

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

**CORSO DI LAUREA IN SCIENZE FARMACEUTICHE
APPLICATE**

TESI DI LAUREA

**EFFETTO SINERGICO DI ESTRATTI VEGETALI E
ANTIBIOTICI CONTRO CEPPI BATTERICI E
FUNGINI**

Relatore: Prof.ssa Paola Brun

Laureanda: Elena Bisello
Matricola: 1150937

ANNO ACCADEMICO 2021-2022

Sommario

1 RIASSUNTO.....	3
2 INTRODUZIONE	5
2.1 Il problema della resistenza ai farmaci antimicrobici	5
2.2 Meccanismi di resistenza di batteri e funghi	8
2.3 Meccanismi di attività antibatterica di estratti vegetali	10
2.3.1 Modificazione dei siti attivi della cellula batterica	10
2.3.2 Inibizione degli enzimi.....	11
2.3.3 Aumento della permeabilità di membrana	11
2.3.4 Inibizione delle pompe di efflusso	13
2.4 Estratti vegetali testati	14
2.4.1 Verbascoside	14
2.4.2 Teupolioside	15
2.4.3 Glabridina	16
2.4.4 Acido clorogenico	17
2.4.5 Acido rosmarinico	18
2.4.6 Plantamajoside.....	19
2.5 Meccanismi dell'attività sinergica tra oli essenziali e farmaci antimicotici	19
2.6 Il quorum sensing batterico e l'interferenza con estratti vegetali	21
3 SCOPO DELLA TESI	25
4 MATERIALI E METODI	26
4.1 Determinazione della minima concentrazione inibente (MIC)	26
4.2 Valutazione della concentrazione microbica degli estratti vegetali	27
4.3 Determinazione dell'attività sinergica mediante tecnica a scacchiera	27
4.4 Determinazione dell'indice di concentrazione inibitoria frazionaria (FICI)	28
4.5 Saggio di bioluminescenza in <i>Vibrio harveyi</i> BB120	29
5 RISULTATI	31
5.1 Valori di MIC per gli antimicrobici e gli estratti vegetali	31
5.2 Determinazione dell'attività sinergica tra estratti vegetali e antibiotici in ceppi di MRSA	32
5.2 Determinazione dell'attività sinergica tra estratti vegetali e antibiotici in ceppi di <i>E. coli</i>	35
5.3 Determinazione dell'attività sinergica tra estratti vegetali e antibiotici in <i>C. albicans</i>	39
5.4 Analisi della bioluminescenza	41
6 CONCLUSIONI.....	42
7 BIBLIOGRAFIA.....	43

RIASSUNTO

Virus, batteri, funghi e parassiti causano malattie infettive con una complessa interazione tra agente patogeno, ospite e ambiente. La patogenicità è aggravata inoltre dalla resistenza ai farmaci antimicrobici e, per i batteri, l'uso indiscriminato di antibiotici ha sviluppato agenti patogeni multi resistenti tanto che, nonostante antibiotici di nuova generazione, questo fenomeno è in continuo aumento. [1].

La selezione di ceppi resistenti si verifica così rapidamente in alcuni microrganismi che l'utilità clinica degli antibiotici si perde entro 5 anni [2]. Data l'elevata incidenza di infezione soprattutto in individui immunocompromessi e la ridotta efficacia degli antibiotici, è sempre più necessario ricercare nuovi composti che svolgano un'azione antimicrobica con meccanismi alternativi ai tradizionali antibiotici o migliorino la potenza e la biodisponibilità degli antimicrobici esistenti [3,4] [5].

Molti composti sintetizzati nel metabolismo secondario dei vegetali sono utili in medicina poiché presentano azione antimicrobica come le fitoalessine appartenenti alla categoria dei terpenoidi, flavonoidi, glicosidi e polifenoli [1,6]. La combinazione di antibiotici con estratti vegetali dotati di azione antimicrobica risulta vantaggiosa per l'azione sinergica dei due composti, ma anche perché l'estratto vegetale aumenta la permeabilità degli antibiotici nelle cellule procariotiche o riduce l'attivazione del Quorum sensing batterico implicato nel fenomeno della resistenza [2] [7] [8].

Lo scopo di questo studio è stato valutare l'attività sinergica di estratti vegetali e antibiotici nei confronti di un ceppo batterico Gram positivo (*Staphylococcus aureus* meticillino resistente, MRSA), uno Gram negativo (*Escherichia coli*) ed un micete (*Candida albicans*) in modo da trovare gli estratti che possano potenziare l'attività dell'antibiotico.

Per prima cosa, mediante il metodo per diluizione, sono stati determinati i valori minimi antibatterici (MIC) degli estratti vegetali e degli antibiotici, comunemente usati in clinica e utilizzati nei test di sinergia, per rilevare la MIC in grado di inibire completamente la crescita visibile dei ceppi testati e agire in sinergia con gli estratti vegetali. In seguito si sono allestiti saggi di valutazione dell'azione sinergica mediante checkerboard assay, utilizzando concentrazioni subMIC, corrispondenti al 50% della MIC calcolata, per ogni antimicrobico.

I risultati hanno evidenziato un effetto sinergico di due degli otto estratti vegetali testati con la gentamicina (antibiotico aminoglicosidico che interferisce con la sintesi proteica dei batteri), tetraciclina e carbenicillina nei confronti di *E. coli*.

Per indagare un eventuale meccanismo di azione, il terreno di coltura di *E. coli* incubato con o senza gli estratti vegetali di interesse è stato co-coltivato con il batterio *Vibrio harveyi* BB120, ceppo utilizzato come biosensore del sistema del Quorum sensing batterico in quanto accende il

segnale della bioluminescenza in modo direttamente proporzionale all'attivazione del sistema di Quorum sensing.

