossine presenti nel citosol e nei mitocondri.

I ROS sono i radicali liberi a maggior diffusione e vengono suddivisi in radicali liberi dell'ossigeno quali l'anione superossido (O₂⁻) ed il radicale ossidrilico (•OH) e specie con carica netta nulla come il perossido d'idrogeno (H₂O₂). Il superossido è carico negativamente, rispetto agli altri radicali ha un'emivita relativamente lunga ed è in grado di reagire con più substrati al fine di completare i propri orbitali; viene prodotto per primo nelle reazioni biochimiche che portano alla riduzione dell'ossigeno, infatti la sua formazione può avvenire attraverso vie differenti:

- Durante le reazioni di ossido-riduzione tra coenzima Q e citocromi nella fosforilazione ossidativa, in particolar modo quando questo processo funziona a regimi elevati, può succedere che degli elettroni sfuggano alla catena respiratoria ed interagiscano con l'O₂;
- Nel corso di ossidazioni metallo-dipendenti di composti tiolici o catecolici come adrenalina e noradrenalina;
- Per reazioni enzimatiche specifiche, con l'ausilio di catalizzatori quali xantine ossidasi, triptofano diossigenasi o indolamine diossigenasi.

In ogni caso, la maggior parte degli anioni superossido prodotti al livello cellulare deriva da meccanismi di difesa che il processo infiammatorio applica nei confronti di microrganismi potenzialmente dannosi⁴.

Il perossido d'idrogeno è una molecola reattiva ma al contempo relativamente stabile, capace di attraversare la membrana cellulare e dotata di facoltà citotossica ma scarsamente abile nell'ossidazione. La tossicità risiede nel fatto che è in grado di produrre radicali idrossilici mediante reazioni catalizzate da metalli (1).



La produzione di H_2O_2 avviene in seguito a reazioni enzimatiche in perossisomi, microsomi e mitocondri oppure per dismutazione dell'anione superossido catalizzata dall'enzima Superossido Dismutasi (SOD).

Infine si è citato il radicale ossidrilico che è il ROS più reattivo; viene sintetizzato a partire dal perossido d'idrogeno, nei leucociti, per distruggere i patogeni ma se in eccesso provoca danni alla membrana plasmatica, alle proteine e agli acidi nucleici. E' generalmente prodotto dall'idrolisi dell'acqua dovuta a radiazioni, oppure dalla reazione di Fenton che utilizza perossido d'idrogeno come reagente e lo ione ferroso Fe^{2+} quale catalizzatore. Viene inattivato per conversione in H_2O da parte della glutazione perossidasi.

Sia che si parli di ROS o RNS, la produzione di radicali liberi può derivare da cause esterne o interne all'organismo: tra le cause esterne all'organismo, ricordiamo alcuni agenti fisici (es. le radiazioni ultraviolette), numerosi agenti chimici (es. idrocarburi, diserbanti, contaminanti alimentari, farmaci) e taluni agenti infettivi (es. virus e batteri) mentre, tra le cause interne sono da citare l'accelerazione esagerata del metabolismo cellulare (quale si verifica, per esempio, dopo uno sforzo fisico intenso e protratto, senza adeguato allenamento) e numerose malattie (es. obesità, diabete ecc.). In condizioni di buona salute, il nostro organismo riesce a prevenire il danno da radicali liberi grazie a dei sistemi di difesa, indicati con il termine di antiossidanti, che possono essere endogeni⁵, quindi prodotti all'interno del corpo, o esogeni se forniti dalla dieta o dall'utilizzo di integratori in svariate formulazioni. Gli antiossidanti endogeni vengono classificati in enzimatici (o primari) e non enzimatici (anche detti secondari).

a) Gli Antiossidanti primari sono una classe eterogenea di molecole che catalizzano reazioni atte a trasformare queste specie reattive in composti innocui alla cellula (figura 2).

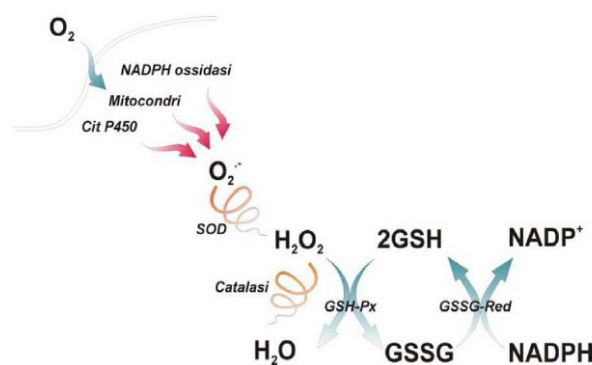


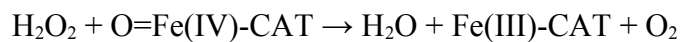
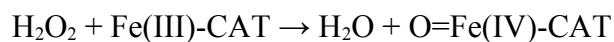
Figura 2 : Principali difese antiossidanti enzimatiche. SOD (superossido dismutasi); GSH-Px (glutazione perossidasi); GSSG-Red (Glutazione Redattasi); Catalasi

Nello specifico, la SOD rappresenta la prima difesa nei confronti dei ROS, in particolar modo sul radicale superossido. Questo enzima, che nei mammiferi esiste in 3 isoforme (SOD-1, SOD-2 e SOD-3), catalizza la reazione di dismutazione del superossido in perossido di idrogeno e ossigeno molecolare (2).



Con la dismutazione avvengono contemporaneamente due reazioni opposte, un'ossidazione e una riduzione, su due molecole uguali. L'enzima SOD agendo al livello dei due radicali superossido, strappa via l'elettrone in più dal primo e lo trasferisce al secondo. In questo modo una delle due molecole si ritrova con un elettrone in meno e quindi diventa ossigeno molecolare O_2 , l'altra, invece, con un elettrone in più e, dopo aver legato due ioni H^+ , diventa H_2O_2 , anch'esso nocivo. La produzione di perossido d'idrogeno attiva altri enzimi che si occupano di dismutarlo al fine di detossificare la cellula, ovvero:

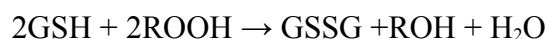
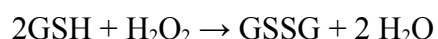
- Le catalasi, sono tra gli enzimi più veloci che si conoscono, infatti ognuna di esse può decomporre milioni di molecole di H_2O_2 al secondo. L'enzima è composto da quattro subunità identiche, ognuna col proprio sito attivo di natura porfirinica; il processo che catalizza si svolge in due step:



La reazione netta risultante è quindi: $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

Siccome le catalasi devono distruggere molecole molto reattive, sono anche enzimi insolitamente stabili.

- La GlutathionePerossidasi (GPX), di cui nei mammiferi sono state identificate cinque isoforme (GPX-1-GPX-5) che differiscono tra di loro per localizzazione cellulare e tissutale; si tratta di enzimi selenio-dipendenti che convertono H_2O_2 o gli idroperossidi organici ad acqua o alcoli (ROH) attraverso l'ossidazione di glutathione ridotto (GSH). Di seguito viene riportata la reazione di dismutazione del H_2O_2 e degli idroperossidi organici:



- Altri enzimi coinvolti nella detossificazione di substrati ossidati sono: Glutathione-S-Transferasi (GST-transferasi) che catalizza la coniugazione del GSH direttamente ai

substrati ossidati che vengono poi eliminati dall'organismo e la tioredoxina-1 (Trx-1), una piccola proteina di 105 aminoacidi molto conservata; nel suo sito catalitico si trovano due residui di cisteina capaci di ridurre i ponti disolfuro (S-S) su altre proteine che sono state bersaglio dell'azione dei radicali liberi dell'ossigeno.

b) Gli Antiossidanti non enzimatici hanno la funzione di implementare le difese antiossidanti ripristinando, per esempio, il pool dei tioli oltre ad agire di per sè come scavenger dei radicali liberi. Di questa classe fanno parte il GSH, che è sia un substrato per le GPX e le GST, ma può anche agire direttamente da scavenger durante i processi di detossificazione del perossido di idrogeno e degli idroperossidi lipidici. C'è poi il coenzima Q che svolge la sua azione a livello della catena mitocondriale del trasporto degli elettroni. Anche le vitamine A, E, C sono considerate antiossidanti non enzimatici e vengono assunte con la dieta.

Vero è, quindi, che nel nostro organismo esiste un delicato equilibrio fra produzione (esterna o interna) e "smaltimento" dei radicali liberi, ma la rottura di questo provoca l'insorgenza di lesioni cellulari che, se gravi e protratte nel tempo, conducono ad un accelerazione del processo dell'invecchiamento e all'insorgenza di numerose malattie degenerative⁶.

Per questo motivo negli anni si è data notevole importanza alla ricerca di molecole che avessero capacità antiossidante.

2_AUTISMO

L'autismo è un complesso disturbo neuro-evolutivo caratterizzato da un disagio sociale spesso dovuto all'incapacità dei soggetti di comunicare con il mondo "esterno", inoltre nei pazienti si evidenziano dei comportamenti ripetitivi e stereotipati. La diagnosi, che avviene al massimo all'età di 3 anni, si basa solo su aspetti clinici e al momento non ci sono biomarcatori utilizzati per la diagnosi e/o ai fini dello screening precoce⁷. L'eziopatogenesi di questa patologia non è ancora del tutto chiara, sembra che siano coinvolti più fattori come: una familiarità genetica, alterazioni immunologiche e fattori ambientali⁸. Inoltre è stato suggerito che lo stress ossidativo può giocare un ruolo nella patogenesi dell'Autismo⁹⁻¹⁰⁻¹¹, questo perché la produzione eccessiva di ROS induce la secrezione di numerose molecole vasoattive e pro-infiammatorie¹² che portano ad un processo di neuroinfiammazione⁸. In letteratura questo fenomeno viene considerato la causa di altri disordini mentali, compresa la schizofrenia e disturbo bipolare¹³⁻¹⁴⁻¹⁵ e le patologie neurodegenerative quali il morbo di Alzheimer¹⁶. I ROS aumentano la produzione di specie pro-ossidanti diminuendo le difese antiossidanti; infatti lo stato ridotto del glutatione nei pazienti affetti da autismo è ridotto, questo fenomeno è stato evidenziato anche nella analisi post-mortem dei tessuti cerebrali¹⁷.

3_ATASSIA

Da quando nel 1996, è stato scoperto che questa patologia è dovuta ad una alterata produzione di una proteina detta Fratassina, si sono susseguiti molti studi per scoprire il suo ruolo ed il meccanismo genetico attraverso il quale si ha una riduzione della trascrizione del gene FXN. Ad oggi la precisa funzione fisiologica della fratassina e la patofisiologia di questa malattia non sono stati ancora del tutto chiari¹⁸⁻¹⁹.



La fratassina in condizioni fisiologiche esplica la sua funzione a livello mitocondriale infatti la sua perdita ha numerosi effetti sulle funzioni mitocondriali. Dai modelli cellulari ottenuti da pazienti FRDA, si nota una marcata perdita di proteine ferro-zolfo, i complessi della catena respiratoria (ISC) I, II, III e l'aconitasi mitocondriale; questa cascata di effetti hanno come risultato finale una riduzione nella formazione di ATP. Inoltre è stato dimostrato che nei mitocondri dei pazienti FRDA è presente un accumulo di ferro libero che porta alla formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), attraverso la reazione di Fenton, come si evidenzia dall'aumento nella concentrazione di markers di danno ossidativo nel sangue e nelle urine²⁰⁻²¹.

In conclusione si può pensare che la fratassina abbia un ruolo fondamentale nei numerosi processi cellulari, che vanno dall'apporto del ferro all'assemblaggio degli ISC ed alla biogenesi dell'eme (chaperonina), al deposito del ferro in condizioni di eccesso, fino a quella di controllare lo stress ossidativo intracellulare, modulando la concentrazione dei ROS²²⁻²⁵.

I maggiori effetti che si notano nelle cellule carenti di fratassina sono l'accumulo mitocondriale di ferro, con una conseguente relativa deficienza citosolica di questo metallo. Questo causa una iper-affinità e iper-attività dei sistemi per l'uptake del ferro, che portano alla formazione di un eccesso di ROS, accompagnato a uno squilibrio nelle difese antiossidanti enzimatiche e a un conseguente aumento della sensibilità allo stress ossidativo. Secondo quanto appena esposto in dettaglio si innesca, quindi, un circolo vizioso che tende a perpetuarsi in senso peggiorativo.

4_ NEOPLASIE

Sempre più studi indicano come un elevato stress ossidativo sia associato alla formazione delle neoplasie.

A contribuire pesantemente agli elevati livelli di radicali liberi che si riscontrano nei pazienti è una carenza cronica di antiossidanti causata da un'alimentazione sempre più povera e artificiale.

In particolare uno studio pubblicato su "Proceedings of the National Academy of Sciences" (PNAS) afferma che la maggior parte delle mutazioni che interessano il DNA portano la firma dello stress ossidativo, rendendolo uno dei principali attori sia dell'evoluzione, sia dell'invecchiamento, del cancro e di altre patologie: lo afferma una ricerca condotta dalla Oregon State University, in collaborazione con colleghi dell'Università dell'Indiana, della Florida e del New Hampshire.

Lo studio è stato condotto sul nematode *C. elegans* per un numero di generazioni corrispondenti a 5000 anni per l'uomo. Lo studio è stato possibile perché questo nematode raggiunge l'età riproduttiva in quattro giorni, così è facile studiare i cambiamenti che avvengono in centinaia di generazioni usando le più avanzate tecnologie di sequenziamento del genoma. Studiando 250 generazioni del nematode i ricercatori hanno rilevato che nel corso di questo intervallo di tempo si sono accumulate 391 mutazioni genetiche, vale a dire dieci volte di più di quelle che erano mai state tracciate in studi di questo tipo.

Come sappiamo gran parte della vita sulla terra dipende dall'ossigeno, che è il maggiore produttore di energia. Da queste reazioni enzimatiche che avvengono a livello mitocondriale si formano sottoprodotti che sono i radicali liberi che danneggiano proteine, grassi e DNA; questo processo peggiora con l'età, quando i ROS si accumulano e iniziano a provocare malattie²⁶.

5_ INFIAMMAZIONE

Studi recenti sostengono effetti benefici di polifenoli in varie malattie infiammatorie croniche. Il processo infiammatorio è associato all'attivazione di diversi mediatori tra i quali è opportuno citare l'istamina, la generazione di ROS, la sintesi di monossido d'azoto in neutrofili, macrofagi e mastocellule ed il ruolo più importante è attribuito all'attivazione della Fosfolipasi A2 (PLA2) citosolica. Quest'ultima porta alla produzione di acido arachidonico, precursore di trombossano, prostaglandine e leucotrieni che sono i mediatori del processo infiammatorio. Recenti studi dimostrano come alcuni polifenoli possano inibire, con meccanismo dose-dipendente, il rilascio di istamina indotto da un attivatore endogeno di PLA2.²⁷; altri studi hanno invece evidenziato come queste molecole possano inibire NF-kB.

L'attivazione di NF-kB gioca un ruolo fondamentale nel controllare le malattie infiammatorie croniche. Le proteine della famiglia NF-kB (p50, p52, p65, RelB e cRel) si trovano nel citoplasma in uno stato inattivo legato a molecole inibitorie definite kB (IKB) (tra cui IkB-a, IkB-b, IkB-1, IkB-z, p100, p105 e Bcl-3). In seguito alla presenza di determinate sostanze come ad esempio

radicali liberi, citochine pro-infiammatorie, sostanze cancerogene, lipopolissaccaridi batterici (LPL) e radiazioni UV, viene fosforilato l'eterodimero NF-kB/IkB liberando così la subunità attiva che va a livello nucleare dove svolge la sua attività. Così NF-kB si lega a specifiche sequenze di DNA e induce l'espressione genica di mediatori proinfiammatori come TNF- α , IL-1 β o IL-8²⁸⁻³¹.

Questi studi riescono a spiegare le proprietà anti-infiammatorie dei polifenoli, in quanto hanno la capacità d'inibire NF-KB, però potrebbero essere coinvolti altri bersagli molecolari ma ad oggi sono ancora da definire.

6_CICATRIZZAZIONE (WOUND HEALING CUTANEO)

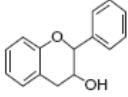
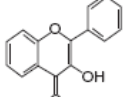
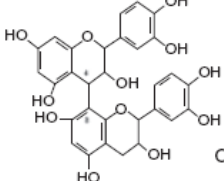
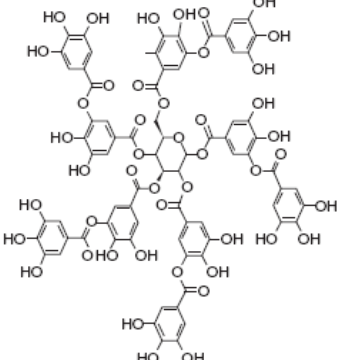
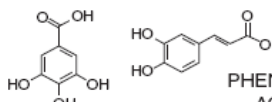
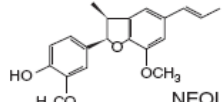
Il processo di guarigione delle ferite è una successione di eventi durante i quali il tessuto danneggiato viene riparato, così si genera un nuovo tessuto specializzato che genera una cicatrice. Successivamente il microambiente della cute dove è avvenuta la lesione cambia drasticamente³². Durante l'esordio della fase infiammatoria avviene un'attivazione cellulare: in un primo momento esplicano la loro funzione i neutrofili poi entrano nel sito della ferita i linfociti i monociti e più tardi i macrofagi³³. Questi stimolano i neutrofili intrappolati nella ferita che rilasciano i ROS ed enzimi proteolitici che causano danno tessutale e diminuita guarigione³⁴.

Quando un tessuto viene danneggiato da mezzi fisici, infezioni, o composti tossici, la distruzione delle cellule coinvolte nel processo infiammatorio può essere accompagnata dal rilascio dei cosiddetti "pools di transito" di ferro. Il ferro facilita la decomposizione dei perossidi lipidici, ed anche la formazione di OH radicale e di specie similmente reattive ferro-ossigeno partendo da H₂O₂ ed O₂⁻.³⁵ Così i radicali dell'ossigeno inibiscono il processo di guarigione dei tessuti causando un danno al DNA, alle membrane cellulari, alle proteine e ai lipidi. Un importante esempio di danno cellulare da specie reattive all'ossigeno è la perossidazione lipidica, che coinvolge la degradazione ossidativa dei lipidi insaturi. La perossidazione lipidica è altamente dannosa per la struttura e la funzione della membrana e può causare numerosi effetti citopatologici. Le ossidazioni non enzimatiche di molecole biologiche, lipidi di membrana e tessuti hanno la capacità di ritardare la guarigione della sede danneggiata³⁶.

7_DERMATOCOMICOSI

L'attività antimicrobica dei polifenoli, presenti nei cibi vegetali e nelle piante medicinali, è stata valutata su un'ampia gamma di microrganismi. Tra tutti i polifenoli con attività antifungina sono stati studiati più a lungo i flavan-3-oli, flavonoli, e tannini perché hanno dimostrato un'azione ad ampio spettro ed a maggiore attività antimicrobica; i loro meccanismi d'azione sono molteplici come l'inibizione della formazione del biofilm, la riduzione dei ligandi e la neutralizzazione di tossine batteriche. Inoltre in recenti studi è emerso che queste molecole mostrano un sinergismo evidente con gli antibiotici.

Le proprietà antimicrobiche dei polifenoli sono state studiate per mettere a punto nuovi sistemi di conservazione alimentare³⁷ a causa della pressione crescente, da parte dei consumatori, da un lato alle industrie alimentari per evitare conservanti sintetici, e dall'altro alle industrie farmaceutiche per sviluppare terapie innovative nel trattamento da infezioni microbiche³⁸⁻³⁹.

 <p>FLAVAN-3-OL</p>	<p>ANTIBACTERIAL</p> <p>ANTIVIRAL</p> <p>ANTIFUNGAL</p> <p><i>V.cholerae</i> - <i>S.mutans</i> - <i>C.jejuni</i> <i>C.perfringes</i> - <i>E.coli</i> - <i>B.Cereus</i> <i>H.pylori</i> - <i>S.aureus</i> - <i>L.acidophilus</i> <i>A.naestlundii</i> - <i>P.oralis</i> - <i>P.gingivalis</i> <i>P.melaninogenica</i> - <i>F.nucleatum</i> - <i>C.pneumonia</i></p> <p>Adenovirus- Enterovirus -Flu virus</p> <p><i>Candida albicans</i> <i>Microsporium gypseum</i> <i>Trichophyton mentagrophytes</i> <i>Trichophyton rubrum</i></p>
 <p>FLAVONOL</p>	<p>ANTIBACTERIAL</p> <p>ANTIVIRAL</p> <p>ANTIFUNGAL</p> <p><i>S.mutans</i> <i>E.coli</i> <i>S.aureus</i></p> <p>influenza A virus type -1 herpes simplex virus (HSV)</p>
 <p>CONDENSED TANNIN</p>	<p>ANTIBACTERIAL</p> <p>ANTIVIRAL</p> <p>Different strains of : <i>Salmonella</i> - <i>Staphylococcus</i> <i>Helicobacter</i> - <i>E.coli</i> - <i>Bacillus</i> <i>Clostridium</i> - <i>Campylobacter</i> <i>Lysteria</i></p> <p>Epstein-Barr virus Herpes virus HSV -1 and HSV -2,</p> <p><i>Candida parapsilosis</i></p>
 <p>HYDROLYSABLE TANNIS</p>	<p>ANTIBACTERIAL</p> <p>ANTIVIRAL</p> <p>ANTIFUNGAL</p> <p><i>S.aureus</i> - <i>L.monocytogenes</i> <i>E.coli</i> - <i>Paeruginosa</i></p> <p>Different strains of : <i>Mycobacterium tuberculosis</i></p>
 <p>PHENOLIC ACID</p>	<p>ANTIBACTERIAL</p> <p><i>S.aureus</i> - <i>L.monocytogenes</i> <i>E.coli</i> - <i>Paeruginosa</i></p>
 <p>NEOLIGNAN</p>	<p>ANTIBACTERIAL</p> <p>Different strains of : <i>Mycobacterium tuberculosis</i></p>

Current Opinion in Biotechnology

2. SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi dieci anni i polifenoli sono stati prevalentemente proposti come ingredienti attivi in formulazioni, topiche e sistemiche, con lo scopo di prevenire e modulare il danno ossidativo cutaneo e sistemico (SNC).

Le richieste del mercato, sempre più orientate verso queste molecole naturali, hanno favorito l'aumento della ricerca in questo ambito per cercare di capire le loro attività biologiche e il loro possibile meccanismo d'azione.

Durante questo studio abbiamo cercato di valorizzare i principi attivi di origine naturale, noti per un uso nella medicina tradizionale, al fine di modificarli chimicamente e valutarne le relazioni tra la struttura e l'attività.

Inoltre questo lavoro di tesi si inserisce all'interno di un progetto più ampio denominato NTF (Non Timber Forest) ad elevato valore sociale, economico ed ambientale in quanto si pone l'obiettivo di sviluppare materie prime sostenibili puntando sulle filiere locali corte.

In particolare, in questo lavoro, abbiamo focalizzato la nostra attenzione su quattro molecole naturali: Verbascoside, Rutina, Florizina e Salicina, studiando la relazione struttura-attività delle molecole come tali e dei loro derivati semisintetici. Questi composti possiedono analoghe attività (in particolare quella antiinfiammatoria, antiossidante, antimicrobica, cicatrizzante ecc...) correlate alla struttura fenolica che, nel Verbascoside, Florizina, Rutina è libera, mentre nella Salicina è legata alla porzione gliconica.

Il nostro obiettivo è stato quello di variare la lipofilia dei composti naturali cercando di migliorare la veicolazione della porzione fenolica, ovvero del farmacoforo presente nelle molecole naturali.

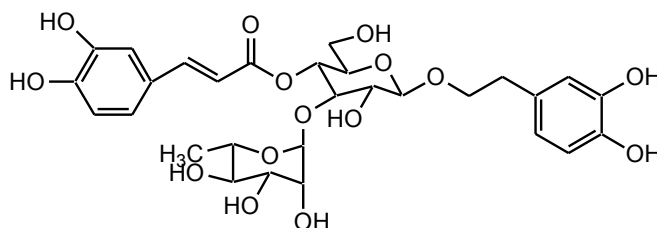
Abbiamo deciso, mediante l'utilizzo di gruppi funzionali già ampiamente utilizzati in letteratura, di acilare le funzionalità ossidriliche presenti nella porzione gliconica delle strutture, rendendole così più lipofile. Questo tipo di protezione non fa altro che rendere le molecole di partenza meno polari e quindi più facilmente assorbibili attraverso le membrane biologiche.

Una volta ottenuti i derivati di semisintesi abbiamo valutato l'aumento della lipofilia ed analizzato le loro attività confrontandole con il substrato di partenza. In alcuni casi sono stati testati anche gli intermedi di sintesi.

Verbascoside, Rutina, Florizina e Salicina e i loro derivati di semisintesi sono stati testati per valutare la loro possibile attività biologica in problematiche in cui lo stress ossidativo è elevatissimo.

3. VERBASCOSIDE

3.1 La molecola



Il Verbascoside, anche noto come Acteoside, è un glicoside fenilpropanoide presente in più di 150 specie di piante dicotiledoni (20 famiglie e 77 generi) da cui è stato ampiamente isolato dalle parti aeree di Lamiaceae, Scrophulariaceae e Verbenaceae, da foglie o fiori di piante appartenenti alla famiglia delle Oleaceae e Buddlejaceae ed infine da steli di alcune Orobanchaceae, Bignoniaceae, e Acanthaceae⁴⁰; oltretutto è stata verificata la presenza di Verbascoside anche in piante medicinali già utilizzate come *Scrophularia ningpoensis*, *Cistanche deserticola* e *Digitalis purpurea*⁴¹.

Questo glicoside fenilpropanoide, venne isolato per la prima volta da piante officinali appartenenti alla famiglia delle Scrophulariaceae⁴² nel 1963, da quel momento si sono susseguite diverse ricerche che interessavano le metodiche di isolamento e purificazione, biosintesi, sintesi chimica ed attività biologica.

Bioattività:

Antiossidante

Il Verbascoside ha dimostrato avere quest'attività in diversi esperimenti: in vitro sull'emolisi dei globuli rossi indotta da radicali superossido⁴³ e sui ROS che si generano con il melanoma B16⁴⁴; la somministrazione di Verbascoside in topi con questa patologia ha dimostrato efficacia nel prolungare la vita cellulare (63.3 ± 3.4 giorni rispetto a $52,1 \pm 2,5$), ed è proprio il potere antiossidante di questa molecola che promuove la capacità antimetastatica, regola la produzione di monossido d'azoto e aumenta l'attività citotossica sulle cellule tumorali⁴⁵.

Antinfiammatoria

È stato osservato che il Verbascoside inibisce, con meccanismo dose-dipendente, il rilascio di istamina indotto da un attivatore endogeno di PLA2, da acido arachidonico e da un inibitore di una pompa di ioni calcio²⁷; altri studi hanno invece attribuito il suo ruolo antinfiammatorio all'inibizione del lipopolisaccaride (LPS) che, mediante l'attivazione di due fattori di trascrizione (NF-Kb e l'

attivatore della proteina 1, AP-1) che cooperano nell'induzione di iNOS, promuove la sintesi di monossido d'azoto, prostaglandine E2 e TNF- α in cellule peritoneali dei ratti⁴⁶.

Tra i processi infiammatori contrastati dalla molecola in esame, si evidenzia anche particolare attività sull'infiammazione renale (nefrite): studi svolti su cavie hanno dimostrato che 30mg/kg di questa sostanza, somministrati una volta al giorno, inibiscono l'infiammazione della membrana basale del glomerulo; quest'effetto è associato alla soppressione dell'aumento di leucociti per il 79% dopo soli 15 giorni di terapia⁴⁷⁻⁴⁸.

Antimicotica

Numerosi studi sono stati svolti al fine di provare l'attività citotossica sui diversi microorganismi del Verbascoside; a questo proposito si è riscontrato un potere fungicida su *Penicillium digitatum* nelle arance⁴⁹, in miscela con isoverbascoside è risultato attivo contro diversi ceppi batterici e non come *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* e *Candida albicans*⁵⁰, ha inoltre dimostrato capacità anti-herpetica (HSV-1 e HSV-2) in vitro⁵¹.

Particolare attenzione può essere rivolta ad uno studio che è stato intrapreso per provare l'interazione sinergica tra amfotericina B (AmB) e Verbascoside, isolato dalle parti aeree della pianta *Colebrookea oppositifolia* (Lamiaceae); il glicoside non ha dimostrato particolare attività antifungina intrinseca, ma una potente sinergia in associazione agli AmB contro le specie patogene selezionate, con un potente effetto fungicida ed un effetto post-antimicotico significativamente esteso. Inoltre, la combinazione ha ridotto i biofilm in ceppi di *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*. Questa sinergia d'effetto è probabilmente dovuta alle basse concentrazioni di AmB che facilitano l'assorbimento di Verbascoside, il quale di conseguenza aumenta il numero di cellule fungine uccise. L'esperimento è stato condotto su topi fino a 2000mg di peso corporeo, nei quali la somministrazione combinata per via intraperitoneale o orale non ha prodotto alcuna tossicità manifesta⁵².

Valutando le diverse attività antimicrobiche del Verbascoside si è cercato di capire a quale gruppo funzionale fosse dovuta tale capacità; analizzando la struttura, appare legato alla componente fenolica, a cui è associata anche l'attività antiossidante⁵³.

Regolazione cellulare

In uno studio condotto sui ratti, è stata associata la somministrazione di Verbascoside con l'apoptosi delle cellule al livello della prostata e l'inibizione dell'iperplasia prostatica benigna⁵⁴; così si è cercato di approfondire in quale modo e misura questo glicoside fenilpropanoide riesca ad intervenire nei processi di regolazione cellulare: il Verbascoside inibisce la proliferazione delle cellule HL-60 (cellule di leucemia promielocitica umana) non solo inducendone la

differenziazione ma anche arrestando la fase G1 del ciclo cellulare; quest'effetto è conseguenza dell'aumento del segnale TGF- β 1 (fattore di crescita trasformante) e del blocco della fase G1 del ciclo cellulare attraverso la regolazione di chinasi ciclina dipendenti, in particolare CDK4 e CDK6 che agiscono su un gene soppressore dei tumori. Proprio per questo si pensa che abbia anche un ruolo citotossico su cellule cancerose; in questo studio si è utilizzato Verbascoside ed Isoverbascoside, entrambi con funzione catecolica e ramnosio che pare siano responsabili dell'attività citotossica, ma particolare attenzione è stata data anche al gruppo caffeolico, sostituito dello zucchero⁵⁵.

E' stato anche osservato che basse concentrazioni di Verbascoside inducono la proliferazione di cellule dendritiche⁵⁶, l'effetto opposto si ottiene a concentrazioni uguali o superiori a 1000 μ g/ml.

Epatoprotettiva

Il Verbascoside (50, 150 o 300mg/kg) riduce i livelli di LPS nel fegato indotte da Bacillus Calmette-Guérin (BCG), i livelli di alanina e aspartato transaminasi, i livelli epatici di monossido d'azoto e malondialdeide (marker di danno per ossidativo), migliora l'attività antiossidante dell'enzima superossido dismutasi (SOD) e riduce il danno epatico associato a patologie immunologiche nei ratti⁵⁷. Infine contrasta l'epatotossicità indotta da tetracloruro di carbonio riducendo i livelli della proteina P450⁵⁸.

Si pensa che l'attività epatoprotettiva sia strettamente correlata all'attività antiossidante, immunoregolatoria e regolatoria dell'apoptosi cellulare⁵⁸.

Neuroprotettiva

E' stato osservato che il pre-trattamento con Verbascoside su SH-SY5Y (derivato umano di linee di cellule che mimano, in vitro, la funzione neuronale) ha effetto neuroprotettivo contro il danneggiamento indotto da Rotenone (un insetticida naturale estratto da piante tropicali del genere Leguminose), grazie alla riduzione dei livelli di ROS.

Altre attività simili sono state riscontrate con la riduzione del danneggiamento neuronale provocato da MPTP (1-metil 4-fenil 1,2,3,6-tetraidro-piridina, composto secondario che si forma durante la sintesi della Meperidina) nei ratti, perché può inibire l'apoptosi dei neuroni granulari del cervelletto⁵⁹.

3.2 Risultati e discussione

3.2.1 Tecnologie IRB per la produzione di Verbascoside

Il Verbascoside di partenza per questo studio è stato ottenuto da piante di *Buddleja davidii*. La pianta di *Buddleja davidii* usata dall'azienda IRB per generare la linea cellulare di nostro interesse deriva da una varietà di linee cellulari selezionate per la loro alta concentrazione in Verbascoside⁶⁰.