Negli esperimenti svolti, il terreno condizionato di *E. coli* cresciuto con i due estratti vegetali riduce la bioluminescenza di *Vibrio harvey*, dimostrando quindi una riduzione del sistema del Quorum Sensing.

In conclusione, si è identificata un'azione sinergica tra due estratti vegetali e tre antibiotici nei confronti di un batterio Gram negativo. Il confronto con gli altri estratti testati è inficiato dalla bassa concentrazione dei principi attivi in questi ultimi che potrebbe giustificare i risultati non soddisfacenti.

Nonostante ciò, l'estratto titolato al 60% di acido clorogenico + 5% cianidina 3-o-glucoside e l'estratto titolato al 70% di plantamajoside dimostrano la capacità di interferire con il sistema del Quorum sensing di *E. coli* e quindi di disarmarne il potenziale patogeno.

2 INTRODUZIONE

2.1 Il problema della resistenza ai farmaci antimicrobici

La resistenza ai farmaci antibiotici è definita come la capacità di un ceppo batterico o fungino di moltiplicarsi in presenza di un antibiotico a concentrazioni nocive per la maggior parte dei microrganismi o alle concentrazioni massimali terapeutiche. Alcuni ceppi microbici sono intrinsecamente resistenti, per la loro struttura e per il loro metabolismo ad alcuni antibiotici, mentre altri ceppi acquisiscono la resistenza in seguito alla ripetuta esposizione al farmaco.

L'antibiotico resistenza è un fenomeno naturale ma l'uso massiccio che è stato fatto dei farmaci antimicrobici negli ultimi 30 anni non solo in campo clinico ma anche veterinario e negli allevamenti animali ha portato questo fenomeno a livelli preoccupanti per la salute dell'uomo.

La diffusione della resistenza antimicrobica [4] è infatti causato da diversi fattori tra cui:

- la notevole disponibilità di farmaci da banco contenenti antibiotici anche a basse concentrazioni,
- l'aumento della mobilità internazionale con la possibilità di trasporto di agenti patogeni resistenti,
- la scarsità di adeguati servizi igienico-sanitari e trattamento delle acque reflue soprattutto in alcune zone geografiche con conseguente rilascio di antibiotici o batteri resistenti nell'ambiente attraverso letame/feci.

La resistenza microbica consiste nell'acquisizione da parte di batteri e miceti di mutazioni che rendono inattivi gli antibiotici come le rifamicine e chinoloni o la modifica strutturale di proteine leganti la penicillina (PBP) che riguardano invece la resistenza alla penicillina [1].

Nel corso degli anni il numero di batteri resistenti è aumentato progressivamente; infatti è stato riportato che circa il 90-95 % dei ceppi di *S. aureus* nel mondo sono resistenti alla penicillina e nella maggior parte dei paesi asiatici il 70-80% degli stessi ceppi è resistente alla meticillina [1]. Tale fatto è motivo di preoccupazione in quanto i microrganismi resistenti ai farmaci hanno ulteriormente complicato il trattamento delle malattie infettive soprattutto nei pazienti immunocompromessi (malati di Aids o oncologici) oltre al fatto che le infezioni sono la principale causa mondiale di morti premature, uccidendo quasi 50 000 persone ogni giorno [5].

Secondo i Centers for Disease Control and Prevention (CDC), circa 2 milioni di persone ogni anno vengono infettate negli Stati Uniti da batteri resistenti ai farmaci e circa 23 000 persone l'anno muoiono a causa di agenti patogeni non curabili in quanto multiresistenti ai farmaci [4]. Inoltre secondo le linee guida per il trattamento dell'Indian Council of Medical Research (ICMR), l'Asia avrà 4,7 milioni di morti entro il 2050 a causa di infezioni non trattabili resistenti agli antibiotici [4].

Anche nelle patologie fungine vi è un aumento dell'incidenza del numero e varietà di infezioni

tra le persone immunocompromesse (come candidosi, penicillosi e istoplasmosi) e una maggiore resistenza antimicotica per i trattamenti antibiotici prolungati a cui sono sottoposte.

Per alcuni agenti resistenti ai farmaci è stata valutata l'attività sinergica con estratti vegetali. Nel nostro studio sono stati utilizzati tre ceppi batterici e funghi con caratteristiche diverse: *Stafilococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

S. aureus è un batterio Gram positivo opportunista in quanto è presente come un normale ospite nella maggior parte degli individui sani (fino a due terzi), asporigeno e privo di capsula [6]. Questo microorganismo genera infezioni molto diverse tra loro:

- Infezioni a carico di cute e sottocute (foruncoli, impetigine, ferite chirurgiche)
- Setticiemia e infezioni metastatiche (endocarditi, meningiti, polmoniti).
- Svolge un ruolo nella patogenesi di malattie croniche della pelle come la dermatite atopica.

S. aureus può trasmettersi tramite il contatto della pelle o la condivisione di oggetti contaminati, dispositivi medici transcutanei o durante un ricovero ospedaliero prolungato, dove rappresenta una causa comune di infezioni acquisite associate ad un'elevata morbilità e mortalità. La resistenza all'antibiotico in questo batterio è talmente diffusa che si è sviluppato un ceppo resistente ai beta-lattamici (quali le penicilline e le cefalosporine) denominato *S. aureus* meticillino-resistente (MRSA).

MRSA divenne contemporaneamente resistente a numerosi farmaci come:

- Streptomicina che agisce sui ribosomi.
- Eritromicina che agisce sui ribosomi.
- Bactrin che combina due farmaci (sulfametossazolo e trimetoprim) capaci di bloccare la sintesi dell'acido tetraidrofolico, fondamentale per la sintesi del DNA

La virulenza di questi ceppi multiantibiotico resistenti e la loro ampia distribuzione ne fanno una minaccia anche a livello mondiale: per esempio ogni anno negli Stati Uniti vengono ricoverati in ospedale 275.000 individui affetti da infezioni di MRSA e si registrano 19.000 decessi [9]. Negli ultimi anni, non solo è aumentata la prevalenza di ceppi di *S. aureus* resistenti alla meticillina (MRSA) ma anche ad altri antibiotici come aminoglicosidi, minociclina e fluorochinoloni, portando alla affermazione di ceppi batterici detti "super-bags" o totiresistenti [10].

E. coli è un enterobatterio Gram negativo, asporigeno, a forma di bacillo; è un commensale aerobio e anaerobio facoltativo [11]. Numerosi sierotipi appartengono al normale microbiota intestinale: la definizione di commensale deriva dal fatto che questo batterio sfrutta a proprio vantaggio le sostanze nutritive presenti nel colon senza arrecare alcun danno all'organismo umano. Inoltre contribuisce alla sintesi di vitamina K, oltre a intervenire nelle reazioni di fermentazione del lattosio. Per questo, data la sua proprietà benefica, un ceppo particolare di *E.*

coli (Nissle 1917) viene utilizzato come trattamento probiotico per una varietà di malattie che vanno da diarrea infettiva a colite ulcerosa.

Alcuni sierotipi di *E. coli* sono, tuttavia, risultano pericolosi per l'uomo: tali ceppi si distinguono dai normali commensali per i determinanti antigenici del lipopolisaccaride e per la capacità di esprimere fattori di virulenza tali da poter causare malattie intestinali ed extra-intestinali importanti, come enteriti, colite emorragica, infezioni urinarie, polmonite, meningite e setticemia.

I fattori di virulenza prodotti dai ceppi patogeni di *E. coli* possono alterare molti processi della cellula ospite inclusa la sintesi proteica, il segnale di trasduzione, la funzione citoscheletrica, la divisione cellulare, la secrezione, la trascrizione e l'apoptosi. Le tossine che interrompono questi processi cellulari sono accompagnate da numerosi fattori di colonizzazione che consentono ai batteri di aderire e/o invadere le cellule ospiti.

Le malattie causate da *E. coli* derivano sia da fonti esogene (animali, acqua, alimenti contaminati come carni poco cotte, verdure non lavate e bevande non pastorizzate) sia endogene causate da batteri che costituiscono il microbiota batterica del paziente ma che traslocano a siti anatomici diversi.

Le infezioni che si trasmettono per via oro-fecale possono verificarsi quando:

- Il microrganismo colonizza siti corporei diversi da quelli in cui è normalmente presente (dall'intestino alle vie urinarie)
- L'uomo viene a contatto con ceppi batterici tipici di altri animali
- Per quanto riguarda questo ceppo, in India la resistenza agli antibiotici aumenta di giorno in giorno con un massimo del 12–59% sviluppando resistenza alla beta lattamasi a spettro esteso (ESMBL)[4].

Anche le infezioni fungine sono aumentate significativamente negli ultimi decenni, con alti tassi di morbilità e mortalità. Si stima che le malattie fungine colpiscano circa 1,2 miliardi di individui nel mondo con almeno 1,5 milioni di decessi ogni anno [12]. Gli agenti causali predominanti includono specie di *Candida*, oltre a *Aspergillus* e *Cryptococcus*[13].

Candida spp. appartiene alla categoria dei funghi opportunisti, un gruppo di agenti patogeni responsabili di infezioni in pazienti vulnerabili, immunosoppressi, o affetti da infezioni HIV o altre condizioni di immunodeficienza acquisita o pazienti chemioterapici [14]. Rappresenta la causa più comune di infezioni fungine invasive nell'uomo; un esempio è dato dalla candidemia, infezione nosocomiale sistemica frequente nei paesi sviluppati.

Tra tutte le diverse specie di *Candida*, *C. albicans* è il patogeno umano più comune, seguito da *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e il membro recente *C. auris* [15]. *C. albicans* appartiene alla normale flora microbica umana, presente nel tratto gastrointestinale, genitourinario, respiratorio, e cavità orale, la cui crescita è normalmente controllata dal microbiota batterico.

In presenza di alterazioni di questo microbiota, quali uso di antibiotici, si può avere una sovracrescita e invasione di *Candida* con conseguenti infezioni localizzate o disseminate (soprattutto in caso di ustioni, periodo post operatorio, terapia antibiotica, cateteri). Inoltre, in aggiunta ai problemi relativi alla multiresistenza e alla difficoltà di diagnosi, il biofilm fungino e batterico è diventato un importante fattore di infezione e complicazioni anche mortali: si stima che l'80% di tutte le infezioni negli Stati Uniti siano legate alla formazione di biofilm, che presentano una capacità mille volte superiore di limitare gli antibiotici rispetto alla loro comparabile coltura cellulare [12].

I biofilm di specie di *C. albicans* e di specie non albicans come *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* e *C. krusei*, presenti sulla superficie della mucosa, rappresentano l'agente eziologico più importante delle malattie fungine nelle persone immunocompromesse [12]. In questo modo, la presenza di biofilm diminuisce la suscettibilità delle difese dell'ospite e porta alla resistenza contro la maggior parte degli agenti antimicrobici convenzionali complicando ulteriormente il trattamento [12].

2.2 Meccanismi di resistenza di batteri e funghi

La resistenza microbica è la mancanza di suscettibilità del microrganismo a un antimicrobico[12]: tale valutazione viene effettuata mediante test *in vitro* e il microrganismo è definito resistente quando la Concentrazione Minima Inibente (MIC) del farmaco supera i limiti di suscettibilità per quell'organismo.

I modi in cui i batteri superano l'azione dei farmaci sono molti e variegati; la resistenza microbica può essere definita intrinseca o estrinseca e viene trasmessa all'interno della stessa specie o tra specie diverse [16].

La resistenza intrinseca o primaria è naturalmente presente in un batterio e si manifesta per la mancanza del bersaglio come nel caso dei micobatteri che non presentano la parete con il peptidoglicano e quindi sono resistenti agli antibiotici beta-lattamici. Oppure l'antibiotico può non entrare nel microrganismo; per esempio i batteri Gram negativi sono impermeabili alla penicillina G.