Il primo passo per l'ottenimento di una nuova linea cellulare vegetale è quello di sterilizzare il tessuto della specie che si desidera utilizzare con NaClO e Tween 20. Questo passaggio è necessario per rimuovere tutti i microrganismi (batteri, funghi e muffe) che potrebbero contrastare o impedire lo sviluppo della coltura. Il tessuto vegetale sterilizzato viene successivamente tagliato in frammenti minuti (esplanti) e depositato in piastre Petri contenenti terreno nutritivo solido addizionato di regolatori di crescita ed in assenza di antibiotici. Dagli esplanti in coltura si osserva la generazione di aggregati di tessuto indifferenziato e non organizzato, detti calli, che vengono mantenuti mediante regolare trasferimento in terreno fresco. Attraverso la ripetizione di questi passaggi si ottengono, nel tempo, gli aggregati di tessuto con elevata velocità di crescita. Tale procedura consente di dare origine ad una coltura di cellule vegetali non OGM in quanto non viene attuato alcun intervento di ingegneria genetica per modificare il genoma vegetale.

Vengono selezionati gli aggregati di tessuto calloso più friabili e trasferiti in terreni di coltura liquidi, in modo da aumentare notevolmente la biomassa disponibile.

Le colture cellulari, ottenute al termine di questo processo di fermentazione, vengono raccolte e omogenate con l'Ultraturrax. Il residuo solido (si tratta per lo più di residui cellulari) viene separato dalla fase acquosa contenente il Verbascoside tramite centrifugazione a 1000 rpm per 10 minuti. La resa è di circa 3 grammi per ogni litro di coltura liquida di cellule in sospensione. Dopo la centrifuga il prodotto, che appare come surnatante, è recuperato dall'estrazione in fase solida sulla resina XAD4, la quale viene lavata con soluzione tampone per ridurre la quantità di contaminanti ed il Verbascoside viene eluito con una soluzione idroalcolica (alcol etilico 80%). Successivamente viene concentrato sotto pressione ridotta e liofilizzato. L'estratto finale, una polvere giallo pallido, contiene una quantità di Verbascoside maggiore del 1'80% (peso/peso) insieme ad altre sostanze (>10% peso/peso) come derivati dell'acido caffeico.

Un ulteriore passaggio di purificazione consente di ottenere, dopo ripetute colonne cromatografiche su gel di silice, SEPHADEX LH20 e conseguente cristallizzazione, un prodotto finale con una percentuale di prodotto ancora maggiore (97% peso/peso). La linea cellulare così ottenuta è denominata IRBSV25/B.

3.2.2 Sintesi del derivato del verbascoside

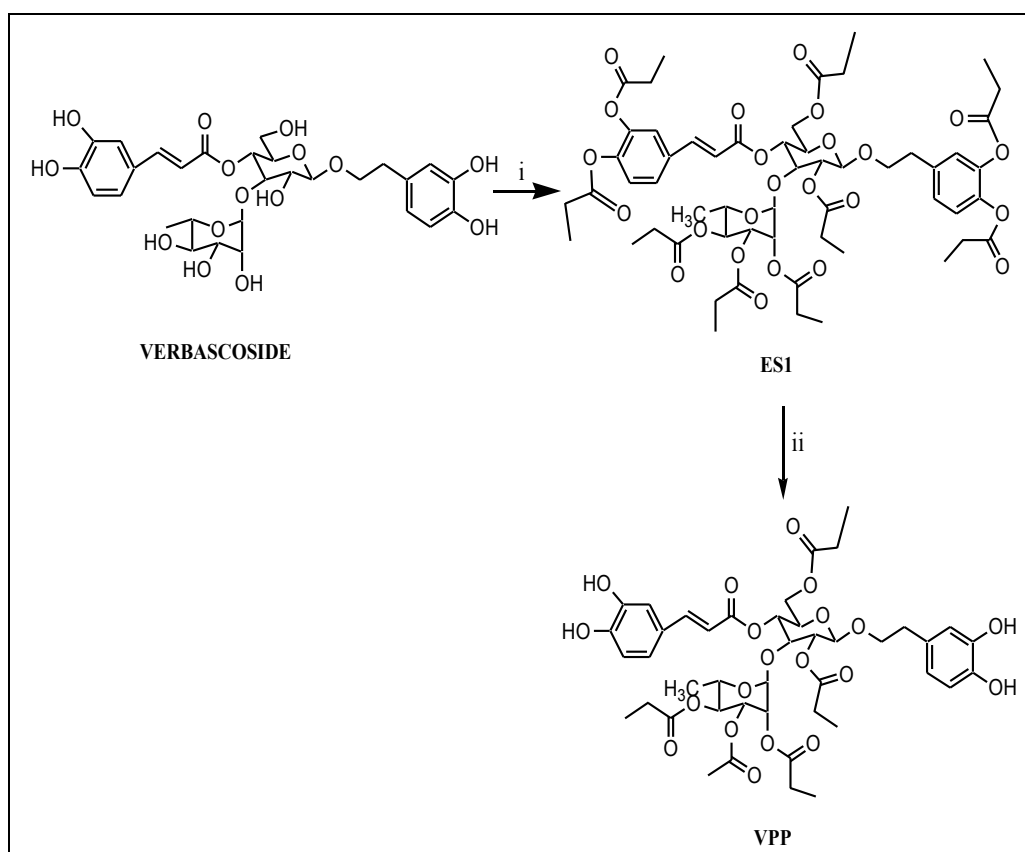
I composti fenilpropanoidi sono caratterizzati da una funzionalità cinnamica e feniletanolica legate alla stessa molecola glucopiranosica (solitamente rappresentata dal glucosio) tramite un legame estereo e glicosidico rispettivamente⁶¹.

Si pensa che, la struttura bioattiva di queste molecole, che è responsabile dell'attività antiossidante⁶²⁻⁶³, antimicrobica⁶⁴⁻⁶⁵, antiinfiammatoria⁶⁶⁻⁶⁷⁻⁶⁸, e antimutagena⁶⁹, sia imputabile alla parte agliconica.

Il Verbascoside, in virtù della sua struttura chimica, è altamente solubile in fase acquosa.

In considerazione dei numerosi vantaggi, dal punto di vista dell'attività biologica, di molecole quali i glicosidi fenilpropanoidi, abbiamo deciso di modificare la struttura del Verbascoside al fine di ottenere una molecola più lipofila, con l'obiettivo di aumentarne il range di applicazioni, di valutarne la stabilità e le proprietà anti-ossidanti in alcune formulazioni topiche.

Tutte le funzionalità idrossiliche del Verbascoside sono state esterificate usando il propionil-cloruro in presenza di 4-dimetilaminopiridina (4-DMAP) e successivamente si è effettuata una deprotezione selettiva degli ossidril fenolici usando N,N,N-trietilammina (TEA) in metanolo per ottenere il derivato VPP (Verbascoside Penta Propionato) (Schema 1).



Schema 1. Sintesi del derivato penta-sostituito del Verbascoside (**VPP**).i: DMAP, Propionil Cloruro, CH_2Cl_2 , ii: TEA, MeOH.

3.2.3 Coefficiente di ripartizione ottanolo-H₂O

Al fine di misurare le proprietà lipofile delle molecole, è stato valutato il loro coefficiente di ripartizione (LogP), calcolato come il logaritmo del rapporto delle concentrazioni della sostanza in ottanolo e acqua.

Questa determinazione è stata effettuata in un sistema bifasico di ottanolo e acqua a 25°C. I dati sono descritti in **Tabella 1** e mostrano una differenza significativa nella distribuzione di **VPP**, più alta in ottanolo rispetto all'acqua (0.96 LogP), a differenza del Verbascoside che è meno concentrato in ottanolo con un valore di LogP pari a -0.56. Questi dati suggeriscono che **VPP**, essendo più lipofilo rispetto al Verbascoside, possa distribuirsi nella fase lipidica delle formulazioni invertendo così sia la solubilità che la parte attiva della formulazione.

	Ottanolo (mg/20ml)	H₂O (mg/20ml)	LogP*
Verbascoside	1,07	3,93	-0,56
VPP	4,50	0,50	0,96

$$*\text{Log P} = \log_{10} [\text{mg}/20\text{ml}] \text{ octanol}/[\text{mg}/20\text{ml}]\text{H}_2\text{O}$$

Tabella 1. Coefficiente di partizione di Verbascoside e VPP in un sistema bifasico ottanolo-acqua.

3.2.4 Analisi antiossidanti

3.2.4.1 Analisi ORAC

Nel 1993, il medico e chimico Guohua Cao (National Institute on Aging, Bethesda, USA) ha pubblicato i principi del dosaggio ORAC (Oxygen Radical Absorption Capacity).

La metodica è stata messa a punto per valutare la protezione che le sostanze antiossidanti forniscono all'organismo nei confronti di idrossidi e perossidi reattivi. Il metodo è stato studiato per testare campioni di siero umani ed animali, prodotti vegetali, cibi, ingredienti alimentari e prodotti farmaceutici. All'unità di misura del potere antiossidante analizzato con questa metodica è stato attribuito il nome di unità ORAC.

Il saggio ORAC è una metodica che consente di misurare la capacità inibente che può esercitare un antiossidante sui radicali liberi, viene utilizzato per determinare la capacità antiossidante totale ed è in grado di misurare l'inibizione da parte del composto antiossidante dei radicali perossilici che solitamente avviene per interruzione della catena radicalica per trasferimento di un atomo di idrogeno. Si tratta di un metodo molto sensibile che utilizza la fluoresceina come marker di fluorescenza (n precedenza si usava la β-ficoeritrina meno stabile) e il 2,2'-azobis-(2-amidinopropano)-cloridrato (AAPH), azocomposto solubile in acqua che si decompone termicamente portando alla formazione a velocità costante di radicali perossilici acquosi.

In ogni campione l'inibizione della degradazione della fluoresceina causata dai radicali perossilici, grazie all'azione protettiva degli antiossidanti presenti, è una misura della capacità antiossidante del campione stesso nei confronti delle specie reattive. Infatti finché gli antiossidanti sono in grado di catturare i radicali, essi proteggono il marker di fluorescenza dal decadimento; terminato l'effetto degli antiossidanti, i radicali reagiscono con la fluoresceina portando ad un calo della fluorescenza. Il tempo di decadimento della fluorescenza è proporzionale alla quantità ed all'attività degli antiossidanti presenti nel campione.

Il dosaggio ORAC misura dunque il decremento tempo-dipendente nella fluorescenza della molecola marker, come conseguenza del danneggiamento operato dal radicale incentrato sull'ossigeno. Su una base molare, il marker viene scelto in quanto questo reagisce con i radicali dell'ossigeno oltre 100 volte più lentamente della maggior parte degli antiossidanti biologici come tioli, acido urico, bilirubina e ascorbato. Perciò, tutti gli altri antiossidanti attivi sono completamente ossidati prima che lo sia la fluoresceina, facilitando così la misura della capacità antiossidante del campione in esame.

È altrettanto importante che il marker sia molto più reattivo di altre molecole non antiossidanti, in modo che queste non interferiscano nell'analisi.

I risultati del saggio sono quantificati permettendo alla reazione di giungere a completamento e integrando successivamente l'area al di sotto della curva cinetica relativamente ad una reazione in bianco (blank reaction) non contenente antiossidanti aggiunti. L'area al di sotto della curva (AUC) è proporzionale alla concentrazione di tutti gli antiossidanti presenti nel campione.

Ciascuna reazione è calibrata usando come standard il Trolox®. I risultati del saggio sono riportati sulla base dell'equivalenza:

$$1 \text{ unità ORAC} = 1 \mu\text{M di equivalenti Trolox}^{\circledR}$$

I risultati del test ORAC mostrano, per quanto riguarda il Verbascoside ed il suo derivato VPP, un'elevata attività antiossidante rispetto al radicale perossilico, con risultati migliori per il Verbascoside rispetto ad VPP (7614,67 e 583,36 $\mu\text{mol TE/grammo}$ rispettivamente).

Questo dato probabilmente è dovuto al fatto che, essendo VPP più lipofilo, non si solubilizza perfettamente nel PBS (Tabella 2).

Composto	$\mu\text{moli TE/ grammo}$
Verbascoside	7614.67 \pm 2.3
VPP	583.36 \pm 1.4

Tabella 2. Analisi ORAC di Verbascoside e VPP. Ciascun valore è stato ottenuto da tre esperimenti (media \pm SE).

3.2.4.2 Analisi PCL

La metodica PCL (photochemiluminescence) è basata su un'amplificazione della reazione di spegnimento di radicali derivanti da specie reattive di ossigeno (ROS) dovuta all'autossidazione fotoindotta del Luminol, che è accompagnata da un'intensa chemiluminescenza.

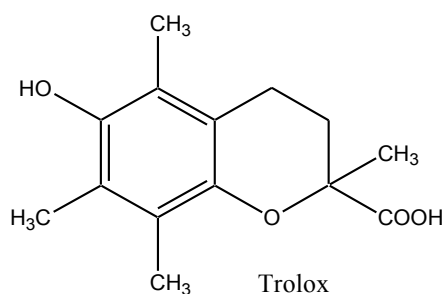
La presenza di antiossidanti inibisce l'ossidazione del luminol che viene effettuata dalla presenza dell'anione superossido (O_2^-) a sua volta generato per via fotochimica.

Questa tecnica⁷⁰ è molto veloce (3 minuti) ed accurata (ordine delle nanomoli) e può essere effettuata secondo due diversi protocolli: ACW (Antioxidant Capacity Watersoluble) e ACL (Antioxidant Capacity Lipidsoluble). La presenza di questi due protocolli ci permette di evidenziare per una stessa molecola sia la capacità antiossidante della componente idrosolubile (flavonoidi, vitamina C, ecc.) che di quella liposolubile⁷¹ (tocoferoli, tocotrienoli, carotenoidi, oli essenziali ecc.).

La metodica PCL è di notevole importanza in quanto permette di valutare la capacità antiossidante dei composti in esame nei confronti di O_2^- , cioè una delle specie reattive dell'ossigeno più pericolose in quanto è responsabile di danni ossidativi alle strutture biologiche.

La PCL permette anche di determinare la capacità antiossidante sia di sostanze pure che di miscele complesse mediante la costruzione di una retta di taratura con un antiossidante di riferimento.

Nel nostro caso abbiamo utilizzato come riferimento, per il protocollo in ambiente lipofilo (ACL), il Trolox®, un potente analogo della vitamina E, esprimendo le potenze ottenute come micromoli equivalenti in attività antiossidante di Trolox®, per grammo di prodotto in esame.



Invece nel protocollo in ambiente acquoso (ACW), come riferimento abbiamo utilizzato l'acido ascorbico, esprimendo i risultati ottenuti come micromoli equivalenti in attività antiossidante di acido ascorbico per grammo di prodotto in esame.

Le determinazioni sono state condotte secondo la metodica originariamente descritta da Popov e Lewin⁷².

Il Verbascoside e il suo derivato di semisintesi VPP sono stati testati per determinare la loro capacità antiossidante come tali ed in seguito, con la stessa metodica, sono state analizzate due formulazioni dermocosmetiche contenenti i due composti.

Sorprendentemente, nel caso del derivato semisintetico VPP, si è osservata un'attività antiossidante maggiore rispetto a quella della molecola naturale di partenza (16.19 e 14.77 mmolTrolox/gr rispettivamente) (Figura 3).

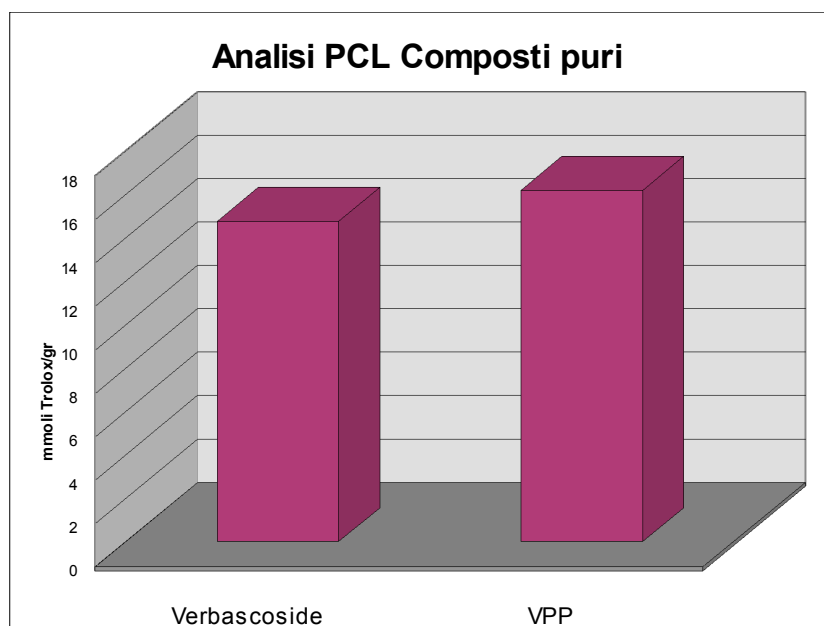


Figura 3. AnalisiPCL dei composti puri di Verbascoside e **VPP**. Ciascun valore è stato ottenuto da tre esperimenti (media \pm SE).

L'analisi PCL delle due formulazioni base ha confermato la più alta attività antiossidante della formulazione contenente VPP rispetto al Verbascoside(14.63 e 13.7 mmoli Trolox/g formulazione rispettivamente) (Figura 4).

L'analisi PCL delle stesse formulazioni sottoposte ad invecchiamento accelerato in stufa a 40°C per 150 giorni ha confermato il potere antiossidante osservato in precedenza (dati non mostrati).

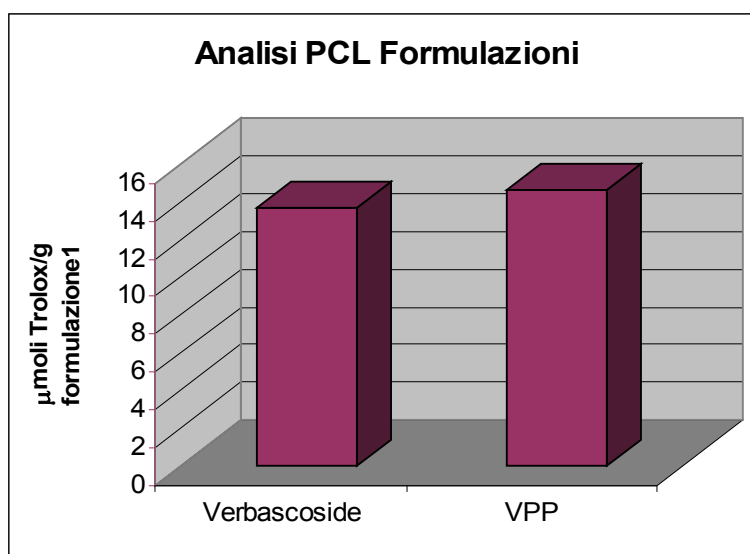


Figura 4. Analisi PCL delle formulazioni 1 contenentiVerbascoside e **VPP**. Ciascun valore è stato ottenuto da tre esperimenti (media \pm SE).

3.2.5 Stabilità in formulazioni dermocosmetiche

Sulla base dei dati interessanti ottenuti dalle analisi antiossidanti, si è deciso di continuare gli studi inerenti queste molecole valutando la loro stabilità all'interno di formulazioni dermocosmetiche allo 0,3% (p/p) e sottoponendo tali formulazioni ad invecchiamento accelerato in stufa a 40°C per 150 giorni.

Sono state preparate due diverse formulazioni cosmetiche:

- Formulazione 1: una base cosmetica preparata con emollienti, emulsionanti ed altri ingredienti che non hanno alcuna proprietà antiossidante.
- Formulazione 2: formulazione con ingredienti totalmente privi di acqua.

La stabilità dei componenti attivi è stata monitorata tramite HPLC analitico per valutare la stabilità di Verbascoside e VPP in funzione del tempo.

L'indagine ha evidenziato che la concentrazione di Verbascoside diminuisce di circa il 30% in entrambe le formulazioni 1 e 2 (Figura 5) dopo 150 giorni in stufa.

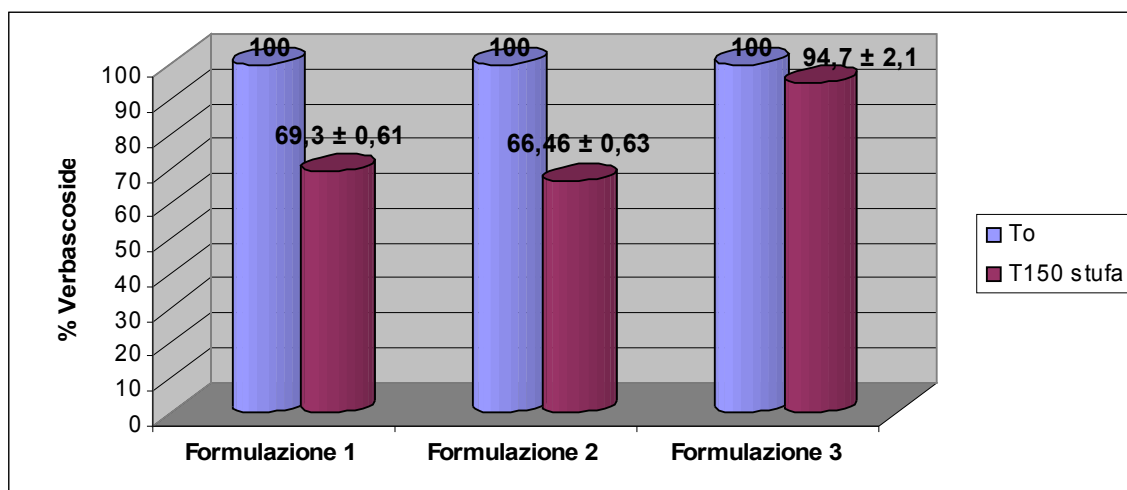


Figura 5. Stabilità del Verbascoside nelle differenti formulazioni conservate a 40°C. Ciascun valore è stato ottenuto da tre esperimenti (media ± SE).

Per quanto riguarda invece il derivato VPP, abbiamo osservato, dopo 150 giorni in stufa, una diminuzione di circa il 60% nella formulazione 1, mentre nella formulazione 2 l'ingrediente attivo è notevolmente stabile. Infatti la diminuzione di VPP in questa formulazione è inferiore al 10% (Figura 6).

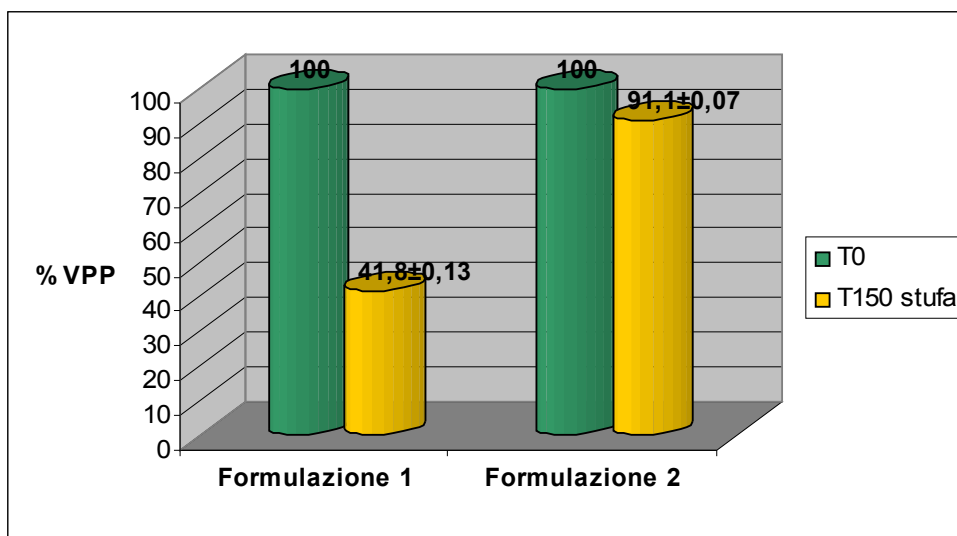


Figura 6. Recupero percentuale di **VPP** nelle diverse formulazioni conservate a 40°C. Ciascun valore è stato ottenuto da tre esperimenti (media ± SE).

È ben noto che il Verbascoside possiede un ampio spettro di attività, tra cui l'azione antinfiammatoria, così abbiamo deciso di incorporare il principio attivo in una terza formulazione simile alle supposte (0,3% p/p), con l'obiettivo di indagare la sua stabilità in una forma farmaceutica lipidica per possibili applicazioni future nel trattamento dell'infiammazione della mucosa intestinale.

Abbiamo osservato che dopo 150 giorni in stufa a 40° C il calo percentuale di Verbascoside è stato solo del 6% (Figura 5). Uno studio preliminare di stabilità in questo tipo di formulazione è stato condotto anche per VPP: i dati hanno mostrato che, dopo 30 giorni in stufa, VPP è stabile al 100% (dati non riportati).

3.2.6 Attività antifungina

Al fine di verificare la possibile attività antifungina del Verbascoside e del VPP sono stati utilizzati nove funghi dermatofiti così da poter definire uno spettro d'azione il più possibile completo. I dermatofiti⁷³ sono funghi patogeni che hanno un'elevata affinità per la cheratina, e che di conseguenza riescono a localizzarsi sulla pelle, sui capelli e sulle unghie. Si instaurano così delle infezioni dette dermatofitosi (tigne o ringworm) dovute alla digestione della cheratina (attività cheratolitica) da parte dei dermatofiti.

Le principali forme di tigne⁷⁴ possono essere: tinea pedis (desquamazioni e macerazioni fra le dita dei piedi), tinea unguium (alterazioni del colore e della consistenza della lamina ungueale), tinea cruris (infezione a livello inguinale e genitale caratterizzata da prurito, rossore e desquamazione), tinea capitis (infezione del cuoio capelluto), e tinea corporis (infezione della cute del tronco e delle estremità accompagnata da reazioni di tipo infiammatorio).

I funghi dermatofiti impiegati nell'analisi sono:

- *Trichophyton rubrum*: è un fungo prevalentemente diffuso negli ambienti cittadini, ed è responsabile di tinea unguium, tinea pedis e tinea cruris, e può anche causare infezioni croniche.
- *Trichophyton mentagrophytes*: è una specie sia antropofila che zoofila, che determina l'infiammazione dei follicoli piliferi.
- *Nannizzia cajetani*: è il fungo che causa principalmente infezioni a cani e uomo.
- *Microsporum canis*: generalmente infetta i cuccioli di animali, in modo particolare i cani e i gatti, che possono diffondere particelle infettive nell'ambiente domestico, che possono creare infezioni al nucleo familiare su cui si manifestano tigne al cuoio capelluto.
- *Microsporum gypseum*: causa principalmente tigne nel corpo, sulle unghie, e nel cuoio capelluto; la principale sorgente di infezione è il terreno, ed infatti sono riportati casi di infezioni soprattutto su giardinieri ed agricoltori.
- *Trichophyton tonsurans*: colpisce prevalentemente gli uomini e non determina reazioni di tipo infiammatorio.
- *Epidermophyton floccosum*: è uno dei principali responsabili di tinea pedis e tinea cruris, quindi va a localizzarsi prevalentemente sui piedi e sulle aree inguinali. Colpisce con una frequenza maggiore gli uomini rispetto alle donne.
- *Trichophyton violaceum*: colpisce prevalentemente i bambini e provoca inizialmente tigne al cuoio capelluto, che successivamente possono svilupparsi e diventare epidermiche. *Nannizzia gypsea*: è la forma sessuale di *M. gypseum* e causa tigne a livello ungueale, corporale e del cuoio capelluto.

I composti di interesse sono stati testati con il metodo di diffusione in SabouraudDextrose Agar (SDA), utilizzando DMSO come solvente (Tabella 3).

Fungo	% Inibizione di crescita al 7° giorno alle concentrazioni di Verbascoside (µg/mL) di		% Inibizione di crescita al 7° giorno alle concentrazioni di ES2 (µg/mL) di	
	20	100	20	100
	<i>Epidermophyton floccosum</i>	0.34±0.2	4.03±0.4	+
<i>Trichophyton rubrum</i>	+	+	+	8.84±0.9
<i>Trichophyton tonsurans</i>	6.06±0.8	3.03±0.5	20±0.8	20±1.1
<i>Trichophyton violaceum</i>	3.96±1.0	15.42±0.7	48.33±1.6	51.2±0.9
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	7.69±0.6	12.82±0.8	+	+
<i>Microsporum gypseum</i>	+	+	4.27±0.5	5.98±0.3
<i>Nannizzia cajetani</i>	+	+	+	6.59±0.6
<i>Microsporum canis</i>	+	+	+	+
<i>Nannizzia gypsea</i>	+	10.34±0.3	7.61±0.9	10.87±1.1

Tabella 3. Inibizione della crescita a seguito di trattamento con lo standard puro Verbascoside ed il derivato semisintetico VPP.

Come mostrato in Tabella 3, l'attività antifungina del Verbascoside e del suo derivato VPP non risulta essere molto interessante: infatti, in tutti i casi le percentuali di inibizione sono piuttosto basse, eccetto per il derivato semisintetico VPP che, sul fungo *Trichophyton violaceum*, mostra valori di inibizione pari al 48,33% e 51,2% rispettivamente alle concentrazioni di 20 e 100 µg/ml.

In tutti gli altri casi si è osservato un effetto ormone-simile con una crescita dei funghi più alta rispetto al controllo (+).

Questo risultato è finora inspiegato e necessita di ulteriori indagini sul possibile meccanismo d'azione: VPP è da considerarsi un pro-farmaco del Verbascoside e dovrebbe comportarsi con lo stesso meccanismo.

3.2.7 Wound Healing

Il processo di cicatrizzazione di una ferita (wound healing), è molto complesso in cui la pelle (o un altro organo-tessuto), in seguito ad una lesione, è in grado di riparsi attraverso processi biochimici e cellulari. L'epidermide e il derma sono fondamentali perchè svolgono la funzione di barriera protettiva contro gli agenti patogeni esterni. Una volta che, a causa di una lesione la barriera protettiva viene a mancare, in condizioni fisiologiche inizia immediatamente il processo di wound healing. Il processo della cicatrizzazione è molto complesso e lungo, che se si protrae per troppo tempo si possono presentare delle ferite croniche (piede diabetico, decubito) che possono, con estrema facilità, infettarsi e causare le infiammazioni croniche. La pelle è continuamente sottoposta a vari tipi di stress sia fisici, meccanici, e chimici che possono comportare un danno tissutale.

In questo studio, effettuato in collaborazione con il gruppo di ricerca del Professor Valacchi, è stato utilizzato come modello "in vitro" la linea cellulare di cheratinociti umani (HaCaT) perchè

rappresenta un ottimo modello cellulare per lo studio della cute; mentre come modello “in vivo” sono stati utilizzati dei topi hairless SKH-1 (femmine di 6 settimane di vita) in accordo con il protocollo animale approvato dall’ Università di Ferrara. Su questi modelli sperimentali abbiamo deciso di testare il verbascoside e il suo derivato di semisintesi.

3.2.7.1 Vitalità e citossicità cellulare

Dalla figura 7 si può osservare che alle concentrazioni 1µM e 10 µM sia il Verbascoside che l’VPP non influenzano in maniera negativa sulla vitalità cellulare (HaCaT, linea cellulare), questo ci dimostra come entrambe le molecole abbiano una elevata tollerabilità cellulare. Inoltre alla concentrazione 10 µM è presente un aumento del 12% della vitalità cellulare da parte di VPP rispetto al Verbascoside. Invece ad una concentrazione di 50 µM risulta evidente una diminuzione della vitalità cellulare per entrambi i composti in esame (circa 40%).

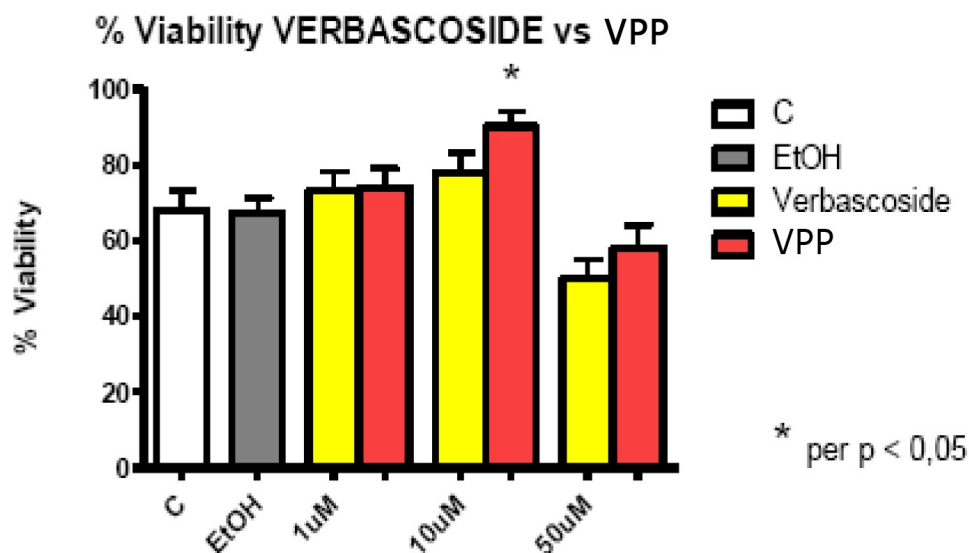


Figura 7: Vitalità cellulare del Verbascoside e VPP.

Nella figura 8 è possibile evidenziare la lisi cellulare tramite i livelli di rilascio dell'enzima lattato deidrogenasi (LDH) presente nel surnatante. LDH è un parametro che ci permette di stabilire la morte cellulare. Per valutare la citotossicità dei composti in esame, abbiamo utilizzato il Triton X-100 (tensioattivo) che permette di ottenere il 100% di lisi cellulare (controllo positivo), e quindi in questo modo i dati vengono espressi in percentuale. Dalla figura 8 è possibile osservare l'azione positiva dell’VPP alla concentrazione 10 µM in quanto ha la capacità di diminuire in modo significativo il livello di LDH rispetto al campione trattato con Triton-X; al contrario sia VPP che il Verbascoside ad una concentrazione di 50 µM aumento il rilascio di LDH.

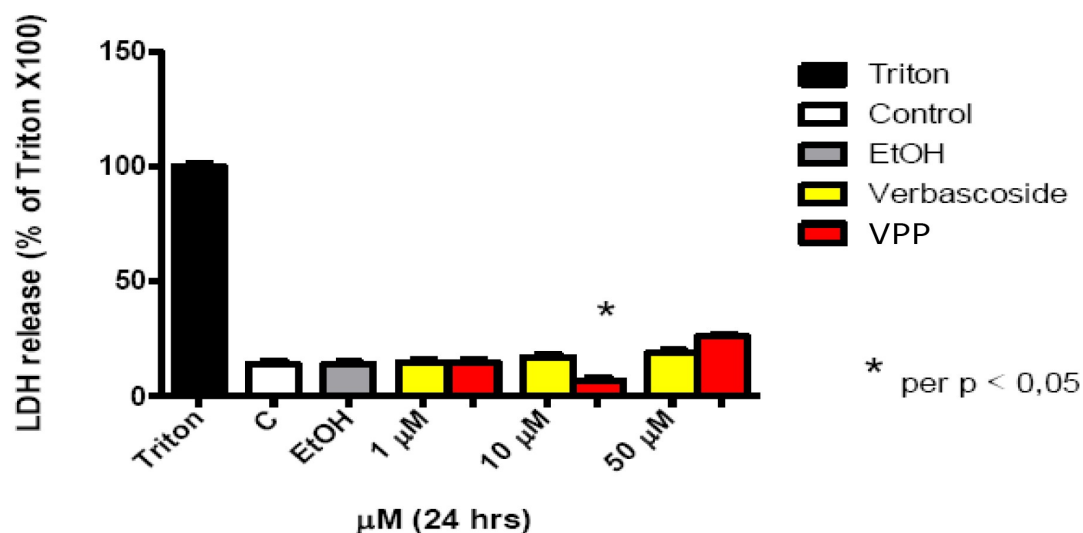


Figura 8: Rilascio di LDH del Verbascoside VS VPP

3.2.7.2 Wound healing in vitro

Abbiamo deciso di procedere effettuando il wound healing “in vitro” (metodo del graffio) utilizzando VPP e il verbascoside alle dosi di 1 e 10 μM dato che a tali concentrazioni non si evidenzia la tossicità cellulare. Inoltre è stato analizzato la possibile attività dell’etanolo 0,1% nel wound healing in vivo, in quanto rappresenta il veicolo dei composti in esame. Nella figura 9 si può osservare che VPP alla concentrazione 10 μM è in grado di promuovere la chiusura del graffio in maniera più efficace rispetto al Verbascoside. Le figure 10 e 11 mostrano graficamente l’andamento nel tempo della chiusura del graffio ed è possibile osservare le ottime potenzialità del Verbascoside, ma soprattutto del suo derivato VPP alla concentrazione 10 μM. Infatti sia Verbascoside che VPP alla concentrazione 1 μM, aumentano la velocità di chiusura del “graffio” del 27 % rispetto al veicolo dopo 24 h. Invece per quanto riguarda il test alla concentrazione 10 μM, l’azione del Verbascoside rimane invariata (30%), al contrario il VPP promuove la velocità di chiusura del graffio del 42 % rispetto al veicolo. Questo rappresenta un risultato molto soddisfacente per il composto VPP.

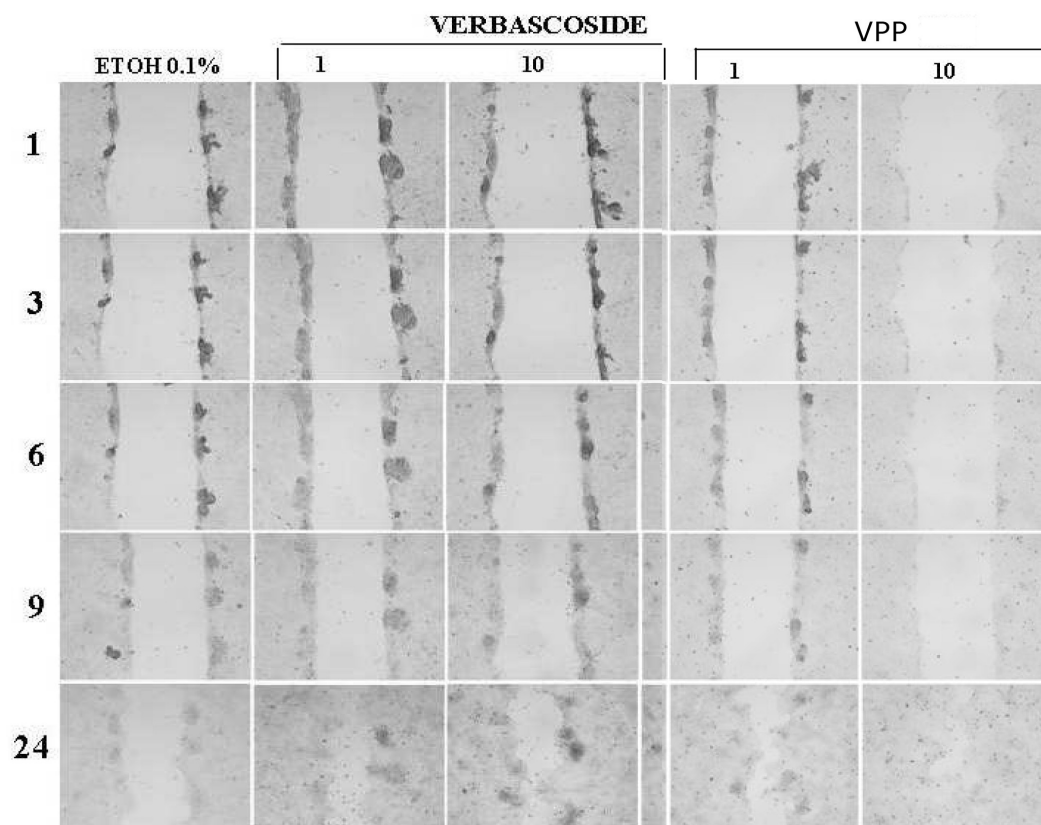


Figura 9: Immagini al microscopio della chiusura del graffio ai tempi 1, 3, 6, 9, 24 h

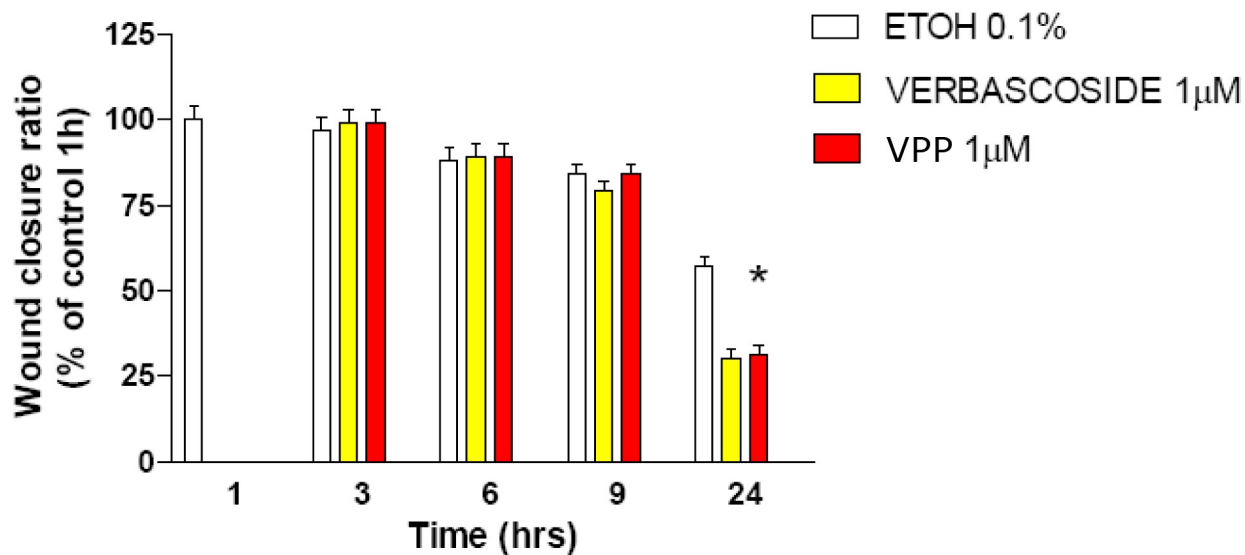


Figura 10: Chiusura del graffio a 1 μM

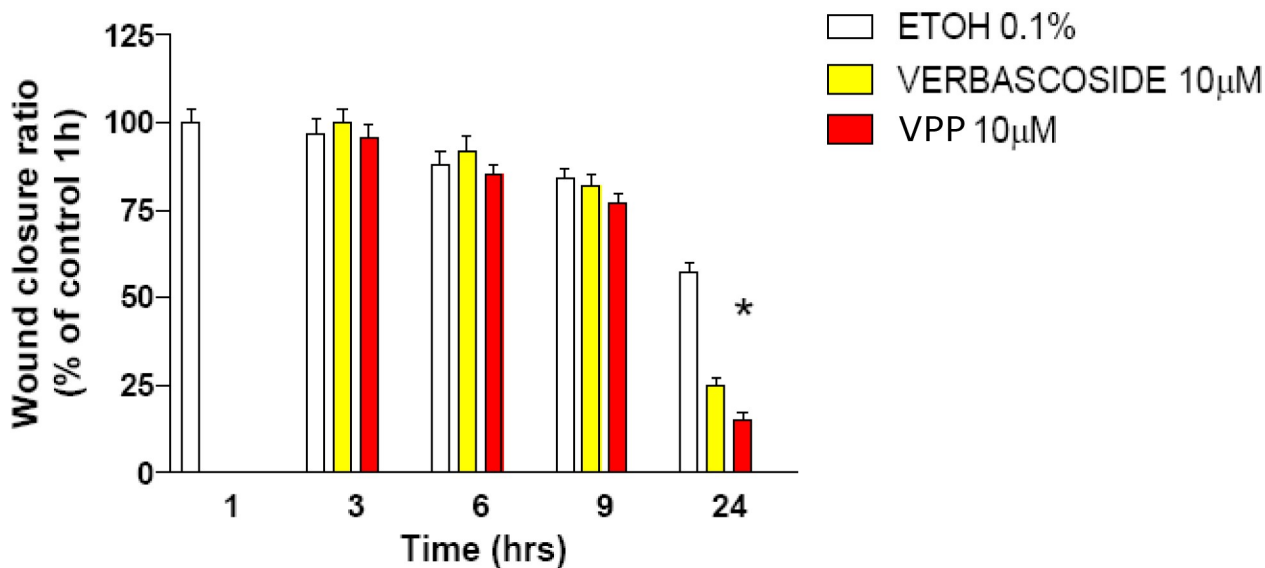


Figura 11: Chiusura del graffio a 10 µM

3.2.7.3 Wound healing in vivo

Lo step successivo al wound healing in vitro è rappresentato dall'omonimo test "in vivo". I grafici della figura 12 sono stati creati misurando il grado di chiusura della ferita nei giorni seguenti la lesione in topi SKH-1 ed evidenziano un'aumentata velocità nella chiusura della ferita, da parte di VPP, soprattutto nelle fasi iniziali del test.

Il composto VPP aumenta la velocità di chiusura della ferita nei primi 3 giorni(8%), questo è un ottimo risultato in quanto la fase iniziale del wound healing è un passaggio molto critico a causa dell'esposizione della ferita "aperta" agli agenti esterni. Quindi se nei primi 3 giorni aumenta la velocità di chiusura della ferita di conseguenza cala in maniera significativa il pericolo di infezioni batteriche e il periodo totale di guarigione della ferita.

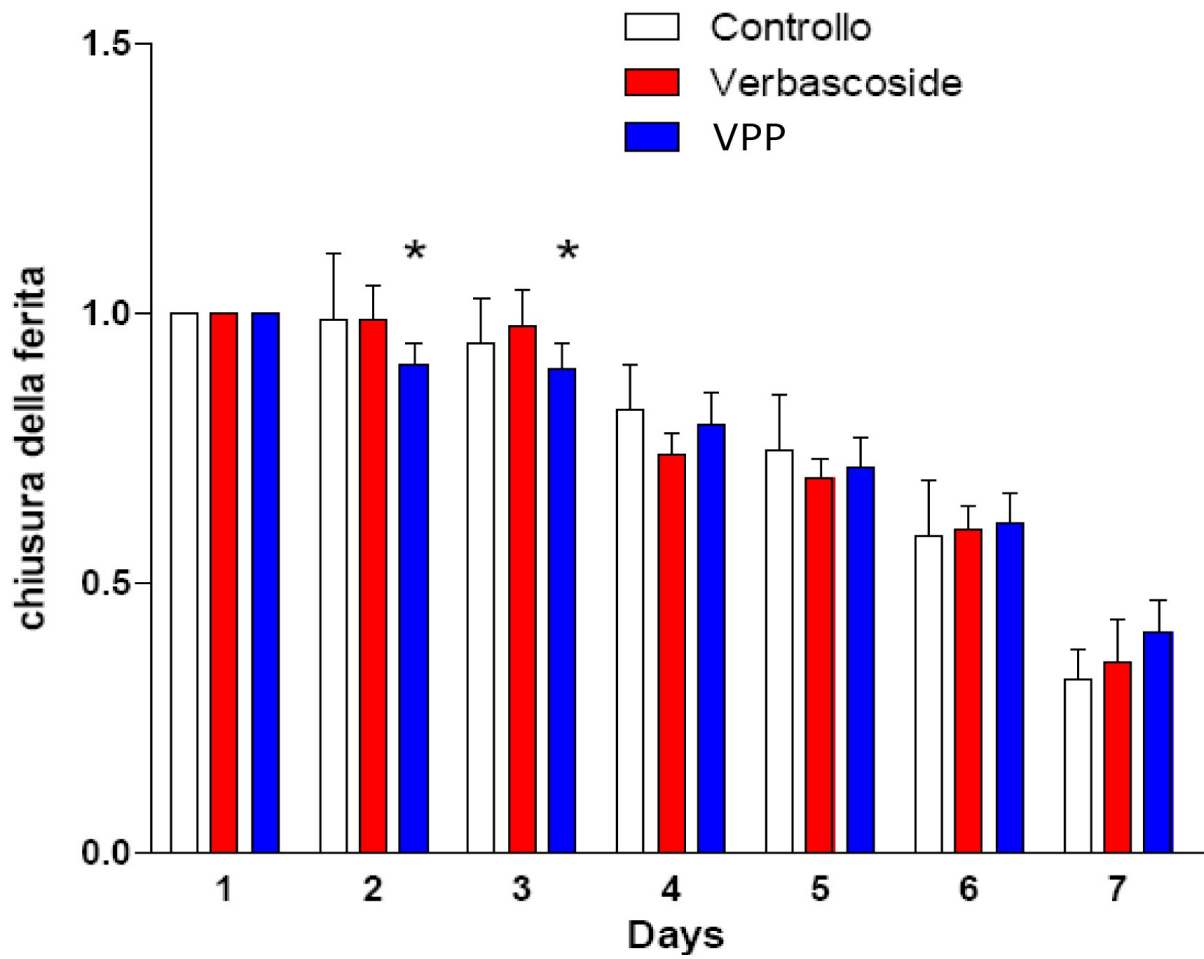
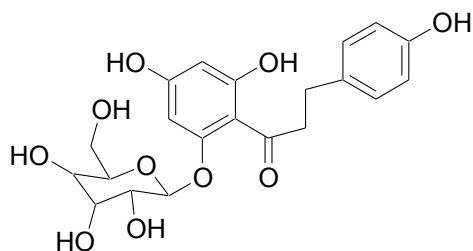


Figura 12: Chiusura della ferita Verbascoside VS VPP

4. FLORIZINA

4.1 La molecola



La florizina è il principale glucoside fenolico presente nell'albero del melo in modo particolare nelle seguenti parti: corteccia, radici, germogli e foglie⁷⁵. In letteratura vengono riportate le attività fisiologiche che la florizina svolge e sono: la crescita e lo sviluppo degli alberi⁷⁶⁻⁷⁷ e come aglicone (Floreina) ha un'attività fungicida⁷⁸. Il prodotto di ossidazione della florizina costituisce il colore caratteristico dei succhi di mela e di sidro⁷⁹. La florizina presente nel sidro, che ne conferisce il caratteristico gusto, ha concentrazioni variabili (3 a 16 mg/100ml) che dipendono dal tipo di coltura da cui si ricava il prodotto⁸⁰. L'utilizzo della cromatografia liquida ha permesso di rilevare la presenza della florizina nel succo di mela⁸¹ e nella mela stessa⁸². È stato dimostrato quindi che le bucce contengono 12-418 mg/kg florizina, mentre la polpa contiene da 4 a 20 mg/kg, queste variazioni dipendono dalla qualità della mela, infatti con Golden Delicious abbiamo un contenuto maggiore di florizina invece con Reineta Verde si verifica una quantità bassissima della molecola in esame.

I flavonoidi, tra cui i diidrocalconi fenilpropanoidi come florizina, sono metaboliti prodotti da tutte le famiglie di piante soprattutto nelle Asteraceae che hanno proprietà antiossidanti e scavenging dell'anione superossido⁸³, ossigeno singoletto⁸⁴ e dei radicali perossidi lipidici⁸⁵. In letteratura è stato dimostrato che i calconi sono pigmenti vegetali gialli, appartenenti alla classe dei flavonoidi.

Bioattività

L'interesse per questa sostanza iniziò a crescere in ambito farmaceutico come strumento per comprendere la fisiologia umana. Si dimostrò che la sua somministrazione cronica nei cani provocava gli stessi sintomi del diabete mellito: poliuria, perdita di peso e glicosuria. Studi successivi permisero di considerare la glicosuria indotta da Florizina come un metodo di valutazione della funzionalità renale nell'uomo. Essa funziona da inibitore competitivo dei trasportatori del glucosio sodio-linked (SGLT1 e SGLT2), riducendo quindi l'assorbimento intestinale ed il riassorbimento renale del glucosio. È stato inoltre dimostrato che attraverso questo meccanismo, la Florizina abbassa il tasso glicemico ematico in ratti diabetici, mentre nei ratti normali non si riscontra alcun effetto relativamente ai livelli plasmatici di glucosio.

Queste azioni, pertanto, hanno suggerito una possibile applicazione della Florizina nella gestione degli stati di iperglicemia acuta o come adiuvante nel trattamento del diabete mellito, caratterizzato da isulino-resistenza associata a iperglicemia⁸⁶. Un possibile utilizzo può essere previsto anche nel trattamento dell'obesità visto il suo meccanismo d'azione a livello renale e intestinale⁸⁷.

In topi ovariectomizzati è stata osservata la capacità di prevenire l'osteoporosi, mostrando un potenziale effetto preventivo sulla progressione del riassorbimento osseo riscontrato nelle donne in postmenopausa⁸⁸.

Altri studi sulla florizina e suoi derivati riguardano l'attività antiossidante in vitro, con una vasta gamma di funzioni biologiche correlate, come l'inibizione della perossidazione lipidica, prevenzione di perdita ossea, valorizzazione della memoria così come l'inibizione della crescita delle cellule tumorali⁸⁹⁻⁹⁰. I fenilpropanoidi sono componenti molto interessanti tra i composti fenolici in modo particolare per eventuali applicazioni dermatologiche in quanto innanzitutto inibiscono l'attività dei radicali liberi, proteggendo la pelle dai raggi, ma ancora più significativa è l'attività protettiva che queste molecole hanno evidenziato sul DNA plasmidico nei confronti delle radiazioni ultraviolette⁹¹. Questi effetti, in base all'attività antiossidante, sono molto interessanti per il campo dermocosmetico in vista della crescente attenzione dei dermatologi verso i danni al DNA indotti dai raggi solari.

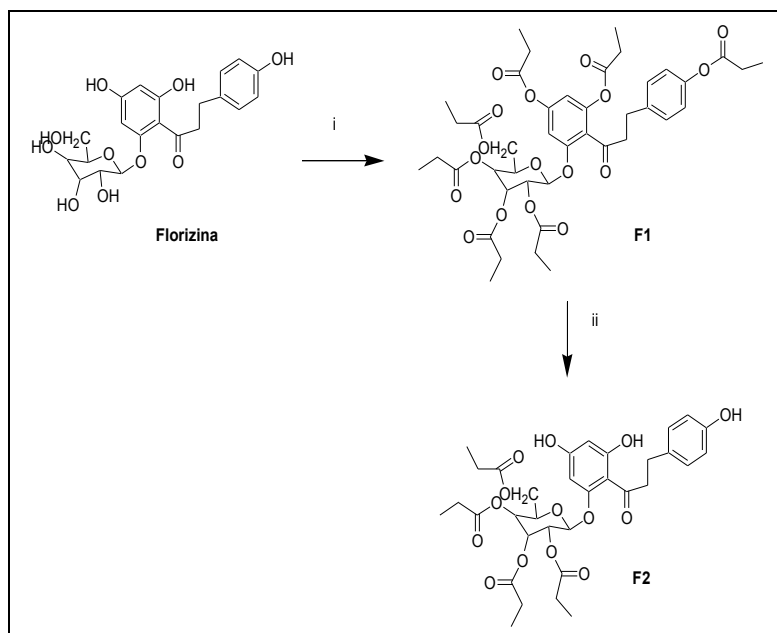
4.2 Risultati e discussioni

4.2.1 Sintesi del derivato della Florizina

La Florizina, in virtù della sua struttura chimica, è altamente solubile in fase acquosa.

In considerazione dei numerosi vantaggi, dal punto di vista dell'attività biologica abbiamo deciso di modificare la struttura della Florizina al fine di ottenere una molecola più lipofila, con l'obiettivo di aumentarne il range di applicazioni, di valutarne la stabilità e le proprietà.

Tutte le funzionalità idrossiliche della Florizina sono state esterificate usando il propionil-cloruro in presenza di 4-dimetilaminopiridina (4-DMAP) e successivamente si è effettuata una deprotezione selettiva degli ossidrili fenolici usando N,N,N-trietilamina (TEA) in metanolo per ottenere il derivato F2 (Florizina tetra Propionata) (Schema2).⁹²



Schema 2. Sintesi del derivato tetra-propionato della Florizina .i: DMAP, Propionil Cloruro, CH_2Cl_2 , ii: TEA, MeOH.

4.2.2 Coefficiente di ripartizione ottanolo- H_2O

Al fine di misurare le proprietà lipofile delle molecole, è stato valutato il loro coefficiente di ripartizione (LogP), calcolato come il logaritmo del rapporto delle concentrazioni della sostanza in ottanolo e acqua.

Questa determinazione è stata effettuata analogamente alla valutazione del coefficiente di ripartizione ottanolo- H_2O del Verbascoside e del suo derivato di semisintesi riportato alla pagina 23. I dati sono descritti in Tabella 2 e mostrano una differenza significativa nella distribuzione di F2, più alta in ottanolo rispetto all'acqua (LogP), a differenza della Florizina che è meno concentrata in ottanolo con un valore di LogP pari a 0,94. Questi dati suggeriscono che F2, essendo più lipofilo rispetto alla Florizina, possa distribuirsi nella fase lipidica delle formulazioni invertendo così sia la solubilità che la parte attiva della formulazione (Tabella 4).

	Ottanolo (mg/20ml)	H_2O (mg/20ml)	LogP*
Florizina	4,48	0,52	0,94
F2	4,925	0,075	1,82

$$*\text{Log P} = \log_{10} [\text{mg}/20\text{ml}] \text{ octanol}/[\text{mg}/20\text{ml}]\text{H}_2\text{O}$$

Tabella 4. Coefficiente di partizione della Florizina e F2 in un sistema bifasico ottanolo-acqua.

4.2.3 Analisi antiossidanti

4.2.3.1 Analisi ORAC

Questo saggio, descritto a pag 23 ci permette di capire che capacità antiossidante hanno la Florizina e il suo derivato nei confronti dei radicali perossilici.

I risultati del test ORAC mostrano, per quanto riguarda la Florizina ed il suo derivato F2, un'elevata attività antiossidante rispetto al radicale perossilico, con risultati migliori per la Florizina rispetto all'F2 (215508.03 e 13719.73 $\mu\text{mol TE/grammo}$ rispettivamente).

Questo dato probabilmente è dovuto al fatto che, essendo F2 più lipofilo, non si solubilizza perfettamente nel PBS (Tabella 5).

Composto	$\mu\text{moli TE/ grammo}$
Florizina	21558,03 \pm 1.8
F2	13719,73 \pm 2.1

Tabella 5. Analisi ORAC della Florizina e F2. Ciascun valore è stato ottenuto da tre esperimenti (media \pm SE).

4.2.3.2 Analisi PCL

La metodica PCL (photochemiluminescence), spiegata a pag 25 viene utilizzata per valutare la capacità antiossidante delle molecole in esame nei confronti dell'anione superossido.

La Florizina e il suo derivato di semisintesi F2 sono stati testati per determinare la loro capacità antiossidante come tali ed in seguito, con la stessa metodica, sono state analizzate due formulazioni base dermocosmetiche contenenti i due composti.

Nel caso del derivato semisintetico F2, si è osservata un'attività antiossidante paragonabile a quella della molecola naturale di partenza (0.336 e 0.34 mmol Trolox/gr rispettivamente) (Figura 13). Inoltre si può osservare come la Florizina e il suo derivato di semisintesi abbiano uno scarso potere antiossidante nei confronti dell'anione superossido.

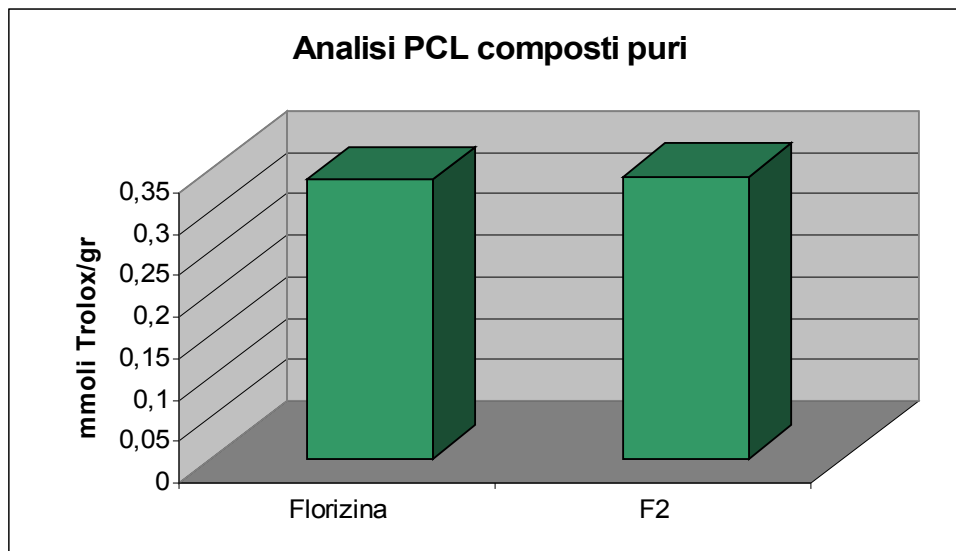


Figura 13. *Analisi PCL della Florizina e F2. Ciascun valore è stato ottenuto da tre esperimenti (media \pm SE).*

L'analisi PCL delle due formulazioni base ad un primo aspetto potrebbe sembrare aumentata, in realtà il valore ottenuto è comunque molto basso per questo confrontabile con la capacità antiossidante dei composti puri. (Figura 14).

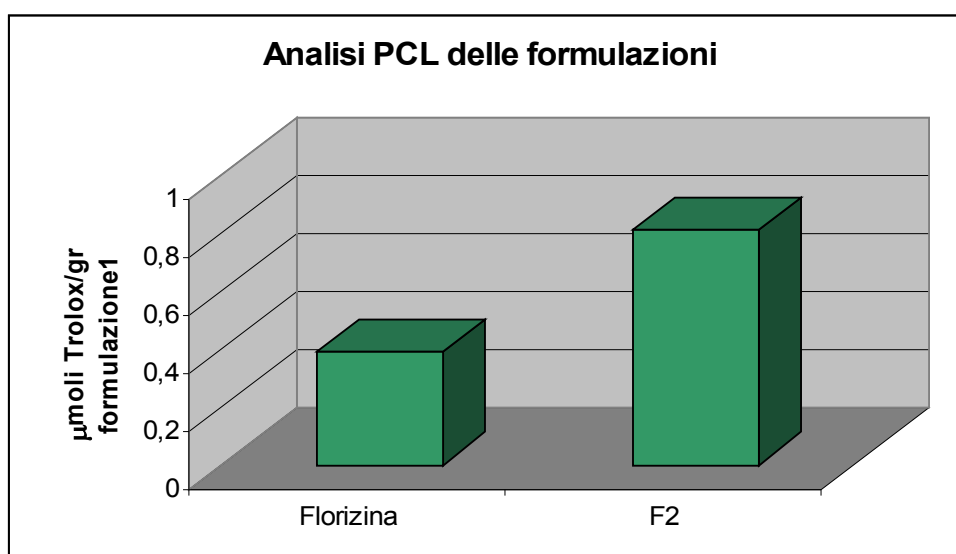


Figura 14. *Analisi PCL delle formulazioni 1 contenenti Florizina e F2.. Ciascun valore è stato ottenuto da tre esperimenti (media \pm SE).*

4.2.4 Stabilità in formulazioni dermocosmetiche

Sulla base dei dati, si è deciso di continuare gli studi inerenti queste molecole valutando la loro stabilità all'interno di formulazioni dermocosmetiche allo 0,3% (p/p) e sottoponendo tali formulazioni ad invecchiamento accelerato in stufa a 40°C.

Come per il Verbascoside (pag. 27) e il suo derivato di semisintesi sono state preparate due diverse formulazioni cosmetiche:

- Formulazione 1: una base cosmetica preparata con emollienti, emulsionanti ed altri ingredienti che non hanno alcuna proprietà antiossidante;
- Formulazione 2: formulazione con ingredienti totalmente privi di acqua.

Le formulazioni sono state sottoposte ad invecchiamento accelerato a 40°C per monitorare le variazioni dei prodotti. Questo studio (dati non riportati) ha mostrato che le formulazioni contenenti florizina assumono una colorazione marrone inoltre si evidenzia una separazione dell'emulsione O/W. Poiché questa variazione non è accettabile, abbiamo deciso di focalizzare la nostra attenzione esclusivamente sulle formulazioni contenenti F2.

La stabilità dei componenti attivi è stata monitorata tramite HPLC analitico in questo modo possiamo valutare la degradazione della molecola in esame in funzione del tempo.

Abbiamo osservato che dopo 150 giorni in stufa a 40° C il calo percentuale di F2 nella formulazione 1 è stato solo del 6% (Figura 15) invece nella formulazione 2 abbiamo riscontrato un calo dell'8%.