La resistenza estrinseca o acquisita si verifica quando un microrganismo diventa resistente ad un antibiotico a cui prima invece era sensibile. Questo avviene per mutazioni casuali nel DNA del cromosoma o perché il batterio acquisisce da altri batteri antibiotico-resistenti plasmidi recanti geni di resistenza.

Tra i vari meccanismi di antibiotico resistenza nei batteri troviamo l'espressione di enzimi che catalizzano la degradazione o la modifica degli antibiotici o l'espressione di pompe di efflusso deputate all'espulsione dell'antibiotico dalla cellula batterica, diminuendo la concentrazione intracellulare nel sito d'azione e vanificando così il suo effetto terapeutico [17].

L'attività delle pompe di efflusso provoca concentrazioni di farmaci subletali nel sito attivo e questo predispone i microrganismi allo sviluppo di una resistenza ad alto livello contro agenti antimicrobici [10]. Inoltre i ceppi batterici acquisiscono resistenza agli antibiotici β -lattamici mediante la produzione di enzimi β -lattamasi o modificando le proteine leganti la penicillina (PBP). Per esempio i ceppi MRSA esprimono una PBP diverso dai ceppi di *S. aureus* (PBP2' o PBP2a) che presenta una bassa affinità per gli antibiotici β -lattamici impedendone così il legame [18].

Anche tra i funghi sono stati identificati [13] numerosi meccanismi adattativi nella resistenza (acquisita) ai farmaci antimicotici tra cui:

- Sovraregolazione di trasportatori multifarmaco che provoca un aumento dell'efflusso dell'antimicotico,
- Mutazione del target del farmaco mediante sostituzioni di amminoacidi e impedendo così il legame con il farmaco,
- Alterazione del percorso di biosintesi dell'ergosterolo,
- Segnalazione attraverso vie di risposta allo stress o alterazioni nelle vie cellulari.

La resistenza acquisita negli agenti patogeni fungini può essere accelerata attraverso molteplici fattori tra cui, a titolo esemplificativo, la plasticità genetica di un organismo, l'esistenza di ceppi ipermutatori o influenze ambientali che rendono i ceppi resistenti ai fungicidi [13].

Un altro meccanismo di resistenza sviluppato dai funghi è dato dal glicano, la matrice che circonda i biofilm fungini, che agisce come una barriera di materiale fisico impedendo così al farmaco il raggiungimento del suo obiettivo diminuendo la biodisponibilità e l'efficacia dei composti antimicrobici [13]: un'azione simile può essere data anche dai cambiamenti nella membrana cellulare e nella composizione della parete.

Anche la formazione di biofilm porta ad una diminuzione dell'efficacia dell'antibiotico contribuendo alle infezioni correlate ai dispositivi medici impiantati (come cateteri, pacemaker ecc.) in quanto gli organismi infettanti si attaccano alla superficie di questi oggetti e creano un biofilm resistente[12].

I biofilm batterici e fungini sono ammassi cellulari microbici incorporati nella matrice extracellulare: questa struttura facilita l'adesione del microrganismo alle superfici biotiche e abiotiche e protegge le cellule dalla risposta immunitaria dell'ospite e dall'azione delle sostanze antimicrobiche, rendendo così difficile l'eradicazione del microrganismo [12]. Oltre a ciò, i biofilm possono essere multispecie e cambiare nel tempo accumulando microrganismi "immigrati" e alterando la struttura e la funzione dell'associazione microbica. Inoltre la sua presenza riduce la suscettibilità delle difese dell'ospite complicando ulteriormente il trattamento. L'effetto combinato di questi meccanismi contribuisce allo sviluppo di organismi sempre più resistenti.

2.3 Meccanismi di attività antibatterica di estratti vegetali

I fitocomposti possono influenzare la crescita microbica attraverso diversi meccanismi come alterazione della membrana cellulare, inibizione dei sistemi di trasporto, interferenza con i processi metabolici e modulazione della trasduzione del segnale o dell'espressione genica [17]. Inoltre si ritiene che i principi attivi provenienti da droghe ad attività antibatterica possano inibire o modificare i meccanismi di resistenza nella cellula batterica e quindi per questo motivo mostrano un'attività sinergica con gli antibiotici [17].

Il meccanismo di sinergia può derivare da:

- Modifica dei siti attivi della cellula batterica
- Inibizione degli enzimi che catalizzano la degradazione o la modifica degli antibiotici
- Aumento della permeabilità di membrana
- Inibizione delle pompe di efflusso

2.3.1 Modificazione dei siti attivi della cellula batterica

La resistenza agli antibiotici β -lattamici è particolarmente presente nei batteri Gram positivi. Gli antibiotici beta-lattamici inibiscono il metabolismo del peptidoglicano, costituente essenziale della parete cellulare, legandosi alle proteine leganti la penicillina (PBP) che catalizzano il legame incrociato del peptidoglicano nella struttura a maglie [17]. Senza la struttura a maglie, la parete cellulare diventa debole compromettendo così l'integrità della cellula batterica.

La resistenza si verifica a causa della ridotta affinità dei PBP per gli antibiotici o a causa della ridotta produzione di queste proteine. Tutti i fattori che modificano la struttura, l'attività o la sintesi di PBP influenzano la riduzione della resistenza [17].

La resistenza alla meticillina, invece, è dovuta all'espressione di un'ulteriore proteina legante la penicillina (PBP2a) che ha una bassa affinità di legame per i beta-lattamici, e consente la sintesi della parete cellulare. La meticillina inibisce così le attività transpeptidazionali di altre PBP, ma la PBP2a rimane attiva assicurando la reticolazione delle catene glicaniche nel peptidoglicano. In generale le cellule cresciute in presenza di meticillina mostrano una marcata riduzione del grado di reticolazione ma sufficiente per garantire la sopravvivenza delle cellule batteriche [17].