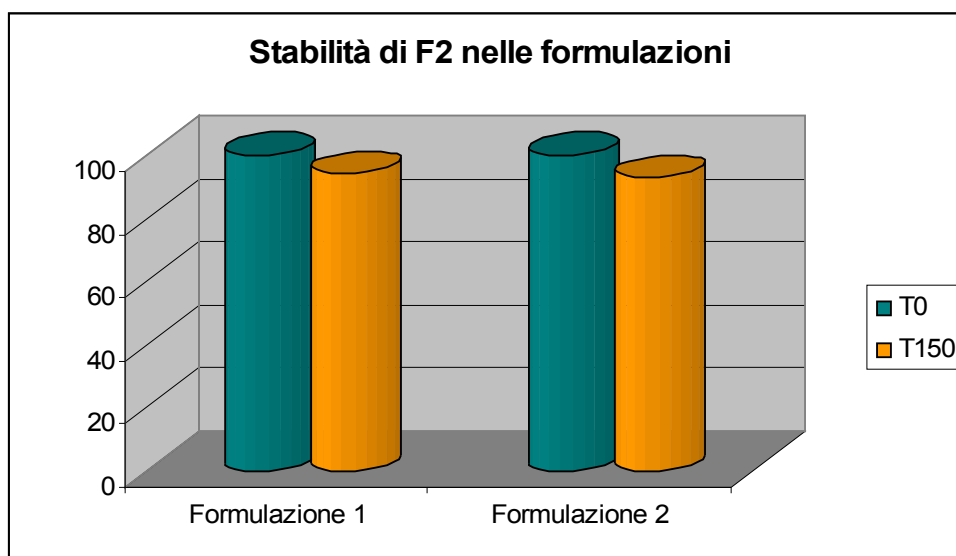


Figura 15: Recupero percentuale di F2 nelle diverse formulazioni conservate a 40°C. Ciascun valore è stato ottenuto da tre esperimenti (media ± SE).

4.2.5 Attività antifungina

Al fine di verificare la possibile attività antifungina della Florizina e di F2 sono stati utilizzati, come precedentemente descritto a pag 28 per il Verbascoside e per VPP, nove funghi dermatofiti da poter definire uno spettro d'azione il più possibile completo.

Fungo	% Inibizione di crescita al 7° giorno alle concentrazioni di Florizina (µg/mL) di		% Inibizione di crescita al 7° giorno alle concentrazioni di F2 (µg/mL) di	
	20	100	20	100
<i>Epidermophyton floccosum</i>	+	+	+	+
<i>Trichophyton rubrum</i>	+	+	4.1 ± 0.3	4.0 ± 0.7
<i>Trichophyton tonsurans</i>	13.1 ± 1.1	7.1 ± 0.9	3.1 ± 0.4	8.0 ± 1.5
<i>Trichophyton violaceum</i>	0.7 ± 0.1	5.1 ± 1.2	20.1 ± 1.8	18.1 ± 1.7
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	+	+	22 ± 0.9	18.1 ± 0.7
<i>Microsporum gypseum</i>	4.1 ± 0.5	+	13.0 ± 1.2	16.0 ± 0.3
<i>Nannizzia cajetani</i>	+	+	9.1 ± 0.5	16.0 ± 1
<i>Microsporum canis</i>	+	7 ± 0.8	24.0 ± 1.1	31.6 ± 1.4
<i>Nannizzia gypsea</i>	0	+	11.0 ± 0.6	20.1 ± 0.8

Tabella 6: Inibizione della crescita a seguito di trattamento con lo standard puro Florizina ed il derivato semisintetico F2.

Come mostrato in Tabella 6, l'attività antifungina della florizina e del suo derivato F2, non è soddisfacente: infatti in tutti i casi le percentuali di inibizione sono piuttosto basse, si evidenzia solo un'inibizione della crescita del fungo pari al 31.63 % raggiunto F2 sul *Microsporum canis* alla concentrazione più elevata. In altri casi la sostanza ha mostrato un effetto ormone-simile con una crescita fungina superiore a quella dei controlli (+). Questo evento è finora inspiegabile e aspetta le future indagini circa il possibile meccanismo d'azione: F2 è considerato un pro-farmaco del florizina e dovrebbe comportarsi con lo stesso meccanismo d'azione.

4.2.6 Attività antinfiammatoria (Fibrosi Cistica)

L'infiammazione cronica è una condizione evidente nella fibrosi cistica (FC) che colpisce prevalentemente l'apparato respiratorio. In questo tipo di patologie sono presenti sia infezioni batteriche che infiammazione cronica e la domanda che ancora oggi gli studiosi si pongono è: viene prima l'infiammazione o l'infezione?

Nei soggetti affetti da questa patologia alla nascita i polmoni appaiono sani e liberi da infiammazione o ostruzione delle vie aeree. Tuttavia si da subito l'alterata funzionalità della proteina CFTR, porta alla formazione di muco denso difficilmente eliminabile dalla clearance muco-ciliare o da meccanismi flusso dipendenti (tosse). Di conseguenza il ristagno di muco costituisce un ambiente favorevole per la crescita batterica e questo crea un'elevata infiammazione

localizzata a livello polmonare. Si instaura così un circolo vizioso, che necessita costantemente di cure farmacologiche. Nei pazienti FC è presente anche un'elevata risposta immunitaria innata fino dai primi mesi di vita e questa condizione contribuisce all'aggravamento della malattia; l'eccessivo quadro infiammatorio, infatti, porta anche alla progressiva distruzione tissutale che, a lungo andare, conduce all'insufficienza respiratoria: principale causa di mortalità.

L'infezione iniziale generalmente è causata da *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae*. Segue poi, per la maggior parte dei pazienti, *Pseudomonas aeruginosa* ed, in misura minore, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes xylosoxidans* e *Burkholderia cepacia*⁹³.

Queste componenti batteriche (antigeni) si legano ai recettori *Toll like* (TLR) attivando i fattori di trascrizione NF-kB e AP-1 che regolano alcuni geni pro infiammatori. In questo modo aumenta la produzione di citochine pro-infiammatorie, tra cui l'interleuchina 8, e altri mediatori dell'infiammazione che richiamano neutrofili polimorfonucleati (PMN) nella regione infetta.

I neutrofili hanno una doppia azione fisiopatologica: da un lato essi hanno un fondamentale ruolo di difesa contro agenti esogeni; dall'altro un accumulo prolungato nel tempo di queste cellule causa dei danni tissutali, in questo per pazienti affetti da Fibrosi cistica il tessuto coinvolto è quello polmonare caso quello polmonare⁹⁴.

Studi effettuati sulla saliva e sul fluido di lavaggio bronco-alveolare (BALF) di pazienti affetti da fibrosi cistica hanno dimostrato la presenza di elevate concentrazioni di citochine pro-infiammatorie come interleuchina-1 (IL-1), interleuchina-6 (IL-6), interleuchina-8 (IL-8) e TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*)⁹⁵ la cui sintesi viene promossa dal fattore di trascrizione NF-kB. Aumentati valori di IL-6 e TNF- α si sono riscontrati anche nel sangue⁹⁶.

Inoltre questi pazienti hanno concentrazioni elevate di acido arachidonico soprattutto nelle vie aeree ed i suoi metaboliti, leucotrieni B₄ ed E₄, sono stati ritrovati nelle urine e nella saliva, in quantità elevate rispetto al normale⁹⁷⁻⁹⁸.

Al contrario in questi pazienti la citochina anti-infiammatoria IL-10 diminuisce e quindi non è più presente il suo controllo su macrofagi, linfociti e neutrofili nell'epitelio alveolare⁹⁹.

Quindi lo squilibrio esistente tra citochine con attività opposta induce una massiva risposta infiammatoria persistente.

Per questo motivo tutte le attività biologiche della Florizina, descritte sopra, ci portano a pensare che possa essere utilizzata nel trattamento della FC, inoltre in letteratura è riportato uno studio effettuato all'università di Taiwan che cerca di studiare ed evidenziare l'effetto anti-infiammatorio della Floretina (aglicone della Florizina) e Florizina nei macrofagi di topi in cui è stata precedentemente indotta infiammazione con lipopolisaccaride. La Floretina ha causato l'abbassamento dei livelli di NO, PGE₂, IL-6 e TNF- α e l'inibizione della traslocazione di NF-kB nel nucleo; sorprendentemente però non si è ottenuto lo stesso risultato con Florizina¹⁰⁰.

Quindi in questo studio abbiamo deciso, in collaborazione con i laboratori del Prof. Gambari, di valutare una possibile inibizione dell'attività infiammatoria delle molecole in esame nella patologia della Fibrosi Cistica.

Lo studio sugli analoghi strutturali della Florizina è iniziato eseguendo saggi preliminari di *binding* effettuati sulla Florizina stessa e sul suo aglicone, la Floretina. Poiché, come è noto il fattore di trascrizione NF-kB è in grado di regolare l'espressione di diversi geni che codificano per proteine coinvolte nel complesso meccanismo infiammatorio cellulare, questo fattore di trascrizione è stato preso come bersaglio molecolare per osservare l'eventuale attività anti-infiammatoria dei due polifenoli *in vitro*. Quindi in saggi EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) è stata evidenziata la capacità dei derivati in esame di interferire con la formazione dei complessi che si formano tra il fattore di trascrizione e sonde di DNA, contenenti una specifica sequenza consenso per il fattore di trascrizione NF-kB. La proteina purificata p50, subunità polipeptidica maggiore del dimero NF-kB p50/p65, è stata incubata con concentrazioni scalari di Florizina e Floretina. Questa tecnica si basa sulla capacità che i complessi DNA/proteina, caricati su gel di poliacrilammide al 6%, hanno di migrare in modo più ritardato rispetto al DNA non legato producendo in questo modo uno *shift* nella migrazione delle bande di DNA.

Dagli esperimenti effettuati con p50 (Figura 16) si può notare che la Florizina è in grado di inibire la formazione del complesso tra il fattore di trascrizione NF-kB e il DNA bersaglio solo a partire da una concentrazione 10 mM.

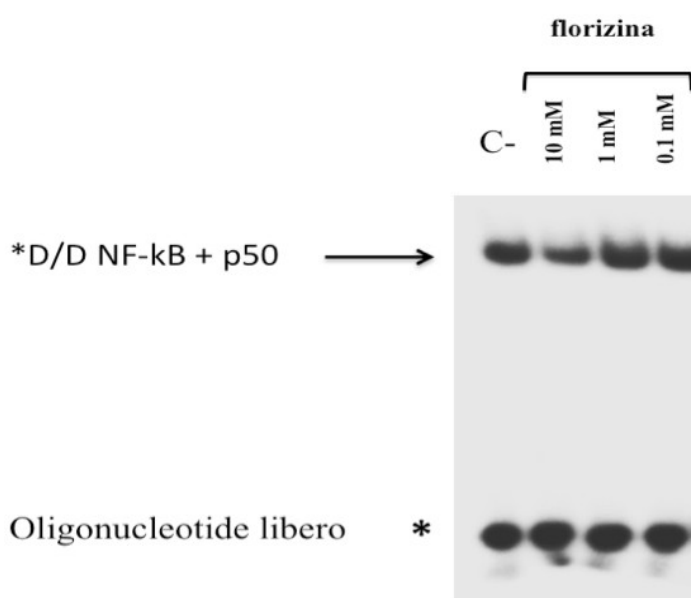


Figura 16: EMSA eseguito con Florizina a concentrazioni scalari, incubata con la subunità polipeptidica p50 del dimero p50/p65 e la sonda radiomarcata *DNA/DNA NF-kB. La freccia indica il complesso DNA/NF-kB, mentre l'asterisco indica la sonda non legata.

La Floretina invece possiede un effetto inibente la formazione del complesso già ad una concentrazione 250 μ M (Figura 17).

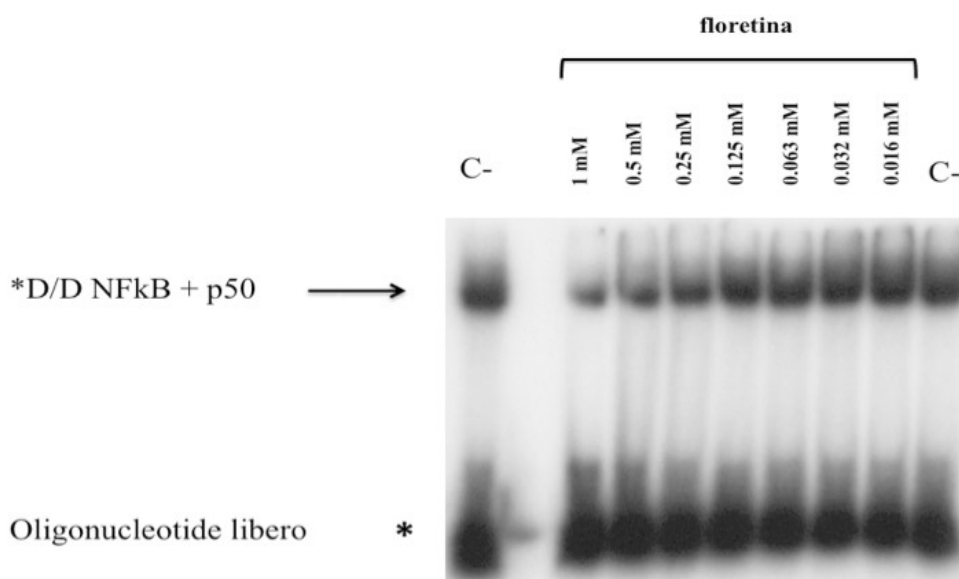


Figura 17: EMSA eseguito con Floretina a concentrazioni scalari, incubata con la subunità polipeptidica p50 del dimero p50/p65 e la sonda radiomarcata *DNA/DNA NF-kB. La freccia indica il complesso DNA/NF-kB, mentre l'asterisco indica la sonda non legata

Partendo da questa evidenza, gli studi sono continuati utilizzando un modello cellulare adatto allo studio dell'inflammation polmonare in pazienti affetti da fibrosi cistica: le cellule umane IB3-1 derivate da un paziente con genotipo mutato. Queste cellule sono state trattate sia con Florizina e Floretina e, successivamente, con i derivati F1 ed F2 per valutare l'attività antiproliferativa dei composti in esame sulle cellule IB3-1.

I dati ottenuti sono stati riassunti e riportati in grafico (Figura 18) valutando la percentuale di crescita cellulare alle concentrazioni utilizzate. Per estrapolazione grafica sono stati calcolati i valori di IC_{50} , che corrispondono ai valori di concentrazione di composto in grado di inibire la crescita cellulare del 50% rispetto alle cellule di controllo non trattate (100% di crescita cellulare); generalmente questo dato permette di determinare le concentrazioni più efficaci per trattamenti cellulari successivi.

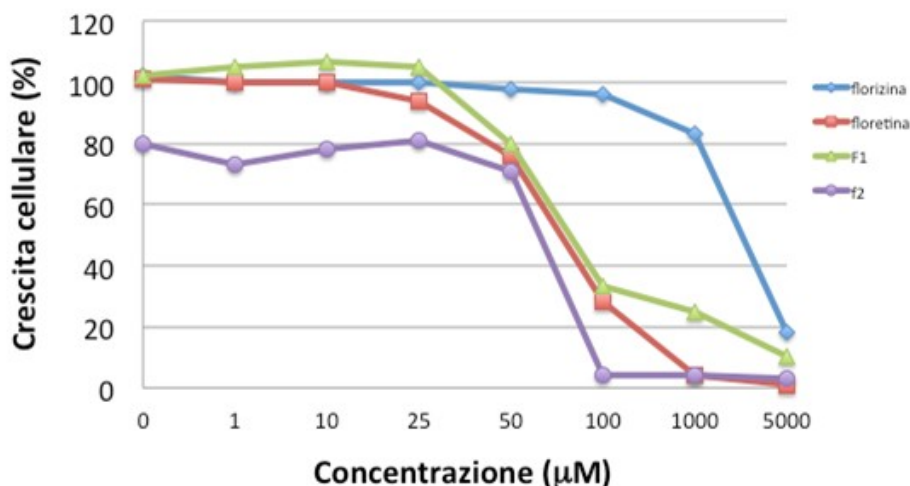


Figura 18: Effetto antiproliferativo di Florizina, Floretina, F1, F2 su cellule IB3-1. Conta cellulare effettuata con Coulter Counter.

Composto	IC50
Florizina	2,82±0,43mM
Floretina	330±17,04µM
Florizina Eptapropionata (F1)	84,48±9,52µM
Florizina Tetrapropionata (F2)	65,66±6,30µM

Tabella 7: Attività antiproliferativa di Florizina, Floretina, F1 e F2 su cellule IB3-1. Medie e le Deviazioni Standard indicate sono state ottenute da almeno tre esperimenti indipendenti.

I risultati ottenuti dimostrano che i composti possiedono diversa attività antiproliferativa sulle cellule IB3-1: la Florizina, il derivato glicosilato, possiede un valore di IC_{50} molto elevato, mentre i valori dell'aglicone Floretina e dei derivati sintetici F1-F2, essendo molto più bassi e nell'ordine del micromolare, dimostrano un'attività antiproliferativa molto più marcata. Valutando questi esperimenti, il composto che determina un effetto antiproliferativo maggiore sembra essere il derivato F2.

Successivamente, in funzione dei dati ottenuti, sono stati eseguiti degli esperimenti sulla trascrizione genica utilizzando sempre le cellule IB3-1 di epitelio polmonare con fibrosi cistica.

Più precisamente, le cellule sono state seminate in piastre da 6 o 12 pozzetti, il giorno seguente sono state trattate con concentrazioni crescenti e prossime ai valori di IC_{50} delle sostanze in esame e, 5 ore dopo il trattamento, è stato aggiunto TNF- α (100 ng/ml *Fattore di Necrosi Tumorale* che attiva NF-kB) per indurre l'infiammazione. In questo modo i geni dipendenti da NF-kB, inclusi quelli che codificano per la citochina pro-infiammatoria IL-8 (presente ad elevate concentrazioni nei polmoni FC), vengono attivati. Dopo un'incubazione di 24 ore con Florizina, Floretina, F1 ed F2 in presenza di TNF- α , è stato isolato l'RNA dalle cellule per analizzarne l'espressione genica.

L'RNA estratto è stato poi retrotrascritto ed amplificato mediante q-RT PCR; nella *real time* PCR quantitativa sono stati utilizzati *primers* specifici per l'amplificazione del gene IL-8 e del gene GAPDH (gene *house keeping* di riferimento) fisiologicamente espresso dalla cellula a valori costanti. Il TNF- α stimola un'over-espressione di IL-8 e quindi, per valutare l'eventuale attività dei derivati nel ridurre l'espressione di questa citochina, è stato fatto un confronto con un controllo negativo, costituito dalle cellule non trattate, e con un controllo positivo, rappresentato dalle cellule trattate con TNF- α ma non con i polifenoli.

Come è possibile osservare in Figura 19, la Florizina non dimostra alcuna attività, mentre la Floretina inibisce in maniera significativa i livelli di mRNA codificante per IL-8 a concentrazioni comprese tra 5 e 10 μ M.

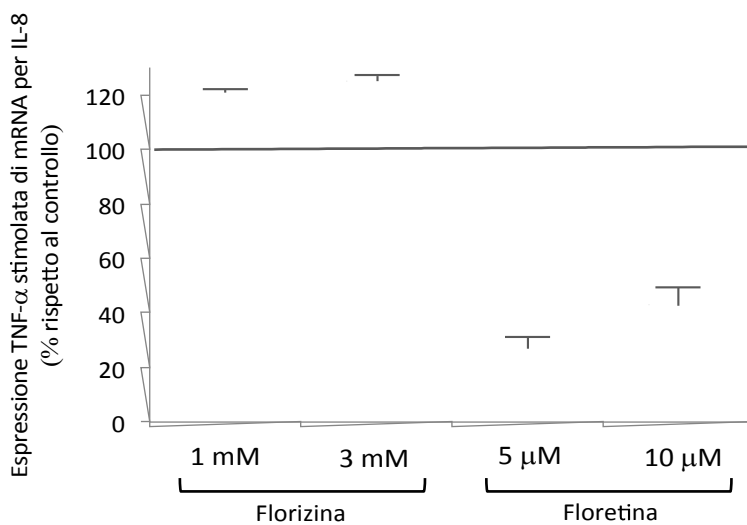


Figura 19: Espressione di mRNA per IL-8 dopo trattamento con Florizina e Floretina

Anche F1 ed F2 inibiscono di circa il 50% i livelli di mRNA stimolato con TNF- α codificante per IL-8 alla concentrazione di 5 μ M (Figura 20).

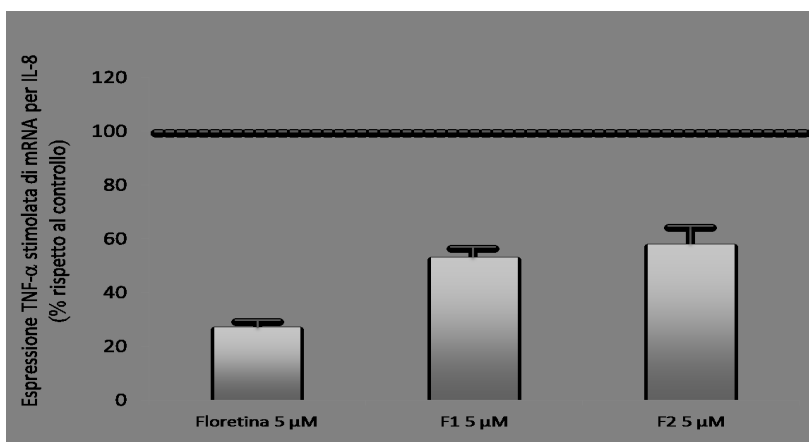


Figura 20: Espressione di mRNA per IL-8 dopo trattamento con Floretina, F1 ed F2 5 μ M.

4.2.7 Wound Healing

Analogamente, agli esperimenti effettuati sul processo di cicatrizzazione di una ferita (wound healing) utilizzando il Verbascoside e il suo derivato di semisintesi (pag 30), abbiamo deciso d'indagare se la Florizina ed F2 possono migliorare il wound healing cutaneo.

4.2.7.1 Vitalità e citossicità cellulare

Dalla figura 21 si osserva che alle concentrazioni 1 μ M e 10 μ M sia la Florizina che l'F2 hanno un effetto analogo sulla vitalità cellulare. Per quanto riguarda la Florizina, non dimostra avere un effetto citotossico neanche alla concentrazione 50 μ M, mentre alla medesima concentrazione il suo derivato di sintesi (F2) presenta un calo di vitalità cellulare pari al 30 %.

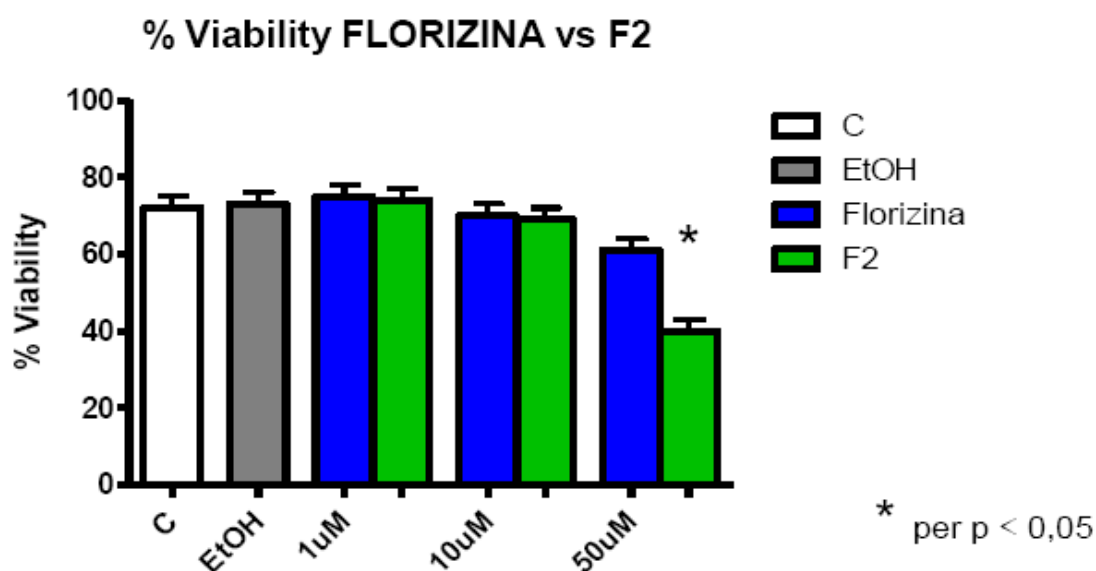


Figura 21: Vitalità cellulare della Florizina VS F2.

La figura 7.2B mostra i livelli di rilascio nel surnatante dell'enzima lattato deidrogenasi (LDH), il quale è un indice di lisi cellulare e relativa morte cellulare. Il Triton X-100 è un tensioattivo utilizzato per ottenere il 100% di lisi cellulare (controllo positivo), si utilizza per fornire agli operatori i parametri di citotossicità in misura percentuale. Nella figura 22 non sono presenti variazioni di rilascio di LDH alle concentrazioni 1 e 10 μ M, mentre il composto F2 presenta un'elevata citotossicità a 50 μ M pari al 64%.

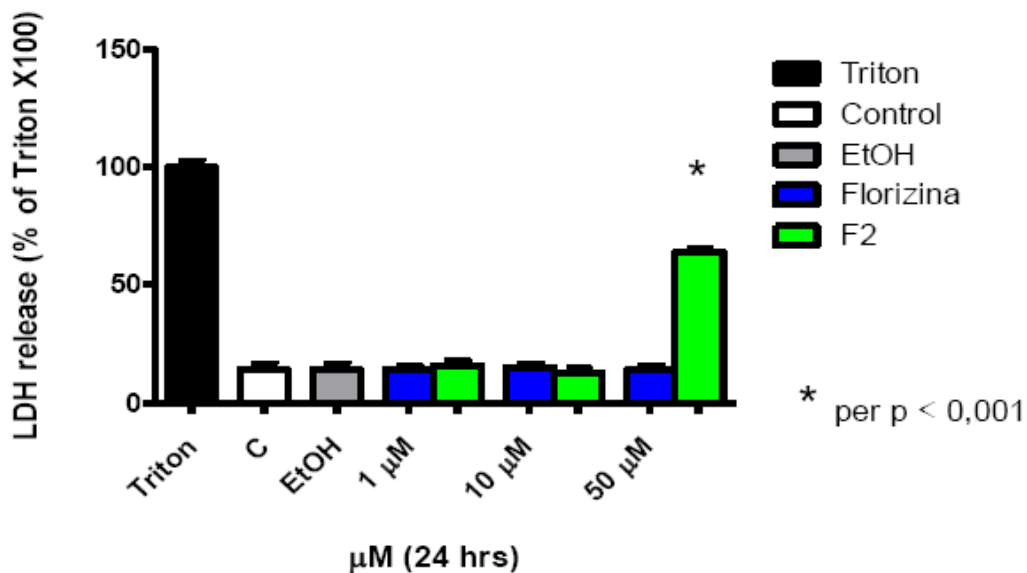


Figura 22: Rilascio di LDH della Florizina VS F2

4.2.7.2 Wound healing in vitro

Come per il Verbascoside e il suo derivato di semisintesi sono stati testati nel modello del “graffio” anche Florizina ed F2. Dalla figura 23 non è visibile una differenza significativa tra la Florizina ed il suo derivato F2. Nelle figura 24 il derivato F2 non mostra caratteristiche migliori di chiusura del graffio rispetto al composto naturale Florizina, il quale risulta il 14% più efficace rispetto al veicolo. Nella figura 25 non è più visibile una grande differenza tra i due composti, i quali stimolano il processo di wound healing del 15 % circa

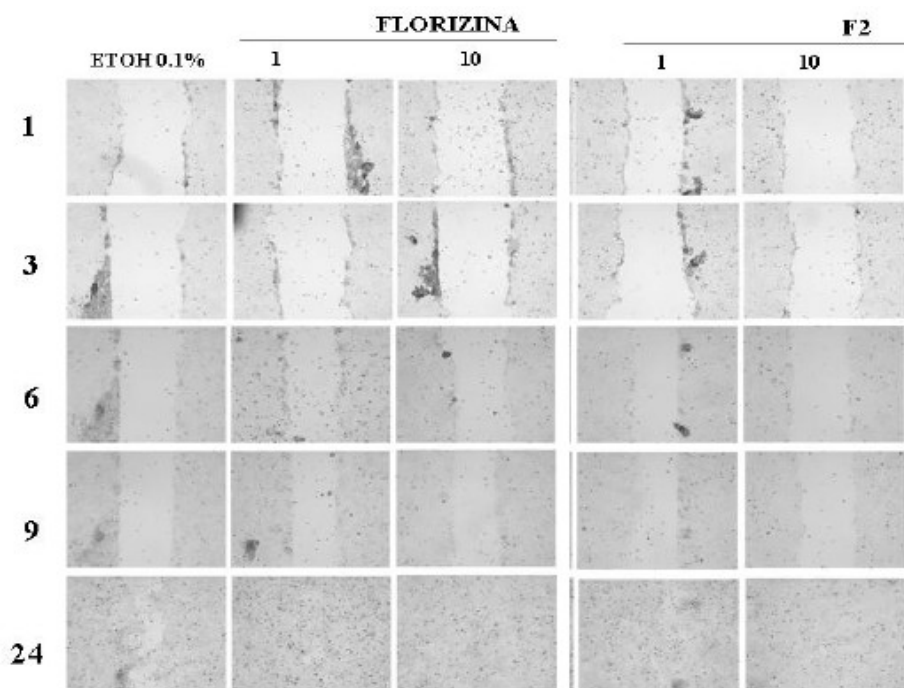


Figura 23: Immagini al microscopio della chiusura del graffio ai tempi 1, 3, 6, 9, 24 h

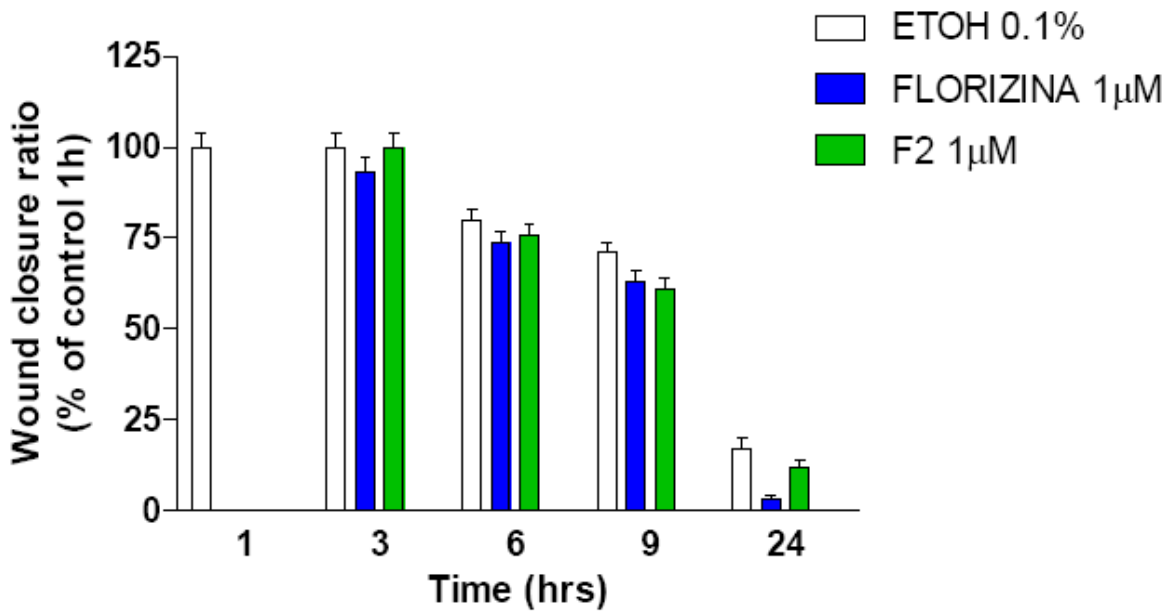


Figura 24: Chiusura del graffio a 1 μM

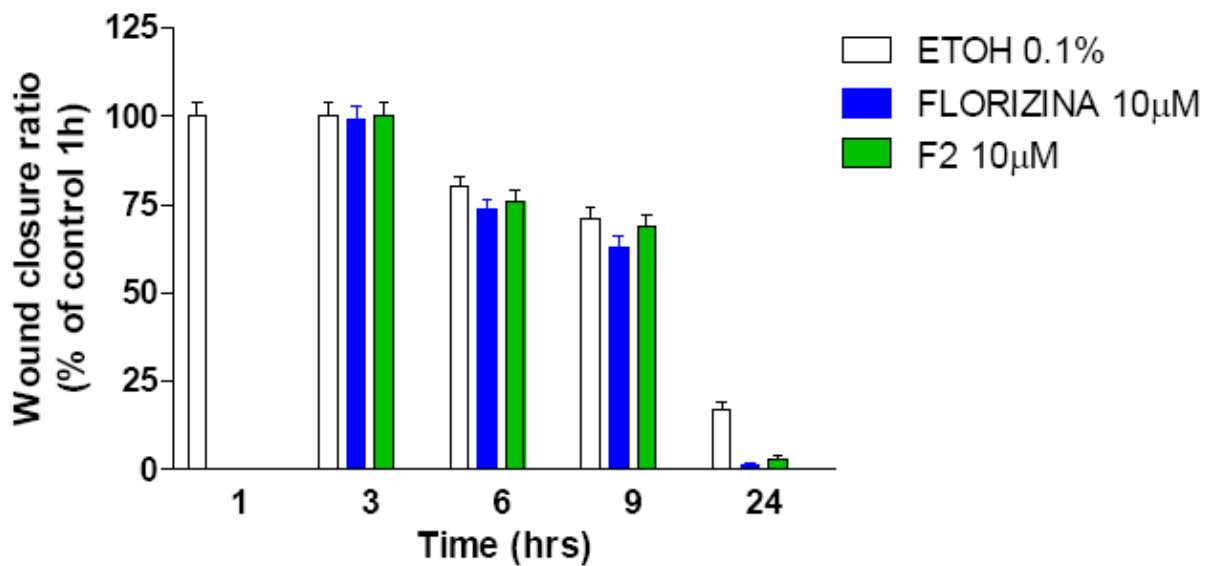


Figura 25: Chiusura del graffio a 10 μM

4.2.7.3 Wound healing in vivo

Visti i promettenti risultati abbiamo deciso di testare i composti anche in vivo, questa analisi è già stata eseguita per il verbascoside e il suo derivato di semisintesi, è riportata alla pagina 34.

La fase iniziale del wound healing è un passaggio molto critico a causa dell'esposizione della ferita "aperta" agli agenti esterni, accorciando questa fase cala in maniera significativa il pericolo di infezioni batteriche e il periodo totale di guarigione della ferita. Rispetto al modello in vitro il composto F2 sembra essere il più efficace nel promuovere il processo di wound healing in vivo.

Infatti F2 risulta efficace fino al giorno 6, con un aumento della velocità di cicatrizzazione del 15% circa (figura 26).

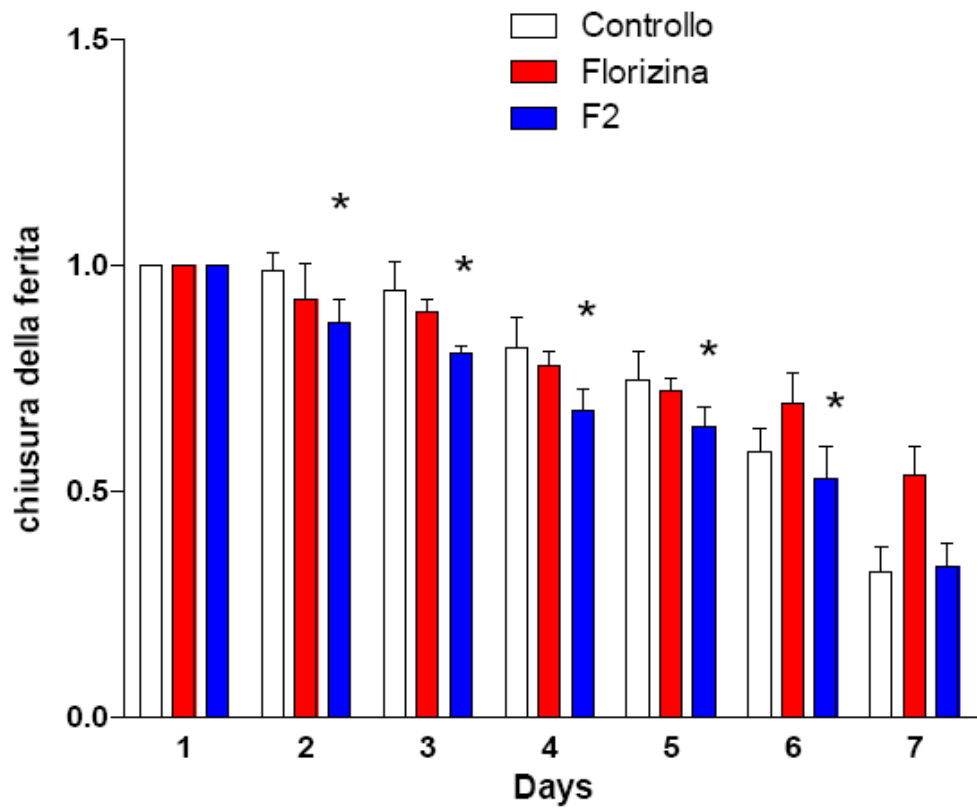
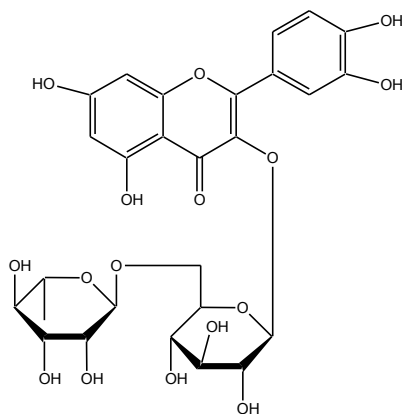


Figura 26: Chiusura della ferita Florizina VS F2

5. RUTINA

5.1 La molecola



La rutina è un bioflavonoide naturale derivante dalla quercitina ed è molto abbondante nel regno vegetale. Infatti questo glicoside si trova in moltissimi prodotti come: noci, frutta, polpa e scorze di arancio, aglio, uva, limone, lime, pesche, mele, come peperoni verdi e gialli, cipolle, broccoli, prezzemolo, tè nero, cereali integrali ecc....¹⁰¹.

Molti studi riportano una sorprendente attività fisiologica e farmacologica della rutina sia in sistemi in vivo che in vitro. Le attività più importanti che questa molecola ha sono: antiinfiammatoria, antimicrobica, antitumorale e antiasma; queste proprietà sono dovute alla capacità che la rutina ha di inibire i radicali liberi che si formano fisiologicamente all'interno delle cellule. Inoltre è molto interessante osservare che la rutina è risultata essere molto più stabile contro l'ossidazione rispetto all'aglicone (quercetina). La rutina viene spesso utilizzata in associazione con la l'acido ascorbico perché ne aumenta l'assorbimento e quindi potenzia la sua attività antiossidante¹⁰¹.

Antiossidante

La potente attività antiossidante della rutina è dovuta alla presenza di 2 anelli fenolici che hanno gli ossidrili liberi e quindi possono inibire le reazioni radicaliche. Alla concentrazione di 0,05mg/ml la rutina riesce ad inibire le reazioni radicaliche del 90,4%, questo risultato è confrontabile con l'attività della Vitamina C che, alla stessa concentrazione, è in grado di ridurre i radicali del 92,8%, al contrario la rutina è in grado di raddoppiare l'attività antiossidante del BHT, che riesce ad inibire la reazione radicaliche del 58,8%¹⁰²⁻¹⁰³.

Antinfiammatoria

La rutina può essere una buona molecola antinfiammatoria perché in letteratura è riportato che può inibire la trascrizione di oltre 20 geni che codificano proteine pro-infiammatorie come TNF- α , IL-1, IL-8. Inoltre questa molecola (50-100 μ M) protegge la barriera vascolare perché è in grado

d'inibire: l'espressione di molecole che facilitano l'adesione cellulare, la permeabilità vascolare e la migrazione dei leucociti, tutti questi fenomeni inibiscono l'infiammatoria nelle malattie vascolari¹⁰⁴. Infine Guardia et al hanno dimostrato che la Rutina ha un elevato effetto antinfiammatorio rispetto al suo aglicone (quercitina). In letteratura è, anche dimostrata, l'efficacia della rutina nel ridurre i processi infiammatori nell'artrite reumatoide e nell'osteoporosi¹⁰⁵.

Altre attività biologiche

Altre ricerche scientifiche dimostrano come la rutina potrebbe ritardare il danno renale, per questo si può ipotizzare il suo utilizzo per la prevenzione della precoce neuropatia dovuta al diabete. Infatti l'attività antidiabetica della Rutina è stata dimostrata dal gruppo di ricerca di Stanely Mainzen Principe perché hanno scoperto che nei ratti affetti da diabete mellito, somministrando questa molecola, si evidenzia un miglioramento nell'omeostasi del glucosio¹⁰⁶.

La rutina ha anche un'attività antitumorale che è stata osservata in vitro grazie all'inibizione di diverse tipologie di cellule tumorali e in vivo su animali infatti si evidenzia una diminuzione della massa tumorale¹⁰⁷.

Inoltre la Rutina in combinazione con la lovastatina abbassa il livello di colesterolo in modelli animali¹⁰⁸. Infine in letteratura è anche evidente come la rutina e la quercetina insieme inibiscono l'ossidazione di HDL e LDL, questo meccanismo d'azione può essere fondamentale nella prevenzione dell'aterosclerosi¹⁰⁹⁻¹¹⁰.

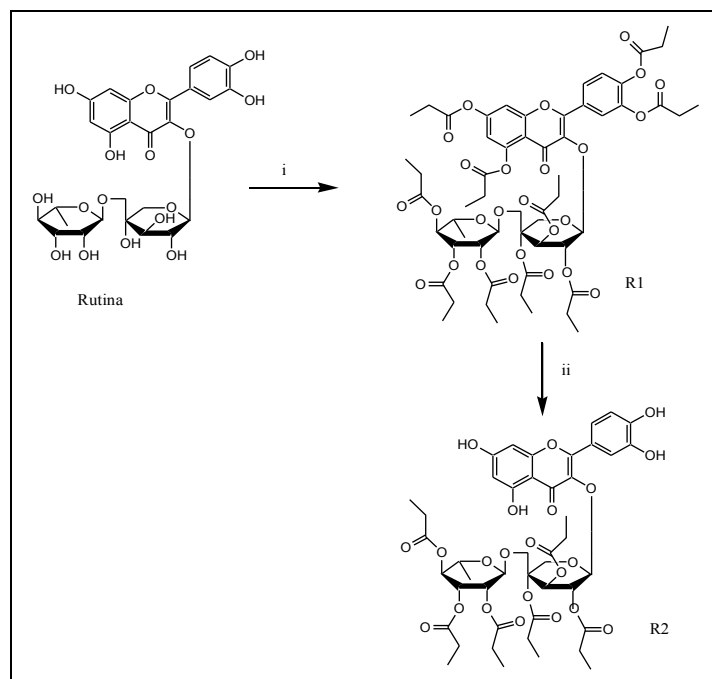
5.2 Risultati e discussioni

5.2.1 Sintesi del derivato della Rutina

La Rutina, in virtù della sua struttura chimica, è altamente solubile in fase acquosa.

In considerazione dei numerosi vantaggi, dal punto di vista dell'attività biologica abbiamo deciso di modificare la struttura della Rutina al fine di ottenere una molecola più lipofila, con l'obiettivo di aumentarne il range di applicazioni, di valutarne la stabilità e le proprietà anti-ossidanti.

Tutte le funzionalità idrossiliche della Rutina sono state esterificate usando il propionil-cloruro in presenza di 4-dimetilaminopiridina (4-DMAP) e successivamente si è effettuata una deprotezione selettiva degli ossidrili fenolici usando N,N,N-trietilamina (TEA) in metanolo per ottenere il derivato R2 (Rutina Propionato) (Schema 3).



Schema 3. Sintesi del derivato sesta-propionato della Rutina .i: DMAP, Propionil Cloruro, CH_2Cl_2 , ii: TEA, MeOH.

5.2.2 Coefficiente di ripartizione ottanolo- H_2O

Al fine di misurare le proprietà lipofile delle molecole, è stato valutato il loro coefficiente di ripartizione (LogP), calcolato come il logaritmo del rapporto delle concentrazioni della sostanza in ottanolo e acqua.

Questa determinazione è stata effettuata analogamente alla valutazione del coefficiente di ripartizione ottanolo- H_2O del Verbascoside, di VVP, della Florizina e di F2 riportati rispettivamente alle alle pagine 23 e 38. I dati sono descritti in **Tabella 8** e mostrano una differenza significativa nella distribuzione di R2, più alta in ottanolo rispetto all'acqua (LogP), a differenza della Rutina che è meno concentrata in ottanolo con un valore di LogP pari a -0.64. Questi dati suggeriscono che R2, essendo più lipofilo rispetto alla Rutina, possa distribuirsi nella fase lipidica delle formulazioni invertendo così sia la solubilità che la parte attiva della formulazione.

	Ottanolo (mg/20ml)	H_2O (mg/20ml)	LogP*
Rutina	0,91	4,0	-0,64
R2	4,63	0,37	1,09

$$* \text{LogP} = \log_{10} [\text{mg}/20 \text{ mL}]_{\text{octanol}} / [\text{mg}/20 \text{ mL}]_{H_2O}.$$

Tabella 8. Coefficiente di partizione della Rutina e di R2 in un sistema bifasico ottanolo-acqua.

5.2.3 Analisi antiossidante

5.2.3.1 Analisi ORAC

Questo saggio, descritto a pag. 23 ci permette di capire che capacità antiossidante hanno la Rutina e il suo derivato nei confronti dei radicali perossilici.

I risultati del test ORAC mostrano, per quanto riguarda la Rutina e il suo derivato R2, un'elevata attività antiossidante rispetto al radicale perossilico, con risultati migliori per la Rutina rispetto ad R2 (10708,6 e 728,61 $\mu\text{mol TE/grammo}$ rispettivamente).

Questo dato probabilmente è dovuto al fatto che, essendo R2 più lipofilo, non si solubilizza perfettamente nel PBS (Tabella 9).

Composto	$\mu\text{moli TE/ grammo}$
Rutina	10708.06 \pm 2.0
R2	728.61 \pm 1.5

Tabella 9. Analisi ORAC della Rutina e R2. Ciascun valore è stato ottenuto da tre esperimenti (media \pm SE).

5.2.3.2 Analisi PCL

La metodica PCL (photochemiluminescence), spiegata a pag. 25 viene utilizzata per valutare la capacità antiossidante delle molecole in esame nei confronti dell'anione superossido.

La Rutina e il suo derivato di semisintesi R2 sono stati testati per determinare la loro capacità antiossidante come tali ed in seguito, con la stessa metodica, sono state analizzate due formulazioni dermocosmetiche contenenti i due composti.

Nel caso del derivato semisintetico R2, si è osservata un'attività antiossidante poco più bassa rispetto alla molecola naturale di partenza (mmolTrolox/gr rispettivamente) (Figura 27). Inoltre si può osservare come la Rutina e il suo derivato di semisintesi abbiano uno scarso potere antiossidante nei confronti dell'anione superossido.

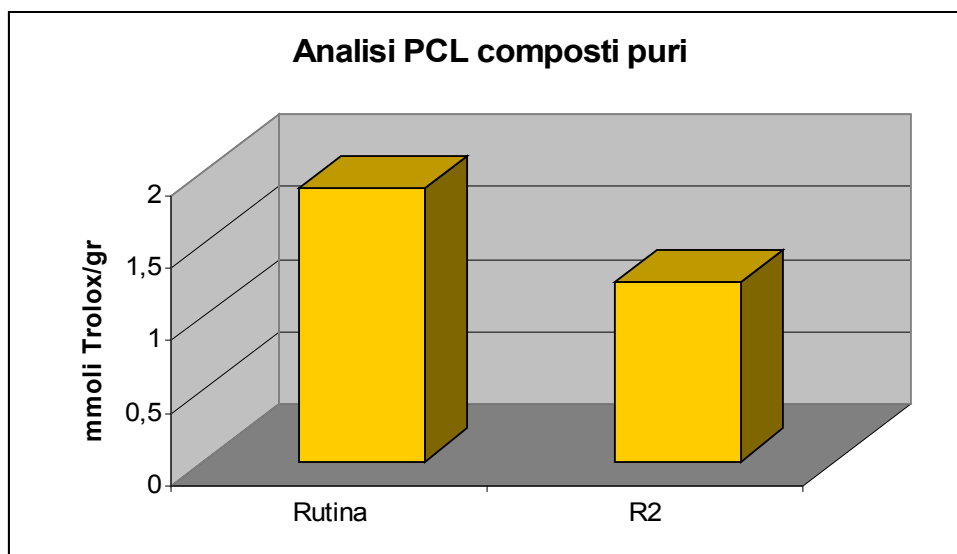


Figura 27. *Analisi PCL della Rutina e R2. Ciascun valore è stato ottenuto da tre esperimenti (media \pm SE).*

L'analisi PCL delle due formulazioni base ci fa notare come la proporzionalità della capacità antiossidante della Rutina e di R2 rimanga invariata rispetto ai composti puri (Figura 28).

L'analisi PCL delle stesse formulazioni sottoposte ad invecchiamento accelerato in stufa a 40°C per 150 giorni ha confermato il potere antiossidante osservato in precedenza (dati non mostrati).

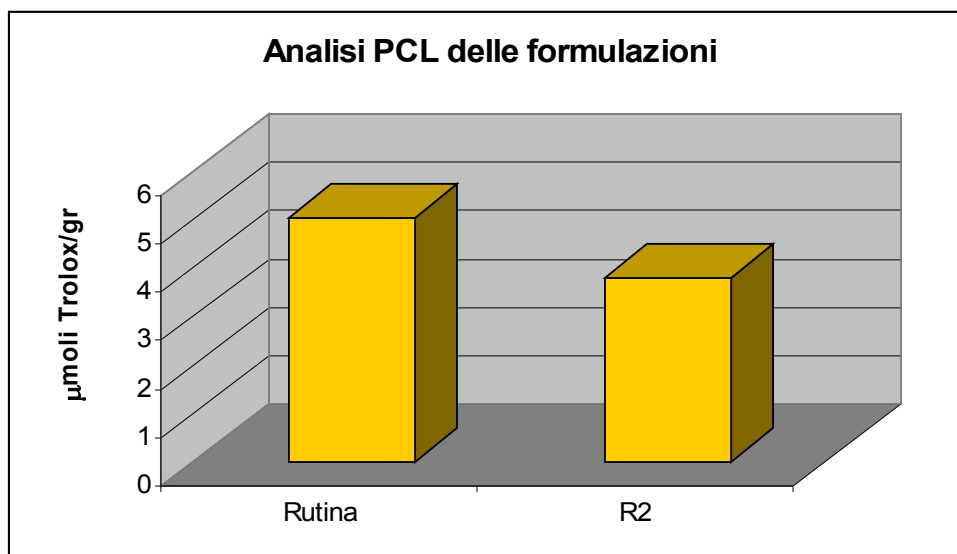


Figura 28. *Analisi PCL delle formulazioni 1 contenenti Rutina e R2. Ciascun valore è stato ottenuto da tre esperimenti (media \pm SE).*

5.2.4 Stabilità in formulazioni dermocosmetiche

Sulla base dei dati, si è deciso di continuare gli studi inerenti queste molecole valutando la loro stabilità all'interno di formulazioni dermocosmetiche allo 0,3% (p/p) e sottoponendo tali formulazioni ad invecchiamento accelerato in stufa a 40°C.

Come per il Verbascoside, la Florizina e i loro derivati di semisintesi sono state preparate due diverse formulazioni cosmetiche:

- Formulazione 1: una base cosmetica preparata con emollienti, emulsionanti ed altri ingredienti che non hanno alcuna proprietà antiossidante.

- Formulazione 2: formulazione con ingredienti totalmente privi di acqua.

La stabilità dei componenti attivi è stata monitorata tramite HPLC analitico in questo modo possiamo valutare la degradazione della molecola in esame in funzione del tempo.

L'indagine ha evidenziato che la Rutina in entrambe le formulazioni 1 e 2 (Figura 29) dopo 150 giorni in stufa è completamente stabile.

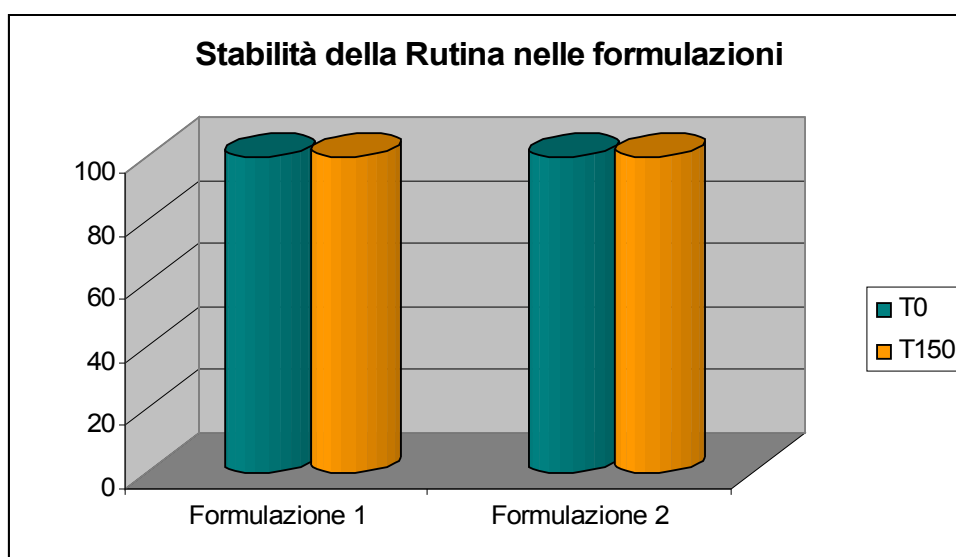


Figura 29. Recupero percentuale della Rutina nelle diverse formulazioni conservate a 40°C. Ciascun valore è stato ottenuto da tre esperimenti (media \pm SE).

Per quanto riguarda invece il derivato R2, abbiamo osservato, dopo 150 giorni in stufa, una diminuzione di circa il 27% nella formulazione 1, mentre nella formulazione 2 l'ingrediente attivo ha una diminuzione del 30% (Figura 30).

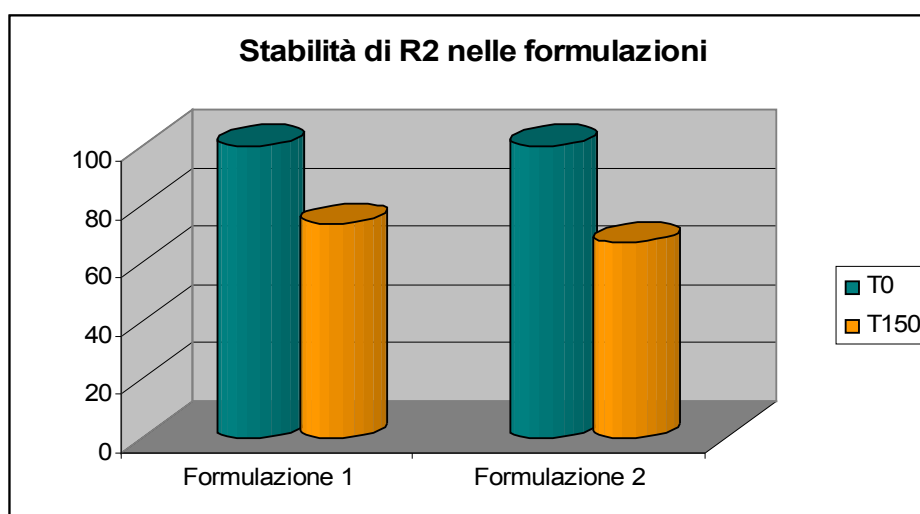


Figura 30. Recupero percentuale di R2 nelle diverse formulazioni conservate a 40°C. Ciascun valore è stato ottenuto da tre esperimenti (media \pm SE).

5.2.5 Attività antifungina

Al fine di verificare la possibile attività antifungina della Rutina e di R2 sono stati utilizzati, come precedentemente descritto a pag. 28, nove funghi dermatofiti da poter definire uno spettro d'azione il più possibile completo.

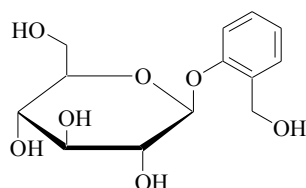
Fungo	% Inibizione di crescita al 7° giorno alle concentrazioni di Rutina ($\mu\text{g/mL}$) di		% Inibizione di crescita al 7° giorno alle concentrazioni di R2 ($\mu\text{g/mL}$) di	
	20	100	20	100
<i>Epidermophyton floccosum</i>	1.92	2.24	+	+
<i>Trichophyton rubrum</i>	6.01	9.87	+	+
<i>Trichophyton tonsurans</i>	0	2.78	5.38	10.75
<i>Trichophyton violaceum</i>	2.08	4.17	10.71	15.82
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	0	3.28	0	5.71
<i>Microsporum gypseum</i>	0	4.11	+	+
<i>Nannizzia cajetani</i>	3.28	12.30	+	+
<i>Microsporum canis</i>	++	++	0	0
<i>Nannizzia gypsea</i>	+	+	1.99	7.95

Tabella 10. Inibizione della crescita a seguito di trattamento con lo standard puro Rutina ed il derivato semisintetico R2.

Come mostrato in Tabella 10, l'attività antifungina della Rutina e del suo derivato R2, non è soddisfacente: infatti in tutti i casi le percentuali di inibizione sono piuttosto basse, si evidenzia solo un'inibizione della crescita del fungo pari al 15.82% raggiunto R2 sul *Trichophyton violaceum* alla concentrazione più elevata. In altri casi la sostanza ha mostrato un effetto ormone-simile con una crescita fungina superiore a quella dei controlli (+). Questo evento è finora inspiegabile e aspetta le future indagini circa il possibile meccanismo d'azione: R2 è considerato un pro-farmaco della Rutina e dovrebbe comportarsi con lo stesso meccanismo d'azione.

6. SALICINA

6.1 La molecola



La salicina è un glicoside costituito da alcol salicilico e D-glucosio. La storia di questa molecola e della classe farmacologica a cui appartiene, i salicilati, hanno origini molto lontane. Basti pensare che la scoperta delle sue potenzialità benefiche risale al 400 a.C., anche se le sue virtù terapeutiche vengono menzionate già nel codice assiro di Ebers¹¹¹, all'incirca 2000 anni prima di Cristo, ed in alcune tavolette sumeriche del terzo millennio a.C.¹¹². Nel 1758 Stone iniziò a studiare le foglie del salice e fece due costatazioni importanti che provavano l'efficacia del fitocomplesso; dapprima, assaggiando la corteccia di un salice, si accorse che era molto amara, tanto da paragonarla alla "corteccia del Perù" o "corteccia dei gesuiti", ovvero dell'albero di china. Questa similitudine forniva un indizio sul suo utilizzo visto che l'arbusto di china ha come habitat le Ande peruviane e veniva utilizzato dagli indigeni per curare gli accessi febbrili in corso di malaria (già introdotto nella medicina europea per opera di missionari gesuiti); notò, inoltre, che anche il salice cresceva in terreni umidi ed acquitrinosi dove la malaria era endemica, per cui non poteva non essere utile per quella patologia.

Settant'anni dopo, dapprima il chimico italiano Raffaele Piria¹¹³, e poi nel 1897, due chimici tedeschi, Felix Hoffman e Heinrich Dreser, riuscirono a mettere definitivamente a punto la produzione di acido acetilsalicilico a partire dalla Salicina. Nei successivi 87 anni, quindi fino ai giorni nostri, questa molecola è diventata di uso comune come attività antinfiammatoria.

Bioattività

Antinfiammatoria

La Salicina, come i salicilati e i glicosidi fenolici in generale, possiede proprietà analgesiche, antiinfiammatorie ed antipiretiche.

Il meccanismo d'azione utilizzato per ottenere l'effetto analgesico è il medesimo che consente di avere attività antinfiammatoria ed antipiretica: l'inibizione delle ciclossigenasi con conseguente soppressione della sintesi di prostaglandine (in particolare PGE2), importanti mediatori del dolore, dell'infiammazione e della febbre.

L'attività della Salicina è più blanda sulle COX rispetto ai salicilati che presentano il gruppo acilico (vedi l'acido acetilsalicilico) bloccano l'enzima irreversibilmente acetilandolo, reazione che non può essere effettuata dalla Salicina. D'altro canto, però, essendo assorbita al livello duodenale e non nello stomaco, non si osserva irritazione della mucosa gastrica (effetto collaterale tipico dell'acido acetilsalicilico se somministrato per lunghi periodi). L'assorbimento non gastrico deriva dal fatto che essa agisce da profarmaco (Figura 31) per cui deve essere convertita nell'aglicone (alcol salicilico) dai batteri dell'intestino crasso e successivamente ossidata ad acido salicilico a livello epatico per poter essere attiva. Ciò si traduce in un maggior tempo di assorbimento e un più graduale instaurarsi dell'effetto.

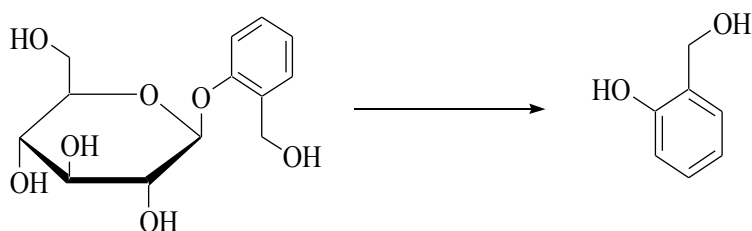


Figura 31. Conversione della Salicina in Acido Salicilico.

In letteratura viene riportato uno studio clinico sull'estratto secco di Salix per chiarire il suo meccanismo d'azione come anti-infiammatorio. In questo studio viene utilizzato il modello della tasca d'aria nel ratto per l'infiammazione acuta e quello dell'artrite da adiuvanti per l'infiammazione cronica. I parametri esaminati includevano l'infiltrazione dei leucociti, i livelli delle citochine e dei prostanoidei nel sangue, gli effetti sulle COX 1, COX 2 e sulla produzione dei radicali liberi. L'azione dell'estratto di salice era paragonata, a parità di dose, a quelle dell'acido acetilsalicilico, un inibitore non selettivo delle COX, e al Celecoxib®, un inibitore selettivo della COX2. Si è visto che questo estratto era altrettanto efficace dell'acido acetilsalicilico nell'inibire gli essudati infiammatori, l'infiltrazione dei leucociti, la soppressione delle prostaglandine e l'aumento delle citochine ed era addirittura superiore per quanto riguardava l'azione soppressiva sui leucotrieni. Anche l'attività sulla COX 2 era superiore a quella dell'acido acetilsalicilico. L'estratto di salice aumentava i livelli di glutathione ridotto, il che limita i fenomeni di lipoperossidazione, e riduceva quelli di malondialdeide, dimostrando di svolgere un'effettiva azione antiossidante. L'azione soppressiva dell'estratto sulla COX2 era lievemente superiore anche a quella del Celecoxib®. Siccome l'estratto ha un titolo in salicina del 24% (peso molecolare 286,2) mentre l'acido acetilsalicilico ha un peso molecolare di 180,3, ne consegue che su base molare, l'estratto contiene circa un sesto di salicina rispetto alla quantità di acido salicilico di confronto.

Ciononostante la potenza d'azione dell'estratto si è dimostrata essere almeno pari a quella del farmaco in questione. La presenza di polifenoli nell'estratto di salice verosimilmente è importante e sinergica con la salicina nello svolgere un'azione antiossidante e in parte anche antiflogistica. Lo studio indica che l'estratto di salice titolato in salicina al 24% è almeno pari come effetto antiflogistico ad una dose uguale di acido acetilsalicilico, con una tollerabilità migliore¹¹⁴.

Antimicotiche

Oltre agli effetti biologici citati fino ad ora, la Salicina ha anche dimostrato attività antimicrobica (estratto all'85% in EtOH, in concentrazione pari a 25kg/ml), ad esempio, contro il virus della poliomielite ma è risultata inattiva su batteri e dermatofiti¹¹⁵, per lo meno in quantità fino a 500 pg/ml.

Tuttavia esistono dei pareri contrastanti a questo proposito, in effetti studi diversi da questo appena citato dimostrano l'efficacia del glucoside sul ceppo batterico *Aeromonas hydrophila*¹¹⁶ e su due famiglie di funghi¹¹⁷ (*Botrytis cinerea* e *Penicillium digitatum*).

Inoltre dati in vitro di estratto acquoso di corteccia di salice secca dimostrano anche attività antifungina contro *Botrytis cinerea* e *Penicillium digitatum*, ma inattiva contro *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus nigricans*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Candida albicans*¹¹⁸.

Un altro esperimento a questo proposito è stato condotto su conigli, sulla cui pelle sono stati applicati dei dermatofiti; dopo lo sviluppo di lesioni cutanee, le aree infette sono state trattate con estratto metanolico di salice fino a guarigione; i tessuti sono stati analizzati anche con test istopatologici, arrivando alla conclusione che l'estratto di salice ha marcata attività contro i dermatofiti¹¹⁹.