Si sono evidenziate interazioni sinergiche [17] tra antibiotici beta-lattamici e composti naturali per contrastare microrganismi resistenti. Tra questi:

- Le catechine di *Camelia sinensis* L. o epigallocatechine gallato dal tè verde,
- La tellimagrandin 1 e la rugosin B da *Rosa canina* L.,
- La corilagina da *Arctostaphylos uva-ursi* (L.).

Infatti la corilagina riduce notevolmente la MIC (minima concentrazione inibitoria) dei beta-lattamici nel ceppo MRSA inibendo l'attività o la produzione delle PBP2. La sinergia tra

epigallocatechina gallato e antibiotici beta-lattamici è raggiunta in quanto sia direttamente che indirettamente attaccano lo stesso sito bersaglio cioè il peptidoglicano presente sulla parete cellulare.

Il gruppo –OH dei fenoli è abbastanza reattivo da inattivare i siti attivi della molecola bersaglio e inibire la crescita dei microrganismi bloccando il processo metabolico [4]. I composti naturali, se usati in combinazione con altre classi di antibiotici, possono inibire i bersagli modificati o mostrare una sinergia bloccando bersagli nella via metabolica.

2.3.2 Inibizione degli enzimi

La cellula batterica è costituita da vari sistemi enzimatici, che inattivano o modificano gli antibiotici, attraverso i processi di idrolisi, sostituzione di gruppi attivi come acetilazione, fosforoglicosilazione e adenilazione e processi di ossidoriduzione [17].

Le β -lattamasi sono gli enzimi prodotti da alcuni batteri responsabili della loro resistenza agli antibiotici β -lattamici come penicilline e cefalosporine. Fanno parte del gruppo delle liasi, che distruggono il legame amminico dell'anello β -lattamico trasformandolo in forma inattiva [17].

Sulla base di studi effettuati, i composti vegetali attivi possono inibire questi enzimi prevenendo la degradazione degli antibiotici. Gli inibitori della β -lattamasi vengono somministrati con gli antibiotici come co-farmaci. Uno studio [17] ha dimostrato che l'epigallocatechina gallato estratta dalla pianta di *Camelia sinensis* (L.) Kuntze presenta un'attività sinergica e aumenta l'effetto degli antibiotici inibendo le β -lattamasi.

La strategia di successo per superare la resistenza alla penicillasi (altra tipologia di enzima prodotto da batteri penicillino-resistenti) è di somministrare acido clavulico con farmaci sulbactam e tazobactam ma un uso frequente di clavulanato ha portato all'emergere di ceppi batterici multiresistenti [1].

Uno studio [1] ha confermato che l'epigallocatechina gallato inibisce le penicillasi prodotte da *S. aureus* ripristinando così l'attività della penicillina. Essa agisce in maniera dose-dipendente con inibizione del 50% ad una concentrazione pari a 10 mg/ml. Inoltre la combinazione di ampicillina e sulbactam risulta essere efficace ma non abbastanza potente contro MRSA che producono beta-lattamasi ma quando questi vengono combinati con epigallocatechina gallato la MIC₉₀ viene ridotta a 4 mg/ml da un valore iniziale di 16 mg/ml [1].

2.3.3 Aumento della permeabilità di membrana

Nei batteri Gram positivi, la parete cellulare è composta da diversi strati di peptidoglicano, che sono per lo più permeabili ai diversi composti. In assenza di membrana esterna risulta facilitato l'ingresso di composti idrofobici con conseguente distruzione della membrana cellulare [17].

Nei Gram negativi, invece, la parete cellulare è costituita da un singolo strato di peptidoglicano,

uno strato di lipoproteine e uno strato di lipopolisaccaridi, noto come membrana esterna, formando una barriera di permeabilità per molti agenti idrofobici esterni come gli antibiotici.

Le lipoproteine batteriche hanno la funzione di ancorare la membrana esterna allo strato peptidoglicano periplasmatico e i lipopolisaccaridi rappresentano il 75% della superficie totale della membrana. È noto poi che alcuni gram negativi contengono glicosfingolipidi al posto di LPS nella loro membrana esterna.

La membrana esterna è una barriera significativa per molti composti compresi gli antibiotici per di diversi motivi:

- I polisaccaridi limitano o prevengono la penetrazione di antibiotici ad alto peso molecolare,
- Lo strato lipidico limita la penetrazione di molecole idrofile,
- Le porine consentono il trasporto di molecole idrofile.

L'ingresso nello spazio periplasmatico degli antibiotici avviene per diffusione attraverso le porine o attraverso il doppio strato lipidico per solubilizzazione. Dopo aver attraversato la membrana esterna, i composti possono essere trasportati dalle pompe di efflusso o essere inattivati da enzimi, prima di raggiungere la membrana cellulare che limita l'afflusso di composti nel citoplasma.

I composti fenolici e i terpeni cambiano la funzione e la struttura della membrana e aumentano la permeabilità della membrana stessa principalmente a causa di una diminuzione della densità lipidica nel doppio strato. Inoltre gli acidi fenolici interrompono l'integrità della membrana e causano la fuoriuscita di costituenti intracellulari essenziali. Probabilmente l'aumento di permeabilità della membrana porta ad un aumento del livello degli antibiotici all'interno delle cellule batteriche e alla loro migliore interazione con bersagli intracellulari.

Ad esempio l'eugenolo estratto dalla pianta di *Syzygium aromaticum* (L.) Merr & L.M. Perry migliora l'efficacia degli antibiotici contro batteri Gram negativi aumentando la permeabilità della membrana cellulare e alla concentrazione di 1 mM provoca fino al 50% del danno di membrana [17]. L'eugenolo, grazie alla sua natura idrofobica, è in grado di penetrare lo strato esterno della membrana cellulare dei Gram negativi alterandone la struttura e provocando la fuoriuscita dei costituenti intracellulari [18].