6.2 Risultati e discussioni

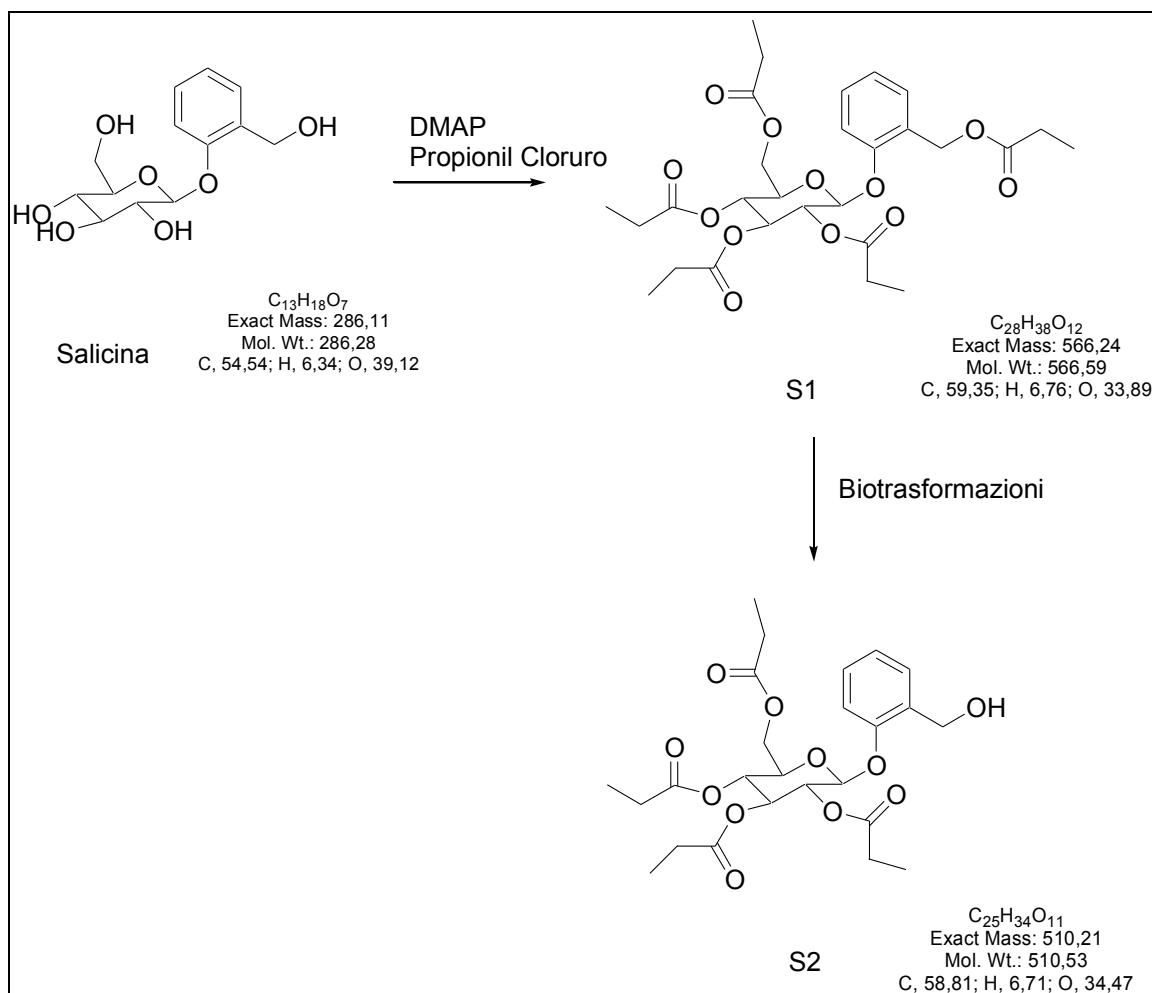
6.2.1 Sintesi del derivato della Salicina

La Salicina è un composto altamente idrosolubile che di conseguenza è scarsamente utilizzabile in mezzi anidri. La modifica attraverso la derivatizzazione, consente sia la sua lipidizzazione che la trasformazione in un derivato potenzialmente dotato di maggiore proprietà di attraversamento delle membrane biologiche.

Tutte le funzionalità idrossiliche della Salicina sono state esterificate usando il propionil-cloruro in presenza di 4-dimetilaminopiridina (4-DMAP) ad ottenere il derivato intermedio semisintetico S1 (schema 4). Lo step successivo di rimozione selettiva dell'ossidrilico benzilico non può essere effettuato secondo la procedura descritta per le altre molecole che prevedeva l'utilizzo di N,N,N-

triethylamina (TEA) in metanolo perché è una metodica specifica per la deprotezione di ossidrilici fenolici, quindi non applicabile al derivato S1.

Per ottenere il derivato S2 (Salicina Tetra Propionata) abbiamo deciso di effettuare questo sblocco selettivo tramite l'approccio delle biotrasformazioni, che ben si presta dato che consente di sviluppare chimica "green".



Schema 4: Sintesi del derivato Tetrapropionato della Salicina.

Le **biotrasformazioni** consistono nell'impiego di enzimi isolati, cellule o organuli cellulari immobilizzati, per operare la conversione di una molecola(substrato) in uno o più prodotti. È importante osservare che tale processo è differente sia dalle **biosintesi** che dalle **biodegradazioni**. Le biosintesi prevedono essenzialmente una sintesi *ex novo* di prodotti, catalizzata da cellule, tessuti, organi o organismi, partendo da composti strutturalmente molto semplici come ad esempio anidride carbonica, ammoniaca o glucosio. Le biodegradazioni invece prevedono un processo catabolico, ovvero in questo caso si ha la conversione di sostanze molecolarmente complesse in altre dalla struttura più semplice¹²⁰.

Uno dei problemi delle biotrasformazioni è quello di capire se sia più conveniente l'impiego di microrganismi (cellule intere), di enzimi opportunamente isolati oppure una combinazione dei due. Ovviamente entrambi i metodi biocatalitici presentano vantaggi e svantaggi che sono elencati in tabella 11.

SISTEMA CATALITICO	VANTAGGI	SVANTAGGI
MICRORGANISMI (cellule integre)	- Economico	- Equipaggiamento di laboratorio di grandi dimensioni - Metodologia di lavoro spesso complessa
	- Cofattore già presente	- Reazioni parallele che possono interferire - Cosolventi mal tollerati
ENZIMI ISOLATI	- Equipaggiamento di laboratorio semplice	- Costoso
	- Metodologia di lavoro semplice	- Necessita la presenza di cofattori oppure del riciclo dello stesso
	- Cosolventi ben tollerati	

Tabella 11. Vantaggi e svantaggi nell'uso di microrganismi e di enzimi isolati¹²¹

Quindi è possibile dedurre che se l'impiego di cellule integre elimina il problema dell'aggiunta dei cofattori alla reazione, dall'altra parte è necessario avere molta esperienza nel settore soprattutto in campo microbiologico e nell'utilizzazione di apparecchiature di fermentazione. Inoltre operativamente il fatto che i microrganismi impiegati sono in un mezzo acquoso e che sviluppano una notevole biomassa può costituire un problema durante la fase di separazione delle cellule dai prodotti.

L'impiego di enzimi isolati è limitato dal loro costo e dalla loro possibile perdita di attività, infatti nonostante gli enzimi siano considerati i migliori catalizzatori per la produzione di composti con un alto livello di purezza¹²² e che il numero di quelli identificati sia elevato, il loro impiego su scala industriale è minore in considerazione ai costi ancora più elevati rispetto all'utilizzo di cellule.

Gli enzimi si distinguono in sei grandi classi in base alla loro attività enzimatica:

1. **Idrolasi** (fosfatasi, amilasi, esterasi, peptidasi, lipasi): catalizzano reazioni che comportano la rottura di legami tra carbonio e un diverso atomo (anidridi, ammidi, esteri, glucosidi,...) con l'intervento di una molecola di H₂O. Richiedono come cofattori: acidi, ammine,
2. **Isomerasi** (epimerasi, racemosi, mutasi): catalizzano le reazioni di isomerizzazione; agiscono su miscele racemiche, isomeri cis e trans, ossidoriduzioni intramolecolari.
3. **Liasi** (aldolasi, decarbossilasi, deidrasi): catalizzano l'addizione (o l'eliminazione) di gruppi a doppi legami; agiscono su legami C=C, C=O, C=N (escluso il legame peptidico).
4. **Ligasi** (DNA-ligasi, AA-sintetasi): catalizzano la formazione o rottura di legami covalenti C-O, C-S, C-N, C-C, atti ad unire due molecole diverse a spese della rottura di un legame pirofosfato nell'ATP.
5. **Ossidoriduttasi** (deidrogenasi, ossidasi, per ossidasi): catalizzano le reazioni di ossidoriduzione, ossigenazione di legami C-H, C-C, C=C, C=O. Per questa classe di enzimi è sempre presente il cofattore specifico (ad es. NAD⁺/NADH).
6. **Transferasi** (transaminasi, transcarbossilasi): catalizzano reazioni di trasferimento di gruppi funzionali (aldeidico, fosforico, metilico,...) da una molecola ad un'altra.

Sulla base di queste osservazioni e, dei riscontri bibliografici, gli approcci di biocatalisi che abbiamo deciso di utilizzare sono 3:

- 1_Baker's Yeast
- 2_Reazioni Cellulari con i *Penicillium*
- 3_Reazioni Enzimatiche

1_Baker's Yeast

In letteratura abbiamo trovato un articolo dove veniva evidenziata l'idrolisi del benzil acetato tramite Baker's Yeast¹²³. Dalla tabella riportata nell'articolo (tabella 12) si può notare che l'idrolisi del benzil acetato avviene al 100% dopo 48 ore.

Per questo motivo abbiamo deciso di procedere per valutare se fosse possibile, anche per S1, l'idrolisi selettiva dell'estere benzilico.

No.	Ester	Substrate conversion (%)		
		4 h	24 h	48 h
1	Phenyl acetate	26	75	100
2	Phenyl heptanoate	15	52	100
3	<u>Benzyl acetate</u>	28	62	<u>100</u>
4	Benzyl propanoate	27	50	100
5	Ethyl pentanoate	47	88	100
6	Methyl benzoate	0	0	0
7	Ethyl benzoate	0	0	0
8	Phenyl benzoate	0	0	0
9	Benzyl benzoate	0	0	0

Tabella 12: Sono riportate le rese delle reazioni che vengono effettuate tramite Baker's Yeast.

Abbiamo proceduto come descritto nell'articolo cioè sciolto il substrato (S1) in etanolo e posto in agitazione per 48 ore con il Baker's yeast. Dopo 48 ore di reazione la TLC non ha evidenziato la comparsa di una nuova macchia, per questo motivo abbiamo potuto concludere che l'esito della reazione fosse negativo.

Abbiamo poi deciso di procedere in un secondo modo, ovvero aspettare la crescita del lievito per 24 ore prima di aggiungere il substrato, ma anche in questo caso l'esito della reazione è stato negativo.

2_Reazioni Cellulari

In letteratura è noto che i *Penicillium* producono le lipasi che sono classificate come un sottogruppo delle esterasi, quindi hanno la capacità di idrolizzare gli esteri.

Nella collezione di fitopatogeni che abbiamo a disposizione in laboratorio ci sono anche 2 *Penicillium* che sono: *Penicillium digitatum* (ATCC 48947) *Penicillium italicum* (ATCC 48952), per questo abbiamo deciso di tentare anche questo approccio sintetico.

La produzione delle lipasi in questi microorganismi può aumentare considerevolmente se nel terreno di coltura viene aggiunto l'olio extravergine di oliva, questo facilita il rilascio degli enzimi a livello extracellulare¹²⁴. Per questo motivo abbiamo deciso di procedere in modo analogo, ovvero in un primo momento abbiamo indotto i *Penicillium* a produrre le lipasi utilizzando l'olio extravergine di oliva e successivamente abbiamo sciolto S1 in esano per effettuare una biotrasformazione bifasica¹²⁵ che sfrutta l'interfaccia dell'emulsione affinché l'enzima (fase acquosa) e il substrato S1 (esano) possano venire in contatto per reagire.

Dopo aver fatto crescere i *Penicillium* per 48 ore abbiamo prelevato il surnatante e messo a reagire con S1, 24 e 48 ore dopo abbiamo eseguito una TLC ma anche in questo caso l'esito dell'esperimento è stato negativo, perché si evidenziava solo S1.

3_Reazioni Enzimatiche

In questo terzo esperimento abbiamo deciso, in collaborazione con il laboratorio della Prof.ssa Pedrini, di valutare 10 lipasi effettuando reazioni bifasiche con S1.

Gli enzimi utilizzati sono stati:

- Lipase from wheat germ type I;
- Liver acetone powder from porcine;
- Lipase from porcine pancreas type II;
- Pancreas acetone powder from horse;
- Lipase from *Candida cylindracea* type VII;
- Lipase from *Aspergillus niger*;
- Lipase from *Penicillium roqueforti*;
- Lipase from *Candida lipolytica*;
- Lipase from *Rhizopus arrhizus*.

Dopo 24 ore in bascula abbiamo eseguito una TLC e abbiamo osservato che la lipase from wheat germ type I portava alla formazione di un nuovo prodotto con RF differente. Quindi attraverso una colonna cromatografica abbiamo isolato il nuovo composto ed eseguito l'IR e l'NMR (H1, C13, DEPT, COSY, HMBC HMQC), che ci hanno permesso di verificare che grazie alla catalisi enzimatica siamo riusciti ad ottenere S2 (Salicina Tetra Propionata). In conclusione gli enzimi, differenza del Baker's Yest e dei *Penicillium*, hanno eseguito la deprotezione selettiva dell'estere benzilico.

6.2.2 Coefficiente di ripartizione ottanolo-H₂O

Al fine di misurare le proprietà lipofile delle molecole, è stato valutato il loro coefficiente di ripartizione (LogP), calcolato come il logaritmo del rapporto delle concentrazioni della sostanza in ottanolo e acqua.

Questa determinazione è stata effettuata analogamente alla valutazione del coefficiente di ripartizione ottanolo-H₂O per le altre molecole descritto a pag.23. I dati sono descritti in Tabella 13 e mostrano una differenza significativa nella distribuzione di S2, più alta in ottanolo rispetto all'acqua (LogP), a differenza della Salicina che è meno concentrata in ottanolo con un valore di LogP pari a -1.22. Questi dati suggeriscono che S2, essendo più lipofilo rispetto alla Salicina, possa distribuirsi nella fase lipidica delle formulazioni invertendo così sia la solubilità che la parte attiva della formulazione.

	Ottanolo (mg/20ml)	H ₂ O (mg/20ml)	LogP*
Salicina	0,28	4,72	-1,22
S2	4,43	0,57	0,89

* LogP = log₁₀ [mg/20 mL]octanol/[mg/20 mL]H₂O.

Tabella 13 Coefficiente di partizione della Salicina e di S2 in un sistema bifasico ottanolo-acqua.

6.2.3 Analisi antiossidanti

6.2.3.1 Analisi ORAC

Questo saggio, descritto a pag. 23 ci permette di capire che capacità antiossidante hanno le molecole in esame nei confronti dei radicali perossilici.

La Salicina non ha mostrato alcuna attività antiossidante nei confronti del radicale perossilico (53.84 μmol TE/grammo). Questo risultato è supportato da dati di letteratura che riportano un'attività antiossidante *in vivo* della molecola naturale Salicina in seguito a rottura del legame glicosidico con liberazione dell'OH fenolico. Questo, *in vitro*, nella metodica ORAC non si può verificare a causa delle condizioni di analisi che prevedono l'utilizzo di un tampone a pH 7.4. Per questo motivo abbiamo deciso di non andare a valutare l'attività antiossidante della nuova molecola S2, visto che è sempre presente il legame glicosidico.

6.2.3.2 Analisi PCL

La metodica PCL (photochemiluminescence), spiegata a pag. 25 viene utilizzata per valutare la capacità antiossidante delle molecole in esame nei confronti dell'anione superossido

Anche in questo caso la Salicina non ha mostrato alcuna attività antiossidante perché le condizioni di analisi non sono sufficienti per idrolizzare il legame glicosidico, quindi abbiamo deciso di non analizzare S2.

6.2.5 Attività antifungina

Al fine di verificare la possibile attività antifungina della Salicina e di S1 sono stati utilizzati, come precedentemente descritto a pag. 28 per tutte le molecole descritte precedentemente, nove funghi dermatofiti da poter definire uno spettro d'azione il più possibile completo

Fungo	% Inibizione di crescita al 7° giorno alle concentrazioni di Salicina (µg/mL) di		% Inibizione di crescita al 7° giorno alle concentrazioni di S1 (µg/mL) di	
	20	100	20	100
<i>Epidermophyton floccosum</i>	+	+	0.0	5.11 ±0.9
<i>Trichophyton rubrum</i>	+	+	4.92 ±0.3	0.82 ±0.7
<i>Trichophyton tonsurans</i>	+	0.0	+	+
<i>Trichophyton violaceum</i>	1.61 ±0.1	1.61 ±1.2	2.08 ± 1.8	7.29 ±1.7
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	10.61 ±0.1	22.73 ±0.1	+	5.56 ±0.7
<i>Microsporum gypseum</i>	+	+	24.31 ± 1.2	32.04 ±0.3
<i>Nannizzia cajetani</i>	+	+	+	+
<i>Microsporum canis</i>	0.0	5.26 ±0.8	+	+
<i>Nannizzia gypsea</i>	+	+	7.76 ± 0.6	8.62 ±0.8

Tabella 14. Inibizione della crescita a seguito di trattamento con lo standard puro Rutina ed il derivato semisintetico S1.

Per quanto riguarda la Salicina ed il suo derivato semisintetico S1, dalla Tabella 14 si può osservare che, come nel caso precedente, le percentuali di inibizione sono generalmente piuttosto basse, eccetto per la Salicina che, sul fungo *Trichophyton mentagrophytes*, mostra valori di inibizione pari al 10,61% e 22,73% rispettivamente alle concentrazioni di 20 e 100 µg/ml e per il derivato semisintetico S1 che, sul fungo *Microsporum gypseum*, dà un' inibizione pari al 24,31% e 32.04 % alle due concentrazioni.

Come per l'esperimento precedente, in tutti gli altri casi si è osservato un effetto ormone-simile con una crescita dei funghi più alta rispetto al controllo

7. PARTE SPERIMENTALE

7.1 *Materiali e Metodi*

L'andamento delle reazioni e le miscele dei prodotti sono stati controllati mediante cromatografia su strato sottile (TLC) su lastre di gel di silice Macherey-Nagel durasil-25 UV₂₅₄, utilizzando come eluenti cloruro di metilene/metanolo. Come sistema di rivelazione è stata utilizzata: la lampada UV a 254nm.

Gli spettri ¹H-NMR sono stati registrati utilizzando i seguenti strumenti: VXR-200 Varian, e Mercury Plus-400 Varian. Gli shift sono espressi in parti per milione(δ) utilizzando come standard di riferimento tetrametilsilano (TMS). Gli HPLC analitici sono stati effettuati tramite un cromatografo Agilent 1100 SeriesHPLC System dotato di rivelatore G1315A DAD e di colonna Hydro RP18 Sinergi 80A (4.6 \times 150 mm, 4 μ m) della Phenomenex.

I reagenti, i solventi e gli standard impiegati sono stati forniti da: Sigma-Aldrich, Milano, Italia; Carlo Erba reagenti, Milano, Italia. (I solventi utilizzati per l'analisi HPLC sono *HPLC grade*.)

I kit ACW ed ACL per le analisi PCL sono stati acquistati da Analytik Jena AG, Jena, Germany. Il Trolox[®]((S)- (2) - 6- hydroxy- 2,5,7,8- tetramethyl- chroman- 2- carboxylic acid)) necessario per preparare la soluzione standard alla concentrazione di 1 nmol/L, da Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany. Lo strumento utilizzato è il *Photochem*[®]. Le misurazioni di fluorescenza per le analisi ORAC dei campioni sono state eseguite con lo strumento *Fluoroskanascent FL*[®] di Thermo.

I dermatofiti utilizzati sono *Nannizzia cajetani* Ajello, ceppo CBS 495.70; *Epidermophytonfloccosum*(Hartz) Langerone Milochevitch, ceppo CBS 358.93; *Trichophyton violaceum* Malmsten, ceppo CBS 459.61; *Trichophyton tonsurans* Malmsten, ceppo CBS483.76, *Trichophyton mentagrophytes*(Robin) Blanchard, ceppo CBS 160.66; *Microsporum canis* Bodinceppo CBS 4727; *Nannizzia gypsea* (Bodin) Guiart et Grigoraki CBS 286.63 acquistato dal Centraal Bureau voor Schimmelcultures (CBS), Baarn, Netherlands; *Trichophyton rubrum* (Castellani) Sabouraud ceppo IHME 4321; *Microsporum gypseum* (Bodin) Guiarte Grigorakis ceppo IHME 3999 proveniente da Institute of Hygiene and Epidemiology-Mycolology (IHME,Brussels, Belgium). Le culture sono state mantenute in laboratorio in slants di agar o su un terreno di coltura adatto, cioè, Sabouraud Dextrose Agar (SDA, Difco), per i dermatofiti.

7.2 Procedure sintetiche generali

7.2.1 Sintesi del Verbascoside Nonapropionato (ES1)

Ad una soluzione pre-raffreddata (0 °C) di Verbascoside (400 mg, 0.64 mmoli) e DMAP (2.81 g, 23.04 mmoli) in CH₂Cl₂ (40 mL), viene aggiunto propionil cloruro anidro (17.28 mmol) goccia a goccia. Dopo agitazione a temperatura ambiente in atmosfera di Argon per 14 ore, la miscela di reazione viene lavata con H₂O, NaHCO₃ e Brine. La fase organica viene successivamente anidrificata (Na₂SO₄), filtrata ed evaporata. Il prodotto viene separato su colonna di gel di silice eluendo con CH₂Cl₂/MeOH, 99/1, v/v, ad ottenere **ES1** (resa finale 72%) come schiuma bianca.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ (ppm) 0.79 (t, 3H, CH₃); 0.90–1.03 (m, 15H, 5x CH₃); 1.09–1.15 (m, 12H, 4x CH₃); 1.95–2.05, 2.16–2.25, 2.3–2.39 (m, 10H, 5x CH₂); 2.55–2.60 (8H, 4x CH₂); 2.75–2.85 (m, 2H, CH₂-Ar, aglicone); 3.66–3.71 (m, 1H, -OCH₂- aglicone+ 1H, zucchero); 2.92–3.97 (m, 1H, -OCH₂- aglicone +1H, zucchero); 4.03–4.06 (m, 1H, zucchero); 4.15–4.20 (m, 2H, zucchero); 4.72–4.92 (m, 6H, zucchero); 5.07–5.12 (m, 1H, zucchero); 6.68 (d, 1H, *J* = 16.4 Hz; CH=CH_a-COO-); 7.10–7.16 (m, 3H, aromatico); 7.33 (d, 1H, aromatico), 7.70–7.74 (m, 3H; 2H aromatico+ 1H Ar-CH_b=CH); ESI MS: *m/z* 1130.1 Da [M+H]⁺, C₅₆H₇₂O₂₄ Mol. Wt. 1129.16.

7.2.2 Sintesi del Verbascoside Pentapropionato (VPP)

Si aggiunge Et₃N (2.5 mL) ad una soluzione di **ES1** (518 mg, 0.46 mmol) in MeOH anidro (6 mL). La miscela di reazione viene messa sotto agitazione a temperatura ambiente in atmosfera di Argon per 5 ore e quindi neutralizzata tramite aggiunta di acido formico (3 mL) a 0 °C. Successivamente la miscela viene evaporata. Il residuo si scioglie in AcOEt e lavato con Brine. La fase organica viene poi anidrificata (Na₂SO₄), filtrata ed evaporata. Il prodotto viene separato su colonna di gel di silice eluendo con CH₂Cl₂/MeOH, 98/2, v/v, ad ottenere **VPP** (resa 36%) come schiuma bianca.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ(ppm) 0.79 (t, 3H, CH₃); 0.92–1.02 (m, 15H, 5x CH₃); 1.9–2.05, 2.12–2.34, (m, 10H zucchero); 2.58–2.62 (m, 2H, CH₂-Ar); 3.50–3.52 (m, 1H, -OCH₂- aglicone); 3.65–3.75 (m, 1H, zucchero); 3.85–3.9 (m, 1H, -OCH₂- aglicone +1H zucchero); 4.0 (d, 1H, zucchero); 4.14–4.2 (m, 2H, zucchero); 4.65 (d, 1H, zucchero); 4.76–4.88 (m, 5H, zucchero); 5.03 (t, 1H, zucchero); 6.21(d, 1H, *J* = 16, CH=CH_a-COO-); 6.4 (dd, 1H, aromatico); 6.56 (d, 1H, aromatico); 6.60 (d, 1H, aromatico); 6.73 (d, 1H, aromatico); 7 (d, 1H, aromatico); 7.03 (s, 1H, aromatico); 7.51 (d, 1H, *J* = 16 Hz, Ar-CH_b=CH); 8.65 (s, broad, 2H, 2x, OH); 9.2 (s, broad, 1H, OH); 9.65 (s, broad, 1H, OH); ESI MS: *m/z* 891.6 Da [M+H]⁺, C₄₃H₅₄O₂₀ Mol. Wt. 890.88.

7.2.3 Sintesi della Florizina Eptapropionata (F1)

Ad una soluzione pre-raffreddata (0 °C) di Floriza (400 mg, 0.92 mmoli) e DMAP (4g, 36 mmoli) in CH₂Cl₂ (50 mL), viene aggiunto propionil cloruro anidro (19.32 mmol) goccia a goccia. Dopo agitazione a temperatura ambiente in atmosfera di Argon per 14 ore, la miscela di reazione viene lavata con H₂O, NaHCO₃ e Brine. La fase organica viene successivamente anidrificata (Na₂SO₄), filtrata ed evaporata. Il prodotto viene cristallizzato con etere etilico/etere di petrolio **F1** (resa finale 75%) e si ottiene una schiuma bianca.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.163 (m, 21H, 7 × CH₃); 2.417 (m, 14H, 7 × CH₂); 2.913 (t, 2H, Ar-CH₂-CH₂-CO, *J* = 14.8 Hz); 2.989 (m, 1H, Ar-CH₂-CH₂-CO); 3.143 (m, 1H, Ar-CH₂-CH₂-CO); 3.90 (m, 1H sugar); 4.229 (m, 2H, -OCH₂-aglicone); 5.022 (m, 1H zucchero); 5.149 (m, 1H zucchero); 5.276 (m, 1H zucchero); 5.297 (m, 1H zucchero); 6.684 (d, 1H aromatico, *J* = 2.2 Hz); 6.778 (d, 1H aromatico, *J* = 2.2 Hz); 6.987(d, 2H aromatico, *J* = 8.8 Hz); 7.247 (d, 2H aromatico, *J* = 8.4 Hz). ESI MS: *m/z* 829.7 Da [M+H]⁺, C₄₂H₅₂O₁₇ Mol. Wt. 828,85.

7.2.4 Sintesi della Florizina Tetrapropionata (F2)

Si aggiunge Et₃N (3.5 mL) ad una soluzione di **F1** (501.8 mg, 0.61 mmol) in MeOH (10.4ml) e THF anidri (2.6 mL). La miscela di reazione viene messa sotto agitazione a temperatura ambiente in atmosfera di Argon per 17 ore e quindi neutralizzata tramite aggiunta di acido formico (3 mL) a 0 °C. Successivamente la miscela viene evaporata. Il residuo si scioglie in AcOEt e lavato prima con acqua e poi con Brine. La fase organica viene poi anidrificata (Na₂SO₄), filtrata ed evaporata. Il prodotto viene separato su colonna di gel di silice eluendo con CH₂Cl₂/MeOH, 98/2, v/v, ad ottenere **F2** (resa 51%) come schiuma ocra.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ (ppm) 0.99 (m, 12H, 4xCH₃); 2.22 (m, 8H, 4 × CH₂); 2.699 (t, 2H, Ar-CH₂-CH₂-CO, *J* = 7.2 Hz); 2.924 (m, 1H, Ar-CH₂-CH₂-CO); 3.139 (m, 1H, Ar-CH₂-CH₂-CO); 4.046 (m, 1H zucchero); 4.254 (m, 2H, -OCH₂-aglicone); 5.02 (m, 1H zucchero); 5.112 (m, 1H zucchero); 5.453 (t, 1H zucchero, *J* = 9.6 Hz); 5.693 (d, 1H zucchero, *J* = 8 Hz); 5.984 (d, 1H aromatico, *J* = 2.2 Hz); 6.088 (d, 1H aromatico, *J* = 2.2 Hz); 6.621 (d, 2H aromatico, *J* = 8.8 Hz); 6.964 (d, 2H aromatico, *J* = 8.4 Hz); 9.11 (s, 1H, OH); 10.58 (s, ampio, 1H, OH); 12.76 (s, 1H, OH). ESI MS: *m/z* 661.5 Da [M+H]⁺, C₃₃H₄₀O₁₄ Mol. Wt. 660,66.

7.2.5 Sintesi della Rutina Decapropionata (R1)

Ad una soluzione pre-raffreddata (0 °C) di Rutina (400 mg, 0.657 mmoli) e DMAP (2.9g, 1.314mmoli) in CH₂Cl₂ (50 mL), viene aggiunto propionil cloruro anidro(19.32 mmol) goccia a goccia. Dopo agitazione a temperatura ambiente in atmosfera di Argon per 14 ore, la miscela di

reazione viene lavata con H₂O e Brine. La fase organica viene successivamente anidrificata (Na₂SO₄), filtrata ed evaporata. Il prodotto viene cristallizzato con etere etilico/etere di petrolio **R1** (resa finale 73%) e si ottiene una schiuma bianca.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ(ppm) 1.01-1.03 (m, 18H, 6xCH₃); 1.08-1.11 (m, 6H, 2xCH₃); 1.12-1.18 (m, 9H, 3xCH₃); 2.20-2.24 (q, 2H, CH₂); 2.31-2.35 (m, 4H, 2xCH₂); 2.36-2.45 (m, 6H, 3xCH₂); 2.48-2.54 (m, 6H, 3xCH₂); 2.64-2.68 (q, 2H, CH₂); 2.95-3.26 (m, 2H, -OCH₂-, zucchero); 4.12-4.14 (m, 1H, zucchero); 4.41-4.43 (m, 1H, zucchero); 4.61-4.64 (t, 1H, zucchero); 4.78-4.83 (m, 2H, zucchero); 4.97-5.08 (m, 3H, zucchero); 5.24 (s, 1H, zucchero); 5.78 (s, 1H, zucchero); 6.94-7 (m, 3H, aromatico); 7.17 (s, 1H, aromatico); 7.31-7.33 (d, 1H, aromatico). ESI MS: *m/z* 1172.3 Da [M+H]⁺, C₅₇H₇₀O₂₆ Mol. Wt. 1171.15 calcd.

7.2.6 Sintesi della Rutina Sestapropionata (R2)

Si aggiunge Et₃N (3.5 mL) ad una soluzione di **R1** (501.8 mg, 0.61 mmol) in MeOH (25 ml). La miscela di reazione viene messa sotto agitazione a temperatura ambiente in atmosfera di Argon per 18 ore e quindi neutralizzata tramite aggiunta di acido formico (3.7 mL) a 0 °C. Successivamente la miscela viene evaporata. Il residuo si scioglie in AcOEt e lavato prima con acqua e poi con Brine. La fase organica viene poi anidrificata (Na₂SO₄), filtrata ed evaporata. Il prodotto viene separato su colonna di gel di silice eluendo con CH₂Cl₂/MeOH, 98/2, v/v, ad ottenere **R2** (resa 41%) come schiuma ocrea.

H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ(ppm) 0.8-1.2 (m, 21H, 7xCH₃); 2.08-2.16, (m, 4H, 2xCH₂); 2.20-2.38 (m, 4H, 2xCH₂); 2.60-2.62 (m, 2H, 1xCH₂); 3.58 -3.7 (m, 2H, -O-CH₂- zucchero); 3.9-3.98 (m, 1H, zuccheror); 4.40-4.50 (m, 1H, zucchero); 4.70-4.80 (m, 1H, zucchero); 4.85-5.05 (m, 3H, zucchero); 5.10-5.2 (m, 1H, zucchero); 5.38-5.43 (m, 1H, zucchero); 5.58-5.62 (m, 1H, zucchero); 6.56-6.58 (d, 1H, zucchero); 6.74-6.82 (m, 2H, aromatico); 7.4-7.42 (s, 1H, aromatico); 7.6-7.68 (m, 1H, aromatico); 9.42-9.5 (m, 2H, 1H aromatico, 1 OH); 10.95 (s, 1H, OH); 11.1 (s, 1H, OH); 12.48 (s, 1H, OH).

ESI MS: *m/z* 947.8 Da [M+H]⁺, C₄₅H₅₄O₂₂ Mol. Wt. 946.9

7.2.7 Sintesi della Salicina Pentapropionata (S1)

Ad una soluzione pre-raffreddata (0 °C) di Salicina (400 mg, 1.41mmoli) e DMAP (2.35 g, 19.27mmoli) in CH₂Cl₂ (40 mL), viene aggiunto propionil cloruro (13.82mmol) goccia a goccia.