Anche il carnosolo e l'acido carnosico provenienti da *Rosmarinus officinalis* L. aumentano la permeabilità della membrana cellulare facilitando così l'ingresso di aminoglicosidi all'interno della cellula [19]. Questi risultati supportano l'idea che carnosolo e acido carnosico agiscano sulla permeabilità della membrana cellulare dei batteri Gram positivi in quanto la presenza di membrana esterna nei Gram negativi ostacola l'ingresso degli antibiotici [19].

Coronarina D risulta attiva contro i batteri Gram positivi ma inattiva contro i Gram negativi essendo in grado di attraversare la membrana cellulare e danneggiarne la struttura [7].

2.3.4 Inibizione delle pompe di efflusso

Uno dei meccanismi di resistenza indotta dai batteri avviene anche attraverso lo sviluppo di pompe di efflusso per espellere gli antibiotici dalle cellule. Le pompe di efflusso funzionano tramite idrolisi dell'ATP o per differenza di concentrazione di ioni. Numerosi composti di origine vegetale agiscono da inibitori delle pompe di efflusso e principalmente sono attivi contro i batteri Gram positivi [17].

L'acido carnosico e il carnosolo, ad esempio, agiscono in sinergia e aumentano l'attività della tetraciclina contro ceppi di *S. aureus* inattivando la pompa di efflusso Tet (K) e impedendo l'espulsione dell'antibiotico. Inoltre l'acido carnosico agisce come inibitore della pompa di efflusso NorA ripristinando il livello della concentrazione intracellulare del farmaco. Sembra che il carnosolo agisca su una pompa di efflusso multifarmaco EfrAB presente nei ceppi di *Enterococcus faecalis*, responsabile della resistenza contro molti farmaci come l'arbekacina, ciprofloxacina e bromuro di etidio [19].

Anche la baicalena, presente nelle foglie di *Thymus vulgaris* L. inibisce la pompa di efflusso NorA dei ceppi di *S. aureus* resistente alla meticillina (MRSA) aumentando l'efficacia della ciprofloxacina. Inoltre presenta sinergia con gentamicina agendo sulla stessa pompa NorA presente negli enterococchi resistenti alla vancomicina [17].

La cimmaldeide, estratta dalla corteccia di *Cinnamomum zeylanicum* Blume riduce la resistenza dell'antibiotico clindamicina inibendo la pompa di efflusso CdeA di *Clostridium difficile*.

L'epigallocatechina gallato aumenta l'accumulo di tetraciclina nei ceppi di *S. aureus* inibendo pompe di efflusso TETk e migliora anche l'attività della norfloxacina contro ceppo di *S. aureus* che ospita pompe NorA.

Un altro caso riguarda l'azione della berberina combinata con 5 metossiindocarpina, entrambe prodotte dalla pianta del *Berberis vulgaris* L. La berberina (alcaloide idrofobico) risulta inefficace come agente antibatterico perché viene estruso dalle pompe di resistenza multifarmaco. Quindi la pianta produce l'altra molecola (5 metossiindocarpina) che blocca la pompa MDR favorendo l'azione antibatterica della berberina [8].

Gli inibitori della pompa di efflusso provenienti da fonti naturali possono essere somministrati con l'antibiotico per diminuire il grado di resistenza dei batteri ai farmaci, invertire la resistenza acquisita del microrganismo o ridurre l'emergere di ceppi batterici resistenti.

2.4 Estratti vegetali testati

In questo lavoro di tesi sono stati analizzati 8 estratti vegetali a titolo diverso:

- 1 Estratto titolato al 1% di verbascoside
- 2 Estratto titolato al 50% di teupolioside
- 3 Estratto titolato al 66% di verbascoside
- 4 Estratto titolato al 7% glabridina
- 5 Estratto titolato al 19% di acido rosmarinico
- 6 Estratto titolato al 60% di acido clorogenico + 5% cianidina 3 o glucoside
- 7 Estratto titolato al 61% di verbascoside
- 8 Estratto titolato al 70% di plantamajoside

2.4.1 Verbascoside

Il verbascoside o acteoside è un glucoside feniletanoide. I glicosidi feniletanoidi (comunemente indicati anche come glicosidi del feniletanolo) appartengono al gruppo più numeroso di metaboliti secondari prodotti principalmente in risposta a stress biotici o abiotici[20].

In generale lo scheletro dei glicosidi feniletanoidi, mostrato in fig.1, comprende tre parti: alcool feniletilico, derivato dell'acido cinnamico (solitamente acido caffeico o ferulicoro e più raramente lo stesso acido cinnamico) e un gruppo glicosilico [21]. Inoltre la frazione di glucosio che è il nucleo centrale di questi feniletanoidi funge da ponte tra le due strutture aromatiche, è comunemente decorato dalla presenza di zuccheri aggiuntivi, quali apiosio, arabinosio, galattosio, glucosio, ramnosio o xilosio mediante un legame glicosidico [20].

Il verbascoside (fig.2) è caratterizzato da acido cinnamico (C6–C3) e idrossifeniletile (C6–C2) attaccate a un β -glucopiranosio. La presenza dello zucchero nella struttura rende questo composto solubile in acqua e facilita l'estrazione e la separazione tramite i metodi tradizionali[21]. È un composto ampiamente distribuito nel regno vegetale nelle specie dell'ordine *Lamiales* ed è stato isolato per la maggior parte, da piante medicinali.

Fino ad oggi il verbascoside è stato rilevato principalmente nella pianta del verbasco (*Verbascum sinuatum* L.) ma è stata trovata anche in più di 200 specie vegetali appartenenti a 23 famiglie come *Olea europea* L. [22].