Dopo agitazione a temperatura ambiente per 14 ore, la miscela di reazione viene lavata con H₂O, e Brine. La fase organica viene successivamente anidrificata (Na₂SO₄), filtrata ed evaporata. Il prodotto viene solubilizzato in Et₂O e lavato con H₂O. La fase organica viene successivamente anidrificata (Na₂SO₄), filtrata ed evaporata. Il residuo viene quindi purificato tramite cristallizzazione con Et₂O ed etere di petrolio ad ottenere **S1** (resa finale 52%) come schiuma bianca.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ(ppm) 0.94–1.08 (m, 15H, 5x CH₃); 2.17–2.51, (m, 10H, 5x CH₂); 4.12–4.26 (m, 2H, -OCH₂- zucchero+1H zucchero); 4.95-5.06 (m, 3H, zucchero); 5.09–5.48 (m, 2H, -OCH₂- aglicone); 5.54 (d, 1H, zucchero); 7.09-7.14 (m, 2H, aromatici); 7.31-7.33 (m, 2H, aromatici) ESI MS: *m/z* 567.6 Da [M+H]⁺, C₂₈H₃₈O₁₂Mol. Wt. 566.59.

7.2.8 Sintesi della Salicina Tetrapropionata (S2)

161, 2 mg (0.285mmoli) di S1 vengono sciolti in 15 ml di esano e posto in bilancia con 150 mg di enzima (Lipasi di tipo 1 del germe di grano) sciolti in 15ml di tampone a pH 8. Dopo 24 ore in bilancia si verifica la riuscita della reazione con una TLC (eluente CH₂Cl₂/MeOH, 98/2, v/v). Il prodotto viene separato su colonna di gel di silice eluendo con CH₂Cl₂/MeOH, 98/2, v/v, ad ottenere S2(resa 41%)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ(ppm) 1.12 (m, 12H, 4x CH₃); 2.38, (m, 8H, 4x CH₂); 4.14–4.29 (m, 2H, -OCH₂- zucchero+1H zucchero); 4.98-5.09 (m, 3H, zucchero); 5.11–5.51 (m, 2H, -OCH₂- aglicone); 5.58 (d, 1H, zucchero); 5.73 (s, 1H, OH) 6.81-6.96 (m, 3H, aromatici); 7.11 (m, H, aromatico)

ESI MS: *m/z* 567.6 Da [M+H]⁺, C₂₈H₃₈O₁₂Mol. Wt. 566.59.

7.3 Coefficiente di Ripartizione Ottanolo/Acqua

La determinazione del rapporto di partizione (LogP), calcolato come il logaritmo del rapporto di concentrazioni della sostanza in ottanolo e acqua, è stata condotta in un sistema bifasico tra ottanolo (20mL) e acqua (20mL a pH6) a 25°C. Dopo 30 minuti di agitazione, la miscela bifasica è stata centrifugata per 10 minuti a 4000 rpm per separare le fasi e poi circa 5 ml di ciascuna fase sono stati usati per la determinazione con spettrofotometro (λ fissata a 330nm) delle concentrazioni all'equilibrio di Verbascoside (5 mg/20mL). Analoga determinazione è stata fatta anche per il derivato **VPP, Florizina, F2, Rutina, R2, Salicina e S2**.(5 mg/20mL).

7.4 Analisi antiossidanti

7.4.1 Metodica PCL (protocollo ACL)

La prima fase dell'analisi consiste nella misura del bianco e nella costruzione della retta di taratura mediante una soluzione standard di Trolox[®], mentre nella seconda fase si effettua la misura della capacità antiossidante dei campioni.

Una quantità esattamente pesata di composto viene sciolta in 1 ml di metanolo (HPLC grade) e mescolata per 1 minuto in vortex a temperatura ambiente. La soluzione così ottenuta viene diluita con il Reagente 1 del kit ACL. I campioni liquidi, invece, vengono diluiti direttamente con il Reagente 1.

A 10 μ l di soluzione contenente il campione sono stati aggiunti i tre reagenti del kit ACL:

- 2,3ml di reagente 1 (diluente, solvente),
- 200 μ l di reagente 2 (soluzione tampone),
- 25 μ l di reagente 3 (Luminol).

Per ciascun campione le misure sono state ripetute almeno tre volte. La capacità antiossidante è stata espressa in μ moli di Trolox[®] che forniscono una capacità antiossidante equivalente ad un grammo di campione in esame.

7.4.2 Metodica PCL (protocollo ACW)

La prima fase dell'analisi consiste nella misura del bianco e nella costruzione della retta di taratura mediante una soluzione standard di acido ascorbico, mentre nella seconda fase si effettua la misura della capacità antiossidante dei campioni.

Una quantità esattamente pesata di sostanza viene sciolta in 1 ml di Reagente 1 del kit ACW e mescolata per 1 minuto in vortex a temperatura ambiente. La soluzione così ottenuta viene diluita con il Reagente 1.

A 10 μ l di soluzione contenente il campione sono stati aggiunti i tre reagenti del kit ACW:

- 1,5 ml di reagente 1 (diluente, solvente),
- 1ml di reagente 2 (soluzione tampone),
- 25 μ l di reagente 3 (Luminol).

Per ciascun campione le misure sono state ripetute tre volte. La capacità antiossidante è stata espressa in μ moli di Acido Ascorbico che forniscono una capacità antiossidante equivalente ad un grammo di campione in esame.

7.4.3 Metodica ORAC

Il reagente utilizzato come solvente per l'analisi è una soluzione di buffer fosfato tamponato a pH 7,4 (PBS).

Si prepara la soluzione concentrata di fluoresceina sciogliendo 0,094 g di fluoresceina sodica in 1 l di soluzione di PBS. Per ogni analisi si provvederà a diluire 9,53 µl di soluzione concentrata in 14 ml di PBS. Il Trolox[®], utilizzato come standard, viene disciolto in 50 mL di PBS e opportunamente diluito alle seguenti concentrazioni: 10, 20, 30, 40, 50 Mm. La soluzione di AAPH si prepara sciogliendo 0,381 g di AAPH in 10 ml di PBS. I campioni da analizzare vengono esattamente pesati, sciolti in 1 ml di MeOH e opportunamente diluiti prima di essere sottoposti all'analisi. L'analisi viene condotta utilizzando piastre da 96 pozzetti. In ciascun pozzetto vengono aggiunti 100 µl di fluoresceina, 50µl di soluzione di AAPH e 50 µl di PBS (bianco), oppure 50 µl di Trolox (per la retta di calibrazione), oppure 50 µl di campione (per l'analisi). La piastra viene posta in un fluorimetro incubata per 30 minuti a 37°C e sottoposta a lettura della fluorescenza.

7.5 Studi di stabilità

7.5.1 Matrici Cosmetiche

In questo studio, il Verbascoside, Florizina, Rutina e i loro derivati di semisintesi sono stati inseriti in diverse formulazioni cosmetiche e non, poi sottoposte ad invecchiamento accelerato in stufa a 40° C ed analizzate tramite HPLC con lo scopo di valutare il loro contenuto nel tempo. Lo studio è stato condotto su tre diverse formulazioni, contenenti lo 0,3% dell'ingrediente attivo.

Le formulazioni testate sono le seguenti:

1. INCI: aqua, glycerin, glycerylstearate, Cetareth-20, Cetareth-12, cetylpalmitate, cetearylalcohol, dimethicone, caprylic/capric triglyceride, dicapryl carbonate, Symdiol 68T (come agente conservante per la formulazione) o EUXYLPE9010 (come agente conservante per la formulazione contenente il Verbascoside). Da un punto di vista tecnologico, è una formulazione cosmetica O/A (olio/acqua).
2. INCI: Nomcort T.I.O., Nomcort HK-G, Kester Wax K82D, Covabead LH170, EtOH denaturato (per VPP) o acqua (per verbascoside). Da un punto di vista tecnologico è una formulazione cosmetica che non contiene silicone.

Inoltre per il Verbascoside e per VPP è stata utilizzata anche quest'ultima formulazione:

3. INCI: DubPPD1 (hydrogenated palmkernel glycerides, hydrogenated palm glycerides). Da un punto di vista tecnologico è una formulazione simile a quella usata per le supposte.

7.5.2 Metodiche HPLC

Verbascoside e VPP

La fase mobile è costituita da acqua/acetonitrile(95:5, v/v, 0.01 M H₃PO₄) (solvente A) e Acetonitrile/acqua(95:5,v/v, 0.01 M H₃PO₄) (solvente B).

(1) **Verbascoside**: le formulazioni contenenti il **Verbascoside** sono state sottoposte ad invecchiamento accelerato in stufa a 40° C e quindi analizzate tramite HPLC con lo scopo di valutare il contenuto dell'ingrediente attivo nel tempo. La determinazione è stata effettuata in isocratica (solvente A: 83%/solvente B: 17%). La separazione è stata monitorata rilevando l'assorbanza a 330 ± 8 nm. Il flusso della fase mobile è stato di 1.0 mL/min, il volume di iniezione di 5µl. La separazione è stata effettuata con colonna termostata a 27°C. La durata dell'analisi è di 13 minuti e il tempo di ritenzione del **Verbascoside** è $t_R = 4.88$ minuti.

(2) **VPP**: le formulazioni contenenti **VPP** sono state sottoposte ad invecchiamento accelerato in stufa a 40° C e quindi analizzate tramite HPLC con lo scopo di valutare il contenuto dell'ingrediente attivo nel tempo. La determinazione è stata effettuata in isocratica (solvente A: 45%/solvente B: 55%). La separazione è stata monitorata rilevando l'assorbanza a 338 ± 8 nm. Il flusso della fase mobile è stato di 1.2 mL/min, il volume di iniezione di 5 µl e la separazione è stata effettuata con colonna termostata a 27°C. La durata dell'analisi è di 12 minuti e il tempo di ritenzione di **VPP** è $t_R = 6.75$ minuti.

F2

La fase mobile è costituita da acqua (0.01 M H₃PO₄) (solvente A) e Acetonitrile (0.01 M H₃PO₄) (solvente B).

(1) **F2**: le formulazioni contenenti **F2** sono state sottoposte ad invecchiamento accelerato in stufa a 40° C e quindi analizzate tramite HPLC con lo scopo di valutare il contenuto dell'ingrediente attivo nel tempo. La determinazione è stata effettuata in isocratica (solvente A: 40% solvente B: 60%). La separazione è stata monitorata rilevando l'assorbanza a 284 ± 8 nm. Il flusso della fase mobile è stato di 1.2 mL/min, il volume di iniezione di 5 µl e la separazione è stata effettuata con colonna termostata a 27°C. La durata dell'analisi è di 12 minuti e il tempo di ritenzione di **F2** è $t_R = 4.97$ minuti.

Rutina e R2

La fase mobile è costituita da acqua (0.01 M H₃PO₄) (solvente A) e Acetonitrile (0.01 M H₃PO₄) (solvente B).

(1) **Rutina**: le formulazioni contenenti la **Rutina** sono state sottoposte ad invecchiamento accelerato in stufa a 40° C e quindi analizzate tramite HPLC con lo scopo di valutare il contenuto dell'ingrediente attivo nel tempo. La determinazione è stata effettuata in isocratica (solvente A:

80% solvente B: 20%). La separazione è stata monitorata rilevando l'assorbanza a 360 ± 8 nm. Il flusso della fase mobile è stato di 1.2 mL/min, il volume di iniezione di 5 μ l. La separazione è stata effettuata con colonna termostata a 27°C. La durata dell'analisi è di 9 minuti e il tempo di ritenzione della Rutina è $t_R = 3.57$ minuti.

(2) **R2**: le formulazioni contenenti **R2** sono state sottoposte ad invecchiamento accelerato in stufa a 40° C e quindi analizzate tramite HPLC con lo scopo di valutare il contenuto dell'ingrediente attivo nel tempo. La determinazione è stata effettuata in isocratica (solvente A: 37% solvente B: 63%). La separazione è stata monitorata rilevando l'assorbanza a 364 ± 8 nm. Il flusso della fase mobile è stato di 1.2 mL/min, il volume di iniezione di 5 μ l. La separazione è stata effettuata con colonna termostata a 27°C. La durata dell'analisi è di 17 minuti e il tempo di ritenzione della **R2** è $t_R = 6.28$ minuti.

7.6 Valutazione dell'attività antimicotica

La valutazione dell'attività antifungina è stata effettuata in laboratorio sui due composti naturali Verbascoside, Florizina, Rutina e Salicina e sui derivati di semisintesi **VPP**, **F2 R2** e **S1**.

7.6.1 Preparazione del terreno di coltura e crescita dei miceti

Sono state preparate le piastre Petri con il terreno SDA (Sabouraud Dextrose Agar), e su queste sono stati depositati dei dischi di cellophane sterili dal diametro leggermente più piccolo della piastra.

Su ciascuna piastra poi è stato depositato un dischetto di micelio ottenuto dalla coltura madre mediante l'utilizzo di un foratappi; questa fase si effettua per verificare la vitalità del micelio, ma non si effettua per tutti i funghi analizzati. Si ha infatti che *Tricophyton violaceum* ed *Epidermophyton floccosum* hanno una crescita molto rapida e questo passaggio potrebbe alterare i dati successivi, perciò questi due funghi vengono trapiantati direttamente sul terreno trattato.

7.6.2 Preparazione del terreno trattato

Gli esperimenti per testare l'attività antifungina sono stati eseguiti in doppio con il test di diluizione in agar, che prevede l'incorporazione della sostanza in esame direttamente nell'opportuno terreno di coltura, che in questo caso è l'SDA, a due diverse concentrazioni, che in questo caso sono 20 μ l/ml e 100 μ l/ml. Sono perciò state preparate per ciascun fungo:

- due piastre di controllo, in cui si ha il terreno SDA con DMSO (dimetil-solfossido), cioè il solvente in cui è stato disciolto l'olio essenziale per la preparazione delle due concentrazioni;

- due piastre di terreno SDA con la concentrazione di 20µl/ml di composto;
- due piastre di terreno SDA con la concentrazione di 100µl/ml di composto.

7.6.3 Trasporto e trapianto dei funghi

Si effettua il trapianto diretto di *Tricophyton violaceum* e di *Epidermophyton floccosum* sul terreno trattato, mentre gli altri funghi vengono trasportati assieme al disco di cellophane su cui hanno cominciato a crescere mediante l'ausilio di una pinza sterile.

7.6.4 Osservazione e misurazione

Dal giorno del trasporto/trapianto (giorno 0) si effettua un'osservazione quotidiana delle piastre per valutare la crescita dei miceli, e si effettua anche la misurazione della crescita diametrale del fungo in mm; la misurazione si effettua per 7 giorni ed al termine di questo periodo è possibile determinare la crescita del fungo e l'inibizione della crescita che la sostanza in analisi ha determinato.

A questo punto, l'inibizione della crescita in percentuale rispetto al controllo è stata valutata per ogni fungo. Il dato è il risultato di un esperimento in triplicato per ciascuna concentrazione. La percentuale di inibizione della crescita è stata espressa come la media dei valori ottenuti in tre esperimenti indipendenti. La percentuale di inibizione rispetto al controllo viene calcolata secondo la seguente equazione:

$$\text{Percentuale di inibizione relativa (\%)} = [(dex - dex')/dex] \times 100\%$$

Dove dex è il diametro del micelio nel controllo; e dex' è il diametro del micelio misurato nelle piastre dell'esperimento alle diverse concentrazioni.

7.7 Infiammazione

Per valutare l'attività antinfiammatoria della Florizina e di F2, abbiamo collaborato con il gruppo di ricerca del Prof. Gambari, in modo particolare con la Dott.ssa Lampronti Ilaria, e grazie a questa collaborazione è stato possibile ottenere i risultati sopra riportati.

7.7.1 Modello cellulare: IB3-1

“Le IB3-1 sono cellule immortalizzate, derivate da una coltura primaria di epitelio bronchiale isolato da un paziente malato di fibrosi cistica. La coltura è stata trasformata utilizzando un virus ibrido, adeno-12-SV40.

Le cellule di epitelio bronchiale così ottenute sono carenti dell'AMP ciclico mediato da protein chinasi A necessario per l'attivazione della conduttanza al cloro, ma il canale cloro, presente sulla loro membrana, può essere attivato dal voltaggio.

Il genotipo di questa linea cellulare è eterozigote, composto dalla mutazione $\Delta F508$ e da una mutazione non-senso W1282X¹²⁶.

Per tutti i nostri esperimenti abbiamo usato le cellule IB3-1 tenute in coltura, in fiaschine T-25, utilizzando il medium LHC-8 (Invitrogen- Biosource, Italia) e il 5% di FCS (Fetal Calf Serum, BioWest). Vengono mantenute in incubatore a 37°C con 5% di CO₂ e crescono in adesione assumendo una forma allungata (Figura 32).

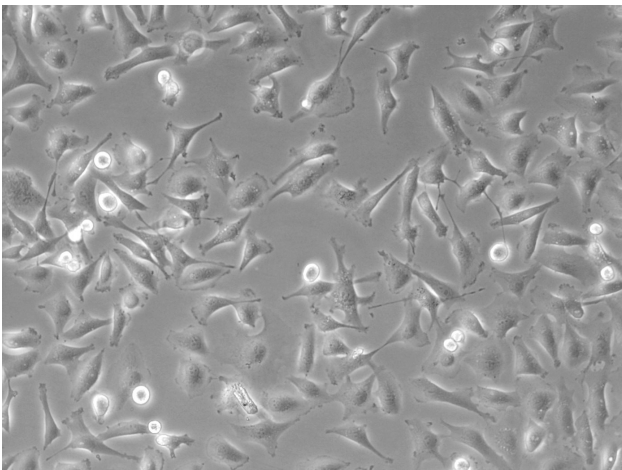


Figura 32. Cellule IB3-1 al microscopio ottico

Rispettando il loro ciclo cellulare, vengono diluite due volte a settimana, generalmente il lunedì ed il giovedì, quando arrivano a plateau di crescita. La diluizione per il mantenimento della coltura avviene in questo modo: una volta verificato al microscopio che le cellule siano sane e a confluenza massima, si staccano dal fondo della fiaschina utilizzando il metodo meccanico con scraper oppure il metodo chimico con tripsina, e si disgregano; a questo punto, secondo una diluizione 1:10, si trasferisce 1ml di cellule in una nuova fiaschina, si aggiunge il 5% di siero e si porta a volume (10ml totali) con terreno. Il tutto rigorosamente sotto cappa sterile, prestando molta attenzione in ogni passaggio per evitare la possibilità di contaminazione.

7.7.2 Trattamento delle cellule IB3-1

Le cellule sono state espanse in fiasche T-75 e, dopo il raggiungimento di una confluenza tra l'80 e il 100%, sono state seminate in piastre da 12 pozzetti in un volume di 2ml, con LHC-8 e il 5% di siero, ad una confluenza del 60%, calcolata in base all'area del singolo pozzetto. Dopo 24 ore di incubazione a 37°C e 5% di CO₂, le cellule ben adese hanno raggiunto una confluenza circa del 90% e sono state trattate con diverse concentrazioni dei composti da testare.

7.7.3 Attività antiproliferativa

È molto importante, quando si vanno a testare composti nuovi su precisi processi cellulari, conoscere prima il loro effetto sulle cellule in termini di cito-tossicità.

Per tale motivo inizialmente è stata valutata la conta cellulare e la vitalità delle cellule dopo il trattamento.

Trascorse 24 ore dal trattamento con F1 e F2, quando le cellule erano nella fase di crescita logaritmica, è stata effettuata la conta cellulare utilizzando il contatore *Z1 Coulter Counter* (Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA).

Una volta eliminato il terreno di coltura, le cellule sono state lavate con PBS 1x (Na_2HPO_4 10mM pH 7.3, NaCl 120mM) e staccate con tripsina. Dopo qualche minuto, quando tutte le cellule erano staccate dal fondo del pozzetto, la tripsina è stata neutralizzata con pari quantità di siero e si è portato nuovamente a volume con terreno. Una volta disgregate accuratamente le cellule, i campioni sono stati preparati prelevando 50 μl di sospensione cellulare e diluendo con 5 ml di soluzione fisiologica in bicchierini conta-cellule.

Il valore numerico dato dal contatore è stato moltiplicando per 200 ottenendo così il numero di cellule per ml.

7.7.4 Estrazione dell'RNA totale

Le cellule fibrocistiche IB3-1, raggiunto il *plateau* di crescita, sono state trattate con concentrazioni diverse di Florizina Eptapropionata e Florizina tetrapropionata.

Volendo valutare la possibile attività anti-infiammatoria di questi composti, è stato volontariamente avviato nelle cellule il processo infiammatorio. Infatti, dopo 5 ore dal trattamento, è stato aggiunto come induttore dell'infiammazione il TNF- α (ORF Genetics, Kopavogur, Iceland) ad una concentrazione di 100ng/ml.

Trascorse altre 24 ore è stata effettuata l'estrazione dell'RNA, seguita da retrotrascrizione e da amplificazione del template (cDNA) mediante real time Q-PCR.

Per l'estrazione dell'RNA totale, è stato prelevato il surnatante di coltura e le cellule IB3-1 seminate in piastre da 12 pozzetti, dopo un rapido lavaggio con PBS, sono state sottoposte ad estrazione con 1ml di TRIzol¹²⁷ (Sigma, St.Louis, MO, USA).

Il TRIzol è un reagente che permette di isolare con elevata selettività l'RNA totale da DNA e proteine, mantenendolo integro nonostante la lisi cellulare; è una soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato e per questo motivo l'estrazione viene condotta sotto cappa chimica.

Dopo aver lasciato le cellule un paio di minuti in TRIzol, sono state prelevate, trasferite in eppendorf da 2ml e disgregate; si è aggiunto 1 μl di glicogeno e 200 μl di cloroformio e poi ogni campione è stato agitato vigorosamente per ottenere un'emulsione. Una centrifugata a 12.000g a 4°C per 15 minuti ha permesso di ottenere tre fasi: l'RNA si è spostato nella fase acquosa superiore. Questa è

stata prelevata facendo molta attenzione a non prelevare anche il DNA situato all'interfaccia tra le due fasi.

Alla fase acquosa, trasferita in nuove eppendorf da 1,5ml, è stato aggiunto isopropanolo permettendo la precipitazione dell'RNA. I campioni sono rimasti a riposo 10 minuti e poi sono stati centrifugati per altri dieci minuti (12.000g, 4°C); in questo modo l'RNA è precipitato e ha formato un pellet spesso difficile da vedere.

Eliminato il surnatante, è stato aggiunto al pellet 1 ml di etanolo al 75% in acqua con DEPC (DiEtil-PiroCarbonato).

I campioni sono stati nuovamente centrifugati permettendo al pellet di ridepositarsi; l'etanolo è stato eliminato facendo particolare attenzione a non rimuovere il pellet che, nella fase successiva, è stato essiccato in *SpeedVac*.

Infine il pellet di RNA asciutto è stato risospeso con 10µl di acqua DEPC ed è stato conservato a -80°C.

7.7.5 Analisi qualitativa e quantitativa dell'RNA estratto

L'RNA estratto è stato sottoposto a verifica qualitativa e quantitativa.

L'analisi qualitativa conferma che l'acido nucleico sia stato effettivamente estratto, che sia privo di contaminazione da DNA e fornisce informazioni sul suo stato di integrità. L'analisi quantitativa invece, permette di determinare la concentrazione dell'RNA estratto.

La prima è stata effettuata attraverso un gel di agarosio all'1% contenente etidio bromuro come intercalante l'RNA. L'RNA (1µl), assieme ad 1 µl di colorante *Loading Dye 6x* (MBI Fermentas, Milano, Italia) e a 8 µl di acqua DEPC, è stato caricato nei pozzetti del gel e la corsa è stata effettuata ad 80-90 V nel buffer TAE 1X (preparato da TAE 50X: 2M Tris-HCl, 0.05 M EDTA pH 8.5, 5,71% Acido Acetico Glaciale).

Il gel è stato poi visualizzato e fotografato con trasluminatore UV (BioRad Gel Doc 2000).

La quantificazione dell'RNA estratto è stata ottenuta utilizzando lo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 260 nm su campioni preparati con 1µl di RNA e 49µl di acqua DEPC.

7.7.6 Retrotrascrizione

La retrotrascrizione o trascrizione inversa è una tecnica che permette di ottenere una copia del DNA (cDNA) a partire dall'RNA e quindi utilizza l'RNA estratto come stampo. L'enzima responsabile di questa operazione è la trascrittasi inversa, detto anche DNA polimerasi-RNA dipendente, che sintetizza una molecola di DNA a partire da un innesco oligonucleotidico legato allo stampo di RNA. L'innesco è rappresentato dagli oligo dT, che si appaiano alle code poli-A degli mRNA (RNA messaggero), permettendo così la retrotrascrizione solo degli mRNA presenti nell'RNA totale estratto.

A questo scopo è stato usato il *kit Reverse Transcription System* (Promega Corporation, Madison, USA) contenente tutti i reagenti necessari.

La retrotrascrizione avviene in due fasi: la prima necessaria per denaturare e linealizzare l'RNA e la seconda propriamente per retrotrascrivere.

Nella prima fase sono stati preparati i campioni con 1µg di RNA in un volume totale di 8µl con H₂O *nuclease-free* e sono stati posti a 70°C per 10 minuti in un *thermal cycler*.

All'RNA denaturato sono stati poi aggiunti 12µl della miscela di retrotrascrizione composta dai reagenti del kit. (**Reagenti**Quantità 1xMgCl₂24µlReverse Transcription 10x buffer2µldNTPs mixtura2µlRecombinant Rnasin Ribonuclease Inhibitor0,5µlAMV Reverse Transcriptase(Hgh Conc)0,6µlOligo dT primer1µlH₂O Nuclease –Free1,9µl).

I campioni sono posti in thermal cycler per 60 minuti a 42°C, temperatura di lavoro ottimale per la trascrittasi inversa, al termine dei quali si innalza la temperatura fino a 95°C per 5 minuti per attivare l'inibitore. I campioni di cDNA vengono poi conservati a – 80°C.

Affinché la retrotrascrizione avvenga correttamente, è fondamentale lavorare in condizione di sicurezza, con reagenti RNasi-*free* e maneggiare con cura gli enzimi in modo da evitare che si degradino.

7.7.7 Real Time Q-PCR

La *PCR real time* o PCR quantitativa in tempo reale, è un metodo di amplificazione e quantificazione degli acidi nucleici.

PCR sta per Reazione a Catena della Polimerasi e attraverso di essa è stato amplificato il cDNA; sono stati usati specifici *primers* per i messaggeri del gene di interesse IL-8 (Interleuchina 8) e per il gene di riferimento GAPDH (Gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi).

I primer utilizzati sono stati:

IL-8: Fw5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTG-3'IL-8 Rw5'TTATGAATTCTCAGCCCTTCTT-CAAAAATTCTC-3

GAPDH: Fw5'-AAGGTCGGAGGAGTCAACTTT-3'GAPDH Rw5'-ACTGTGATGGT-CAGTCCTTCCA-3'

La PCR consiste in una serie di cicli termici durante i quali il cDNA si appaia con i primers e viene amplificato, ottenendo in questo modo fino ad un milione di copie del cDNA di interesse.

Un ciclo termico di PCR è costituito da 3 fasi: denaturazione, allineamento estensione.

Nella fase di denaturazione a 95°C per 10 secondi, i legami idrogeno che uniscono le basi azotate nell'acido nucleico vengono rotti e le due emieliche si separano. Nei 30 secondi successivi la temperatura viene abbassata a 68°C per permettere ai primers sequenza specifici di appaiarsi al DNA che possiede la sequenza bersaglio. Infine, nella fase di estensione, la temperatura viene portata a 72°C che è quella ottimale per il funzionamento della DNA polimerasi ed è mantenuta per 40 se-

condi; in questa fase viene creato il filamento complementare al DNA stampo partendo da un innescio. Terminata questa fase il ciclo riparte e viene ripetuto per 40 cicli creando un numero esponenziale di copie del cDNA.

Per ogni campione è stato amplificato 1 µl di cDNA, utilizzando 2µl dei *primer* per IL-8 e GAPDH (Fw e Rw concentrati 50ng/µl) e 12,5µl di *IQTM Sybr Green Supermix 1x* (Biorad).

Sono stati aliquotati quindi 25µl di ogni campione in un'apposita piastra per il *thermal cycler iCycler IQ5* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).¹²⁸

7.8 Wound healing

Per valutare l'attività di wound healing cutaneo, abbiamo collaborato con il gruppo di ricerca del Prof. Valacchi e grazie a questo lavoro di gruppo è stato possibile ottenere i risultati sopra riportati.

7.8.1 Colture cellulari

I cheratinociti umani (HaCaT, linea cellulare) sono stati forniti dal Dr. Fabio Virgili (Roma, INRAN). Si tratta di una linea cellulare di cheratinociti umani derivanti da pelle istologicamente normale e trasformati spontaneamente in vitro. Vengono coltivate in fiasche per colture cellulari con il fondo appositamente trattato per facilitare l'adesione delle cellule (Corning® - Flask 75 cm quadrati), in Dulbecco medium ad alto glucosio modificato Eagle (4,5 g/l) (DMEM Lonza, Milano, Italia), contenente siero fetale bovino (FBS) al 10%, 100 U / ml penicillina, 100 µg / mL di streptomina e L-glutamina (2mM) all'1%¹²⁸ Quando le cellule raggiungono la confluenza vengono trapiantate in piastre da 6 pozzetti (IWAKI).

Le cellule sono state incubate a 37 °C per 24 h in 95% aria e 5% CO₂ fino a confluenza. Prima del trattamento con differenti composti o prima della conta, le cellule vengono messe a contatto overnight con DMEM senza FBS, addizionato di L-glutamina, penicillina e streptomina.

7.8.2 Trattamento con i composti

I composti sono stati dissolti in etanolo ad una concentrazione di 10 mM come soluzione madre. Lo stock è stato diluito alle concentrazioni richieste direttamente nel terreno. La concentrazione finale di etanolo nel mezzo di cultura durante il trattamento del composto non supera lo 0,1% (v / v). Successivamente le cellule vengono trattate con i vari composti a differenti concentrazioni (1, 10 e 50µM) per 24h.

7.8.3 Vitalità cellulare

Lo studio di vitalità cellulare è stato eseguito 24 ore dopo i trattamenti attraverso la conta cellulare con Tripan Blu e la determinazione dei livelli di LDH rilasciato. Il rilascio di LDH è stato misurato

per mezzo di un saggio enzimatico: nella prima fase NAD⁺ è ridotto a NADH/H⁺ dalla conversione del lattato piruvato LDH-catalizzata.

Nella seconda fase, il catalizzatore (Diaforasi) trasferisce ioni H/H⁺ da NADH/H⁺ a sale di tetrazolo, il quale si riduce a formazano. Prima di ogni saggio, le cellule sono state lisate con 2% (v/v) di Triton X-100 in terreno di coltura per 30 min a 37 °C per ottenere un rilascio massimo di LDH con il 100% di tossicità (controllo positivo). Le quantità di LDH nel surnatante sono state determinate e calcolate secondo le istruzioni del kit (Roche Italia, Milano). Tutti i test sono stati eseguiti in triplicato e il dosaggio è stato ripetuto tre volte con risultati analoghi. La conta cellulare mediante la colorazione con Trypan blu, è stata fatta mediante un contatore cellulare (Invitrogen, Monza, Italia). Le cellule vitali e non vitali sono state contate separatamente. L'analisi è stata fatta esprimendo il numero di cellule morte come % rispetto al numero totale di cellule.

7.8.4 Conta cellulare

Il campione di cellule raccolte in tampone fosfato (mediante screepering) viene diluito 1:1 con Tripan blu, un colorante in grado di penetrare solo nelle cellule morte grazie alla permeabilità della membrana. 10µl della mix preparata sono stati caricati su un vetrino per la conta cellulare (Invitrogen®). La conta cellulare viene effettuata utilizzando “Countess® Automated Cell Counter” (Invitrogen). Il numero totale di cellule, il numero di cellule vive, il numero di cellule morte e la percentuale di vitalità cellulare che vengono fornite dallo strumento vengono registrate e utilizzate per l'analisi statistica.

7.8.5 Wound healing in vitro

Le HaCaT (2 × 10⁶ cellule per pozzetto) sono state seminate in piastre Petri (60 × 15 mm) e fatte crescere fino a confluenza. Il monostrato di cellule è stato sottoposto ad un “graffio” mediante l'uso di un puntale da 200µl al fine di generare una zona senza cellule (0.8–1 mm in ampiezza). Successivamente, dopo lavaggio con terreno di coltura, le cellule sono state trattate con i vari composti a differenti concentrazioni ed incubate per 24 ore a 37°C con DMEM al 10% di FBS. Le cellule sono state fotografate a differenti tempi dall'inizio del trattamento (1, 3, 6, 9, 24h) ed è stata valutata la migrazione delle cellule nell'area della ferita. Le immagini sono state acquisite mediante l'uso di un microscopio ottico Zeiss Axioplan 2 equipaggiato di una camera, AxioCam HR CCD, per l'acquisizione delle immagini e di un software, AxioVision 3.1, per l'analisi delle immagini (Carl Zeiss, Göttingen, Germany).