Il composto è stato rilevato sia nelle parti di piante presenti nel sottosuolo come ad es. le radici primarie e secondarie che a livello di steli, foglie e fiori a concentrazioni molto variabili. Inoltre è stato riscontrato che il contenuto di verbascoside varia all'interno delle specie vegetali appartenenti allo stesso genere; partendo dallo 0,2% nel *Verbascum phoeniceum* L. fino al 3% nel *Verbascum nigrum* L.

Un'altra fonte preziosa è data dai sottoprodotti industriali. Ad esempio, i rifiuti di frantoi, ottenuti come sottoprodotto della lavorazione del frutto dell'olivo, contengono abbondanti quantità di verbascoside oltre a molti altri composti fenolici (es. oleuropeina, idrossitirosolo, acido caffeico e alcuni flavonoidi) [22].

Il verbascoside possiede un'ampia gamma di attività biologiche tra cui antibatterico, antitumorale, antivirale, anti-infiammatorio, neuroprotettivo, antiossidante, epatoprotettivo, immunomodulante, analgesico, cardioprotettivo, immunomodulante, regolatore del glucosio, antiasmatico, antiulcera, antiipertensivo, anti osteoporosi, presenta funzionalità a livello renale e degli ormoni sessuali come attività protettiva e inibisce l'attività enzimatica. Inoltre presenta un ruolo nella prevenzione e trattamento di una varietà di malattie della pelle.

Tuttavia, va notato che alcune di queste attività si sono verificate a concentrazioni relativamente elevate di verbascoside e sono stati osservati principalmente *in vitro* o negli animali da esperimenti [22].

Per quanto riguarda l'attività antimicrobica, sette composti isolati dalle specie di *Lippia* hanno confermato l'elevata attività anti-*Cryptococcus neoformans* del verbascoside. E l'acteoside proveniente dalla parte aerea di *Penstemon centranthifolius* (Scarlet Bugler) mostra effetti inibitori sulla sintesi di biofilm di *E. coli* [22].

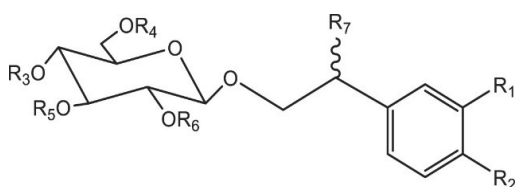


Figura 1: Lo scheletro dei glicosidi feniletanoidi (Tian, 2021, p. 2)

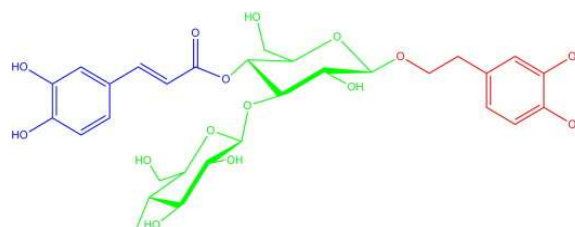


Figura 2: La struttura del verbascoside. Le frazioni di feniletanoide (in rosso) e acido caffeico (in blu) sono attaccate a α -ramnopiranosil- β -glucopiranosio (in verde). (Alipieva, 2014, p. 1066)

2.4.2 Teupolioside

Un altro composto usato è il teupolioside (fig.3), appartenente alla categoria dei glicosidi feniletanoidi.

È stato isolato per la prima volta nella pianta di *Teucrium polium* L. ed è stato trovato come il metabolita più abbondante in *Ajuga reptans* L., pianta appartenente alla famiglia delle Labiate, originaria dell'Europa e distribuita nelle regioni temperate dell'Asia, Africa, Australia e Nord America [20].

Questa pianta è nota fin dal Medioevo per le proprietà antiemorragiche e antinfiammatorie e per la peculiare attività cicatrizzante [23]. Oltre ad essere usato nella medicina popolare sotto

forma di infuso come sedativo della tosse, emostatico, antiseptico, antinfiammatorio, agente di regolazione del metabolismo e per trattare l'ittero e i reumatismi [23]. La pianta presenta anche proprietà antiossidanti, antiulcerative, antibatteriche, antimicrobiche, antimicotiche, antitumorali, antiasmatiche, antidiarroiche ed epatoprotettive.

Per quanto riguarda l'attività antibatterica, sembra essere efficace sia contro Gram positivi che Gram negativi, tra cui *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella pneumoniae* [23].

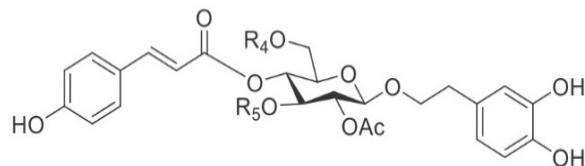


Figura 3: La struttura del teupolioside (Tian, 2021, p. 4)

2.4.3 Glabridina

La glabridina (fig.4) è un importante flavonoide (isoflavano prenilato) estratto dalla radice di *Glycyrrhiza glabra* L. (Fabaceae) con un contenuto attorno allo 0,2% [24]. Gli isoflavonoidi naturali sono distribuiti principalmente nelle piante leguminose (Fabaceae) e la glabridina si accumula solo nello strato del sughero delle radici della liquirizia [25].

Considerando il suo ruolo come fitoalessina, la quantità nel materiale esaminato può riflettere lo stress ambientale a cui erano soggette le parti produttrici di *G. glabra* L. Di conseguenza, il contenuto di glabridina può variare a seconda del tipo di coltivazione e della zona geografica da cui sono state raccolte le radici [25].

Il composto ha un'ampia gamma di attività farmacologiche: presenta un'attività anticancro, antinfiammatorio, antiossidante, anti osteoporosi, agisce sulle anomalie metaboliche riducendo la glicemia e i lipidi nel sangue migliorando l'obesità, diabete e le malattie cardiovascolari, presenta la funzione di protezione del sistema nervoso e agisce come sostituto degli estrogeni partecipando alla regolazione del dispendio energetico cellulare.