7.8.6 Animali

I topi SKH-1 (femmine di 6 settimane di età) sono stati acquistati dalla Orient Bio Inc. (Gyeonggi-do, Korea) ed alloggiati in gabbie in condizioni di temperatura ed umidità controllata. (22 ± 1 °C,

RH 50–60%, cicli di 12 h luce/buio) con accesso ad acqua e cibo. I topi sono stati fatti acclimatare in stabulario per 10 giorni prima dell'inizio del trattamento. Tutti i topi (in totale 36) sono stati utilizzati in accordo con il protocollo animale approvato dall' Università di Ferrara.

7.8.7 Wound healing in vivo

Dopo 10 giorni di acclimatazione, i topi sono stati anestetizzati con isoflurano, un gas alogenato utilizzato come anestetico per inalazione, liquido a temperatura ambiente e assolutamente non infiammabile. Con l'enflurano e l'alotano ha soppiantato l'etere, il quale è infiammabile, usato nelle prime anestesie chirurgiche. L'isoflurano è molto usato nell'anestesia veterinaria e non essendo più sotto il regime di brevetto risulta economico nel suo utilizzo. La pelle è stata pizzicata tre volte in modo ed è stata asportata in sei punti differenti mediante l'uso di un "punch" (3.5 mm diameter, Miltex Instrument Company, York, PA) (Fig.33). Le ferite che sono state praticate, identiche per dimensioni, erano presenti sul dorso dell'animale (più precisamente sotto le scapole). Questa zona è stata scelta risulta essere un'area difficilmente raggiungibile dal topo, evitando in questo modo che l'animale possa leccarsi e provocare infiammazione della ferita."¹²⁹



Figura 33: Wound healing "in vivo" su topi SKH-1"

8. CONCLUSIONI

Questo studio ci ha permesso di caratterizzare e valutare il potenziale di quattro molecole naturali quali Verbascoside, Florizina, Rutina e Salicina e dei loro derivati semisintetici VPP, F2 R2 S1 ed S2.

VERBASCOSIDE E VPP

Nello specifico, il derivato VPP ha dimostrato una maggiore capacità antiossidante rispetto al Verbascoside nei confronti dell'anione superossido (analisi PCL) sia come tale che in formulazione. Nell'analisi antiossidante ORAC, si è invece ottenuto un valore più alto per il composto naturale; questo dato può essere correlato alla maggior lipofilia di VPP con conseguente minore solubilità nel mezzo idrofilico di analisi (PBS), oltre al fatto che le due molecole possono mostrare attività differenti sui due diversi radicali.

L'attività antifungina non ha dato risultati importanti per entrambi, nonostante VPP sia, anche in questo caso, più attivo. I risultati positivi riscontrati in ognuna delle attività valutate, dimostrano che la modifica sintetica non solo renderebbe più biodisponibile la molecola, dati a livello cellulare, ma permetterebbe anche di potenziarne l'attività. Sulla base di queste osservazioni si è quindi scelto di valutare se VPP possa essere effettivamente utilizzato come tale, valutandone la stabilità in formulazioni dermocosmetiche diverse per confronto con il composto "madre" Verbascoside: i risultati hanno mostrato una maggior stabilità della molecola nelle diverse formulazioni, VPP è risultato particolarmente stabile nella formulazione di tipo water-free.

Da questo studio è inoltre emerso come VPP rispetto al verbascoside sia in grado di stimolare le prime fasi del processo di wound healing cutaneo. Dai test si è evidenziato che il derivato VPP possiede caratteristiche di assorbimento, tollerabilità ed efficacia superiori al composto naturale, il quale è responsabile di spiccate proprietà antiossidanti e attività di scavenging verso i ROS.

FLORIZINA E F2

La Florizina e il suo derivato F2 hanno evidenziato le stesse capacità antiossidanti sia nell'analisi PCL che nel test ORAC. Questo ci permette di dedurre che la modifica strutturale apportata alla molecola non altera la sua attività antiossidante, in quanto in F2 rimane libero l'ossidrile fenolico. L'importanza della modifica strutturale si è evidenziata dallo studio effettuato sulle formulazioni contenenti Florizina ed F2, in quanto la modifica dei gruppi ossidrilici nello zucchero aumenta lipofilia e permette di ottenere una molecola che è ancora attiva ma molto più stabile nelle formule ad esempio dermo-cosmetiche. La florizina, infatti, posta nelle formulazioni dermo-cosmetiche è difficile da utilizzare perché si nota rapidamente una variazione di colore dal bianco al marrone e questo non è accettabile per formulazioni topiche. In questo studio è stata valutata anche l'attività

antifungina della florizina e del suo derivato di semisintesi F2, purtroppo entrambi mostrano una bassa attività sui dermatofiti, solo F2 su *Microsporum canis* ha raggiunto un valore significativo, tale da suggerire il suo utilizzo come un antimicotico.

Inoltre, abbiamo testato queste molecole per valutare il wound healing cutaneo ed F2 ha mostrato una accelerazione della cicatrizzazione nelle fasi iniziali del processo. Quindi, i dati ottenuti ci portano a concludere che il composto F2, creato per ottenere una migliore biodisponibilità e aumentare le applicazioni farmaceutiche, risulta la molecola di miglior prospettiva per il trattamento del Wound healing cutaneo. Le indagini effettuate, visti i risultati soddisfacenti, pongono un punto di partenza per ulteriori studi sui meccanismi molecolari che interessano l'incremento della velocità di cicatrizzazione. Infine, vogliamo sottolineare come, nel sistema biologico utilizzato per lo studio dell'infiammazione nella fibrosi cistica, i composti sintetizzati F1 ed F2 hanno mostrato un'interessante ed elevata attività biologica e che era invece completamente assente nella Florizina di partenza. L'inibizione dell'espressione genica di IL-8 risulta assai evidente a concentrazioni basse e molto lontane da quelle che determinano effetti citotossici, e tra questi composti i più interessanti sono: Floretina, F1 e F2. Per questo motivo riteniamo che queste molecole possano essere considerate di interesse per uno sviluppo farmaceutico come possibile anti-infiammatori nella terapia mirata alla cura di pazienti con fibrosi cistica. Inoltre, i risultati ottenuti promettono di ipotizzare di continuare la ricerca ottenendo altri derivati, utili per approfondire lo studio sulla relazione struttura-attività con l'intento di determinare quali sono le caratteristiche chimico-fisiche o strutturali responsabili dell'effetto sul bersaglio biologico in studio.

RUTINA

Analizzando i dati della capacità antiossidante della Rutina e del derivato di semisintesi R2 possiamo concludere che nell'analisi ORAC si ottiene un valore più alto per il composto naturale; questo dato può essere correlato alla maggior lipofilia di R2 con conseguente minore solubilità nel mezzo idrofilico di analisi (PBS). Invece, valutando i dati ottenuti con l'analisi PCL possiamo concludere che sia la Rutina che R2 hanno uno scarso potere antiossidante nei confronti dell'anione superossido sia come tali che in formulazioni. Successivamente, sulla base di queste osservazioni, si è scelto di studiare la stabilità dei composti in esame in diverse formulazioni dermocosmetiche per valutare il loro possibile utilizzo in questo tipo di veicolo farmaceutico. I dati ottenuti ci portano a concludere che la Rutina dopo oltre 150 giorni di stabilità accelerata è completamente stabile, al contrario per R2 abbiamo evidenziato, per entrambe le forme farmaceutiche, una diminuzione della molecola del 28%

L'attività antifungina analizzata su entrambe le molecole non ha dato risultati soddisfacenti, tranne che per il *Trichophyton violaceum* dove R2, a differenza della Rutina, mostra una buona inibizione di crescita che suggerisce il suo utilizzo come possibile antimicotico.

SALCINA

La stessa procedura descritta in precedenza è stata applicata alla Salicina e sul suo derivato S1, i quali hanno dimostrato attività comparabili, con il vantaggio che S1 è potenzialmente più biodisponibile in vivo rispetto alla Salicina. Il fatto che questo derivato, che in realtà è stato ottenuto come un intermedio di reazione, abbia dimostrato capacità non inferiori al derivato naturale, insieme al desiderio di avvicinarsi sempre più ad una chimica di tipo “green”, ci ha portati a tentare un approccio sintetico di tipo enzimatico per ottenere il derivato finale S2. Tali studi infatti ci hanno permesso, grazie alla collaborazione nata con il gruppo di ricerca della Prof.ssa Pedrini, di ottenere tramite un processo enzimatico di green chemistry il derivato S2. Questo processo di reazione oltre ad essere molto economico ci permette di ottenere il composto S2 puro in quanto la reazione enzimatica che avviene è univoca. La ricerca proseguirà studiando le possibili applicazioni del nuovo derivato semisintetico per comprendere la relazione struttura-attività.

9. BIBLIOGRAFIA

- 1 Rice-Evans C.A. et al. *Antioxidant properties of phenolic compounds*. Trend in Plant Science, 1997; 2: 152-159.
- 2 Torres de Pinedo A. et al. *Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidants: structure-activity relationship*. Food Chemistry, 2007, 103:55-61.
- 3 D'ischia M. et al. *The chemical basis of the antinitrosating action of polyphenolic cancer chemo preventive agents*. Curr Med Chem, 2006, 13:3133-3144.
- 4 Masella R, et al. *Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological system: Involvement of glutathione and glutathione related enzymes*. J. Nutr. Biochem. 2005; 16: 577-586.
- 5 Gutteridge et al. *Free RADICALS IN DESEASE PROCESS: a: Compilation of cause and consequence*. Freerad. Res. Commun. 1993; 19: 141-158.
- 6 Becker et al. *New Concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology*. Cardiovas. Res., 2004; 61: 161-470.
- 7 Momeni N, et al. *A novel blood-based biomarker for detection of autism spectrum disorders*. Transl Psychiatry Mar, 2012, 2 (3): e91.
- 8 Theoharides TC, et al. *Autism: an emerging neuroimmune disorder in search of therapy*. Expert Opin Pharmacother 2009 10: 2127–2143.
- 9 James SJ, et al. *Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism*. Am J Clin Nutr, 2004, 80: 1611–1617.
- 10 Chauhan A, et al. *Oxidative stress in autism*. Pathophysiology, 2006, 13: 171–181
- 11 James SJ, et al. *Metabolic endophenotype and related genotypes are associated with oxidative stress in children with autism*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2006, 141B: 947–956.
- 12 Frossi B, et al. *Oxidative stress stimulates IL-4 and IL-6 production in mastcells by APE/Ref-1-dependent pathway*. Eur J Immunol 2003 33: 2168–2177.
- 13 Andreatza AC, et al. *Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis*. J Affect Disord, 2008, 111: 135–144.
- 14 Ng F, et al. *Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications*. Int J Neuropsychopharmacol, 2008, 11: 851–876.
- 15 Tsaluchidu S, et al. *Fatty acids and oxidative stress in psychiatric disorders*. BMC Psychiatry 8, 2008, (Suppl 1): S1–S5.
- 16 Sultana R, et al. *Protein oxidation and lipid peroxidation in brain of subjects with Alzheimer's disease: insight into mechanism of neurodegeneration from redox proteomics*. Antioxid Redox Signaling 2010 8: 2021–2037.

- 17 Rose S, et al. *Evidence of oxidative damage and inflammation associated with low glutathione redox status in the autism brain*. *Transl Psychiatry* Jul, 2012, 10,2: e134 doi: 101038/tp201261.
- 18 Dulby G, et al. *A non-essential function for yeast frataxin in iron-sulfur cluster assembly*. *Human Molecular Genetics* 2002;11:2635-2643.
- 19 Tan G, Napoli E, Taroni F, Cortopassi G. *Decreased expression of genes involved in sulfur amino acid metabolism in frataxin deficient cells*. *Human Molecular Genetics* 2003;12:1699-1711
- 20 Chantrel-Groussard K, et al. *Disabled early recruitment of antioxidant defenses in Friedreich's ataxia*. *Hum Mol Genet* 2001;10(19):2061–2067
- 21 Karthikeyan G, et al. *Reduction in frataxin causes progressive accumulation of mitochondrial damage*. *Hum Mol Genet* 2003;12(24):3331–3342
- 22 Stehling O, et al. *Iron–sulfur protein maturation in human cells: evidence for a function of frataxin*. *Hum Mol Genet* 2004;3(23):3007–3015
- 23 Schoenfeld R, et al. *Frataxin deficiency alters heme pathway transcripts and decreases mitochondrial heme metabolites in mammalian cells*. *Hum Mol Genet* 2005;14 (24):3787–3799.
- 24 Gakh O, et al. *Physical evidence that yeast frataxin is an iron storage protein*. *Biochemistry* 2002;41(21):6798–6804.
- 25 Gakh O, et al. *Mitochondrial iron detoxification is a primary function of frataxin that limits oxidative damage and preserves cell longevity*. *Hum Mol Genet* 2006;15(3):467–479.
- 26 Dee R. et al. *A genome-wide view of Caenorhabditis elegans base-substitution mutation processes*. *Pnas* September 22, 2009 vol. 106 n 38.
- 27 Lee JH et al. *The effect of acteoside on histamine release and arachidonic acid release in RBL-2H3 mast cells*. *Arch. Pharm. Res.*2006; 29:508-513.
- 28 Baldwin AS. *The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights*. *Annu Rev Immunol* 1996 14, 649–683.
- 29 Viatour P, et al. *Phosphorylation of NF- κ B and I κ B proteins: implications in cancer and inflammation*. *Trends Biochem Sci* 2005 30, 43–52.
- 30 Chariot A. *20 Years of NF- κ B*. *Biochem Pharmacol* 2006 72, 1051–1053.
- 31 Karin M. *The beginning of the end: I κ B kinase (IKK) and NF- κ B activation*. *J Biol Chem*, 1999, 274, 27339–27342.
- 32 Clark RA, et al. *Cutaneous wound healing*. *N Engl J Med*. 1999 Sep 2; 341(10): 738-746.
- 33 Jamieson D. *Oxygen toxicity and reactive metabolites in mammals*. *Free Radical Biology and Medicine* 1989; 87: 87-108
- 34 Bradbury AW et al. *Role of the leucocyte in the pathogenesis of vascular diseases*. *Br J Surg* 1993; 80: 1503-1512.

- 35 Halliwell B, et al. *Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts*. Arch. Biochem Biophys 1986; 246: 501-514.
- 36 Martin A. *The use of antioxidants in wound healing*. Dermatol. Surg., 1996, 22: 156-160.
- 37 Rodri'guez Vaquero MJ, et al. *Phenolic compound combinations on Escherichia coli viability in a meat system*. J Agric Food Chem 2010, 58:6048-6052.
- 38 Jayaraman P, et al. *Activity and interactions of antibiotic and phytochemical combinations against Pseudomonas aeruginosa in vitro*. Int J Biol Sci 2010, 6:556-568.
- 39 Saavedra MJ, et al. *Antimicrobial activity of phenolics and glucosinolate hydrolysis products and their synergy with streptomycin against pathogenic bacteria*. Med Chem 2010, 6:174-183.
- 40 Jiang H, et al. *Advanced research on acteoside for chemistry and bioactivities*. Journal of Asian Natural Products Research 2011; 5:449-464.
- 41 Scarpati ML, et al. *Isolamento dal Verbascum sinuatum di due nuovi glicosidi: il verbascoside e l'isoverbascoside*. Ann. Chim. (Rome) 1963; 53: 356-367.
- 42 Yoshiaki A, et al. *Convenient TLC-based Identification Test for the Crude Drug "Pogostemoni Herba"*. YakugakuZasshi, 2008; 128: 1833-1837.
- 43 He ZD, et al. *Antioxidant activity of phenylethanoid glycosides from Brandisia hancei*. J. Ethnopharmacol. 2000; 71: 483-486.
- 44 Ohno T, et al. *Antimetastatic activity of acteoside, a phenylethanoid glycoside* Biol. Pharm. Bull. 2002; 25: 666-668.
- 45 W. F. Chiou, L. C. Lin. and C. F. Ches I. *Pharm. Pharmacol*,56, 743 (2004).
- 46 Diaz AM, et al. *Phenylpropanoid glycosides from Scrophularia scorodonia: In vitro anti-inflammatory activity*. Life Sci 2004; 74: 2515-2526.
- 47 Hayashi. K., et al. *Acteoside, a Component of Stachys Sieboldii MIQ, May Be a Promising Antinephritic Agent (2): Effect of Acteoside on Leukocyte Accumulation in the Glomeruli of Nephritic Rats*. Jpn. J. Pharmacol. 1994; 66: 47-52.
- 48 Hayashi. K., et al. *Acteoside, a Component of Stachys Sieboldii MIQ, May Be a Promising Antinephritic Agent (3): Effect of Acteoside on Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 in Experimental Nephritic Glomeruli in Rats and Cultured Endothelial Cells*. Jpn. J. Pharmacol. 1996; 70: 157-168.
- 49 Oyourou, J.N, et al. *Purification, stability and antifungal activity of verbascoside from Lippia javanica and Lantana camara leaf extracts*. Industrial Crops & Products vol. 43 May, 2013. p. 820-826
- 50 Lima et al. *Antimicrobial activity of a mixture of two isomeric phenylpropanoid glycosides from Arrabidaes harleyi A.H. Gentry(Bignoniaceae*. Revista brasileira de ciencias farmaceutica 2003; 39: 77-81.

- 51 F. O. Martins. *Verbascoside isolated from Lepechinia speciosa has inhibitory activity against HSV-1 and HSV-2 in vitro*. Nat. Prod. Commun. 2009; 4: 1693-1696.
- 52 Ali I et al. *In vitro antifungal activities of amphotericin B in combination with acteoside, a phenylethanoid glycoside from Colebrookea oppositifolia*. J. Med. Microbiol. 2011; 60: 1326-1336
- 53 Alessandro Bruni. *Farmacognosia generale e applicata; i farmaci naturali*. PICCIN 1999, 104-ISBN 9788829915002
- 54 J. Y. Lee JL et al. *In vivo treatment with the herbal phenylethanoid acteoside ameliorates intestinal inflammation in dextran sulphate sodium-induced colitis*. J. Ethnopharmacol. 2005; 148: 373-381.
- 55 Y. F. Tang., D. F. Huang, M. Y. Xie, X. M. Xie, Y. Wan. And D. D. Dai, 234th ACS National Meeting Boston, MA, USA 2007; 234: 19.
- 56 J. Zhao J et al. *Protective effect of acteoside on immunological liver injury induced by Bacillus Calmette-Guerin plus lipopolysaccharide*. Planta Med. 2009; 75: 1463-1469.
- 57 Lee KJ et al. *Protective Effect of Acteoside on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity*. Life Sci 2004; 74: 1051-1064.
- 58 Xiong QB et al. *Acteoside inhibits apoptosis in D-Galactosamine and lipopolysaccharide-induced liver injury*. Life Sci 1999; 65: 421-430.
- 59 Pu XP et al. *Acteoside from Cistanche salsa inhibits apoptosis by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion in cerebellar granule neurons*. PlantaMed. 2003; 69: 65-66.
- 60 Dal Toso et al. *Ingredienti cosmetici di origine vegetale per via biotecnologica*. Cosmet. Technol. 2009; 12: 25-31.
- 61 Minghetti A et al. *Una tecnologia innovativa per la produzione di principi attivi da piante. Colture cellulari di origine vegetale*. Natural 1 2003; 20: 54-57.
- 62 Rice-Evans, et al. *Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids*. Free Radic. Biol. Med. 1996; 20: 933-956.
- 63 Foley et al. *oxygen quenching and redox properties of hydroxycinnamic acids*. Free Radic. Biol. Med. 1999; 26: 1202-1208.
- 64 Didry et al. *Isolation and antibacterial activity of phenylpropanoid derivatives from Ballota nigra*. J. Ethnopharmacol. 1999; 67: 197-202.
- 65 Xiong et al. *Inhibition of nitric oxide by phenylethanoids in activated macrophages*. Eur. J. Pharmacol. 2000; 400: 137-144.
- 66 Korkina L et al. *Molecular mechanisms underlying wound healing and antiinflammatory properties of naturally occurring biotechnologically produced phenylpropanoid glycosides*. Cell. Mol. Biol. 2007; 53: 78-83.
- 67 Kostyuka V et al. *Antioxidant and signal modulation properties of plant polyphenols in controlling vascular inflammation*. Eur. J. Pharmacol. 2011; 658: 248-256.

- 68 Speranza L. *Antiinflammatory effects in THP-1 cells treated with verbascoside*. *Phytother. Res.* 2010; 24: 1398-1404.
- 69 Miyazawa et al. *Antimutagenic activity of phenylpropanoids from clove (Syzygium aromaticum)*. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51: 6413-6422.
- 70 Schlesier K, et al. *Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods*. *Free Radical Res.* 2002; 36 (2): 177-187.
- 71 Popov I, et al. *Photochemiluminescent detection of antiradical activity III: a simple assay of ascorbate in blood plasma*. *J. Biochem Biophys Methods* 1994; 28: 277-282.
- 72 Popov I, et al. *Oxidants and Antioxidants Part B – Antioxidative homeostasis: characterization by means of chemiluminescent technique*. *Methods in Enzymology* 1999; 300: 437-456.
- 73 Katoh T, et al. *Dermatomycosis and environment*. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2006; 47 (2): 63-7.
- 74 Korting HC, Schaller M *New developments in medical mycology*. *Hautarzt.* 2001; 52 (2): 91-7.
- 75 Hutchinson A, et al. *Studies of phloridzin in malus*. *Can J Med Sci* 1959; 37(7): 901–910.
- 76 Grochowska MJ. *Studies on natural growth regulators in apple trees in relation to biennial bearing*. *Bull Acad Pol Sci* 1963; IX: 585–590.
- 77 Hancock CR, et al. *The behaviour of phloridzin in the coleoptile straight-growth test*. *J Exp Bot* 1961; 12: 401–408.
- 78 Noveroske RL, et al. *B-glycosidase and phenoloxidase in apple leaves and their possible relation to resistance to venturia inaequalis*. *Phytopathology* 1964; 54: 98–103.
- 79 Ridgway T. *Phloridzin derivatives: food additives/chemopreventative drugs of the future*. *Biochem Soc Trans* 1997; 25: 109S.
- 80 Whiting GC. *Estimation of the monomeric phenolics of ciders*. *J Sci Food Agric* 1975; 26: 1833–1838.
- 81 Bremner PD, et al. *Comparison of the phenolic composition of fruit juices by single step gradient HPLC analysis of multiple chromatographic runs optimized for individual families*. *Free Radic Res* 2000; 32: 549–559.
- 82 Escarpa A, et al. *High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties*. *J Chromatogr* 1998; 823: 331–337.
- 83 Robak J, et al. *Flavonoids are scavengers of superoxide anion*. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 83–88.
- 84 Kim DO, et al. *Vitamin C equivalent antioxidant activity (VCEAC) of phenolic phytochemicals*. *J Agric Food Chem* 2002; 50(13): 3713–3717.

- 85 Sorata Y, et al. *Protective effect of quercetin and rutin on photosensitized lysis of human erythrocytes in the presence of hematoporphyrin*. *Biochem Biophys Acta* 1984; 799: 313–317.
- 86 Zhao H, et al. *Phloridzin improve hyperglycemia but not hepatic insulin resistance in a transgenic mouse model of type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2004; 53:2901-09.
- 87 Ehrenkranz JRL, et al. *Phlorizin: a review*. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 2005; 21:31-38.
- 88 Puel C, et al. *Prevention of bone loss by phloridzin, an apple polyphenol, in ovariectomized rats under inflammation conditions*. *Calcif Tissue Int*; 2005;77:311-8.
- 89 Ehrenkranz J.R.L. *Compositions containing botanical extracts rich in phlorizin and methods for using such compositions in blood glucose modification and to affect aging*. WO2006078848, 2006.
- 90 Veeriah S et al. *Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics*. *Mol. Carcinog*. 2006, 45, 164–174.
- 91 Salles B et al. *A chemiluminescent microplate assay to detect DNA damage induced by genotoxic treatments*. *Anal. Biochem*. 1995, 232, 37–42.
- 92 Anna Baldisserotto, Gemma Malisardi, Emanuela Scalambra, Elisa Andreotti, Carlo Romagnoli, Chiara Beatrice Vicentini, Stefano Manfredini and Silvia Vertuani. *Synthesis, Antioxidant and Antimicrobial Activity of a New Phloridzin Derivative for Dermo-Cosmetic Applications*. *Molecules* 2012, 17, 13275-13289.
- 93 Nichols D, et al. *Chronic inflammation in the cystic fibrosis lung: alterations in inter- and intracellular signaling*. *Clinic rev Allerg Immunol*; 2008; 34:146-162.
- 94 Mantovani A, et al. *Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity*. *Nat Rev Immunol*; 2011;11:519-31.
- 95 Richman-Eisenstat J. *Cytokine soup: making sense of inflammation in cystic fibrosis*. *Pediatr Pulmonol*; 1996; 21 1:3-5.
- 96 Ionescu AA, et al. *Pulmonary function, body composition, and protein catabolism in adults with cystic fibrosis*. *Am J Respir Crit Care Med*; 2002; 165 4:495-500.
- 97 Meyer KC, et al. *Function and composition of pulmonary surfactant and surfactant-derived fatty acid profiles are altered in young adults with cystic fibrosis*. *Chest*; 2000;1181:164-74.
- 98 Greally P, et al. *Sputum tumour necrosis factor-alpha and leukotriene concentrations in cystic fibrosis*. *Arch Dis Child*.;1993; 683:389-92.
- 99 Bonfield TL, et al. *Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs*. *Am J Respir Crit Care Med*; 1995; 152:2111-2118.
- 100 Chang WT, et al. *Evaluation of the anti-inflammatory effects of phloretin and phlorizin in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages*. *Food Chem*; 2012;134:972-9.
- 101 Lee Suan Chua *A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities*. *Journal of Ethnopharmacology*.2013;150(3):805-817.

- 102 Asgary, S. et al. *Anti-oxidant effect of flavonoids on hemoglobin glycosylation*. Pharm. 1999 ActaHelv.73,223–226.
- 103 Korkmaz, A.,Kolankaya,D. *Protective effect of rutin on the ischemia/ reperfusion induced damage in rat kidney*. J.Surg.Res. 2010 164,309–315.
- 104 Lee, et al. *Barrier protective effects of rutin in LPS-induced inflammation in vitro and in vivo*. FoodChem.Toxicol. 2012 50,3048–3055.
- 105 Guardia, et al. *Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat*. Farmaco 2010 56,683–687.
- 106 Stanley Mainzen Prince et al. *Rutin improves glucose homeostasis in streptozotocin diabetic tissues by altering glycolytic and gluconeogenic enzymes*. J.Biochem.Mol.Toxicol. 2006 20,96–102.
- 107 Webster,R.P. Et al. *Protective effect of rutin, a flavonol glycoside, on the carcinogen-induced DNA damage and repair enzymes in rats*. CancerLett. 1996 109,185–191.
- 108 Ziaee A, et al. *Effects of rutin on lipid profile in hypercholesterolaemic rats*. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2009; 104(3):253-258.
- 109 Meng F, et al. *Inhibitory effect of quercetin, rutin and puerarin on HDL oxidation induced by Cu⁺²*. Sichuan Da, Xue Xue Bao, Yi Xue Ban 2004; 35(6):836-838.
- 110 Milde J, et al. *Synergistic inhibition of low-density lipoprotein oxidation by rutin, gamma-terpinene and ascorbic acid*. Phytomedicine 11(2-3):105-113.
- 111 Butler, et al. *Thanks, Hippocrates, for the first miracle drug*. Geriatrics, 1998;53:1.
- 112 Jack DB. *One hundred years of aspirin*. Lancet, 1997; 350: 437-439.
- 113 "Le Scienze", num. 271, marzo 1991, pag.63, "L'aspirina", di Gerald Weissmann.
- 114 Khayyal MT, et al. *Mechanisms involved in the anti-inflammatory effect of a standardized willow bark extract*. Arzneimittelforschung. 2005; 55 (11): 677-87.
- 115 L. Van Hoof et al. *Plant Antiviral Agents, VI. Isolation of Antiviral Phenolic Glucosides from Populus Cultivar Beaupre by Droplet Counter-Current Chromatography*. J. Nat. Prod., 1989, 52 (4), pp 875–878.
- 116 Aldová E et al. *The Aeromonas genus*. Cesk Epidemiol Mikrobiol Imunol. 1991; 40 (3): 177-90.
- 117 The Longwood Herbal Task Force(<http://www.mcp.edu/herbal/default.htm>) and The Center for Holistic Pediatric Education and Research (<http://www.childrenshospital.org/holistic/>) Clinician Information Summary.
- 118 Guerin J et al. *Antifungal activity of plant extracts used in therapy:1. Study of 41 plant extractsagainst 9 fungi species*. Ann Pharm Fr 1984; 42: 553-559.
- 119 Kawkab, S.A. et al. *Histopathological study on the antifungal activity of Salix plant extract on some dermatophytes*. Jornal of biotechnology Reserch Center 2008 2, 1,33-40.

- 120 M.C. R. Franssen, N. J. Walton, in *Chemicals from Plants*, pag 277.
- 121 H.G. Davies, R.H. Green, D.R. Kelly, Stanley M. Roberts, in *Biotransformations in Preparative Organic Chemistry* (1989).
- 122 H. Yamada, S. Shimizu, *Angew. Chem.* 27, (1988), 622.
- 123 Florjańczyk, Ewa Majewska. *Chemoselective Hydrolysis of Ester Bonds in the Presence of Baker's Yeast*. *Synthetic Communications* 2010; 40(9):1264-1269.
- 124 M aparecida ferreira costa et al. *Production of lipase by soil fungi and partial characterization of lipase from a selected strain (Penicillium wortmanii)*. *Basic Microbiol.* 39 (1999) 1, 11–15.
- 125 Sunan Saktaweewong et al. *Lipase activity in biphasic media: Why interfacial area is a significant parameter?* *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 70 (2011) 8–16
- 126 Zeitlin PL, et al. *A cystic fibrosis bronchial epithelial cell line: immortalization by adeno-12-SV40 infection*. *Am J Respir Cell Mol Bio*; 1991; 4:313-9
- 127 Chomczynski P. *A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples*. *Biotechniques*; 1993; 15:532-4, 536-7.
- 128 Roberta Milani, Tesi di Laurea luglio 2013, relatori Ilaria Lampronti, Gambari Roberto e correlatore Stefano Manfredini. Titolo: inibizione con derivati della florizina dell'espressione del gene per IL-8 in cellule umane fibrocistiche IB3-1.
- 129 Federico Pozzetto, Tesi di Laurea ottobre 2013, relatori Giuseppe Valacchi, Stefano Manfredini e correlatore Franco Cervellati. Titolo effetto di nuovi derivati naturali di semisintesi sul wound healing cutaneo.

10. LAVORI PUBBLICATI DURANTE IL DOTTORATO

Il lavoro di dottorato svolto in questi 3 anni ha portato alla pubblicazione dei seguenti lavori:

- 2013 Maria Abruzzo, Marina Marini, Alessandra Bolotta, Gemma Malisardi, Stefano Manfredini, Alessandro Ghezzo, Antonella Pini, Gianluca Tasco and Rita Casadio. **Frataxin mRNA Isoforms in FRDA Patients and Normal Subjects: Effect of Tocotrienol Supplementation**Provvidenza. BioMed Research International Volume 2013 (2013), Article ID 276808, 9 pages.
- 2013 Alessandro Ghezzo., Paola Visconti, Provvidenza M. Abruzzo., Alessandra Bolotta, Carla Ferreri, Giuseppe Gobbi, Gemma Malisardi, Stefano Manfredini, Marina Marini, Laura Nanetti, Emanuela Pipitone, Francesca Raffaelli, Federica Resca, Arianna Vignini., Laura Mazzanti. **Oxidative Stress and Erythrocyte Membrane Alterations in Children with Autism: Correlation with Clinical Features.** PlosOne Giugno 2013 Volume 8, Issue 6.
- 2012 Vertuani Silvia, Anna Baldisserotto, Emanuela Scalambra, Gemma Malisardi, Elisa Durini, Stefano Manfredini; **Novel molecular combination deriving from natural aminoacids and polyphenols: Design, synthesis and free-radical scavenging activities;** European Journal of Medicinal Chemistry; 2012; 50: 383-392.
- 2012 Anna Baldisserotto, Gemma Malisardi, Emanuela Scalambra, Elisa Andreotti, Carlo Romagnoli, Chiara Beatrice Vicentini, Stefano Manfredini and Silvia Vertuani; **Synthesis, Antioxidant and Antimicrobial Activity of a New Phloridzin Derivative for Dermo-Cosmetic Applications;** Molecules 2012, 17: 13275-13289.
- 2011 Silvia Vertuani, Erika Beghelli, Emanuela Scalambra, Gemma Malisardi, Stefano Copetti, Roberto Dal Toso, Anna Baldisserotto and Stefano Manfredini ; **Activity and Stability Studies of Verbascoside, a Novel Antioxidant, in Dermo-Cosmetic and Pharmaceutical Topical Formulations;** Molecules 2011; 16(8): 7068-7080.