La glabridina inoltre presenta effetti antibatterici contro una varietà di batteri patogeni come *S. aureus*, *S. epidermidis* e MRSA. Gli effetti anti-*S. aureus* della glabridina sono correlati all'inibizione della formazione di biofilm [24]. È contrasta anche altri patogeni come ad esempio *Helicobacter pylori*, *E.faecalis*, *Porphyromonas*, *Streptococcus mutans*, *Mycobacterium tuberculosis* [24,26]. Inoltre è stato dimostrato un'attività potente contro *C. albicans* agendo in sinergia con la nistatina e contro ceppi di *C. albicans* resistenti all'amfotericina B [27].

Presenta anche un effetto sinergico con gli antibiotici. Ad esempio, per *S. aureus*, la glabridina potrebbe ridurre i valori MIC di diversi antibiotici come la norfloxacina (4 volte), oxacillina (2 volte) e vancomicina (2 volte) [24].

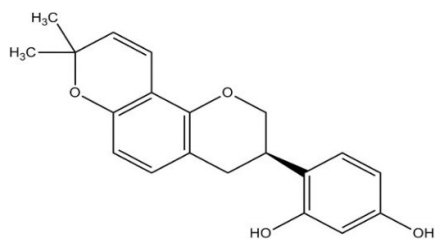


Figura 4: La struttura della glabridina (Li, 2021, p.2)

2.4.4 Acido clorogenico

Originariamente, il termine di “acidi clorogenici (CGA) si riferiva ad un gruppo di composti esterei formati tra acido trans-cinnamico (come l’acido caffeico, l’acido p-cumarico e l’acido ferulico) e l’acido chinico (come l’acido caffeilchinico). Attualmente, il termine "acido clorogenico" (fig. 5) si riferisce in particolare all’acido 5-O-caffeoilchinico in quanto rappresenta l’isomero più abbondante nella dieta e nelle fonti vegetali [28].

Sono composti fenolici prodotti dalle piante che si trovano in abbondanza nei tuberi di patata, nelle foglie di patate dolci, nelle melanzane, nei pomodori, nei semi di girasole e nei chicchi di caffè verde in cui si ha un contenuto che va dal 6 al 12% p/p di acido clorogenico totali (la maggiore quantità di CGA nelle piante).

L’acido clorogenico promuovere una vasta gamma di benefici per la salute e presenta degli effetti protettivi biologici in vari tessuti e organi tra cui il sistema nervoso e cardiovascolare, il tratto gastrointestinale, i reni, il fegato, i muscoli, la milza e il pancreas [28]. Inoltre è correlato negativamente con il rischio di varie condizioni nocive, come lo stress ossidativo, la sindrome metabolica, la steatosi epatica, i disturbi mentali, le malattie neurodegenerative e cardiovascolari e il cancro. Influenza inoltre il metabolismo dei lipidi e del glucosio nei disordini geneticamente metabolici attenuando sia la riduzione della concentrazione plasmatiche di HDL che l’aumento del colesterolo totale e della concentrazione plasmatiche di LDL [29].

È stato riportato che il composto può essere un potenziale agente antivirale e antibiotico naturale grazie alla sua attività antimicrobica ad ampio spettro che include virus, batteri, muffe e lieviti. Agisce contro alcuni funghi patogeni come *C. albicans* danneggiando la struttura della membrana e inibisce la crescita batterica aumentando la permeabilità della membrana e portando a una disfunzione della parete [28]. Inoltre presenta un effetto inibitorio sui sistemi di efflusso multifarmaco di batteri multifarmaco-resistenti e sulla loro formazione di biofilm [29].

In particolare è attivo contro i ceppi di *Stenotrophomonas maltophilia* resistente a

trimetoprim/sulfametossazolo, *K. pneumoniae*, *H. pylori*, *E. coli*, *S. epidermidis* e *S. aureus*.



Figura 5: La struttura dell'acido clorogenico (Lu, 2020, p.3134)

2.4.5 Acido rosmarinico

L'acido rosmarinico (fig. 6) è stato isolato per la prima volta come composto puro dalla pianta di *Rosmarinus officinalis* L. da cui ha dato il nome del composto. È un estere dell'acido caffeico e dell'acido 3,4-diidrossifenillattico [30].

In studi di biogenetica è stato notato che i due amminoacidi aromatici fenilalanina e la tirosina sono incorporati nella struttura dell'acido rosmarinico: la parte dell'acido caffeico è formata solo da fenilalanina e l'acido 3,4-diidrossifenillattico deriva dalla tirosina.

L'acido rosmarinico è presente in tutte le Boraginaceae, mentre all'interno delle Lamiaceae è limitato solo alla sottofamiglia Nepetoideae. Inoltre è stato rilevato anche in altre famiglie come le Apiaceae, Aaliaceae, Cucurbitaceae e Rubiaceae. L'acido rosmarinico ha proprietà astringenti, antiossidanti, antinfiammatorie; è antimutageno, antibatterico e antivirale. Per questo è usato nella terapia delle infezioni da *Herpes simplex* con estratti contenenti acido rosmarinico provenienti da *Melissa officinalis* L.

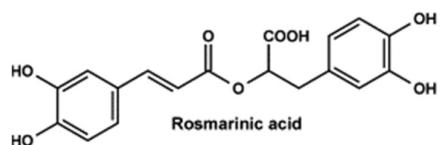


Figura 6: La struttura dell'acido rosmarinico (Petersen, 2003, p.122)

2.4.6 Plantamajoside

Il plantamajoside (fig. 7) si trova principalmente nella famiglia delle Plantaginaceae e nel genere *Plantago* di cui rappresenta circa 275 specie ed è stato riscontrato che 20 di queste specie contengono plantamajoside [31].

Questo composto, come il verbascoside, si accumula maggiormente nelle radici rispetto alle foglie in modo dipendente dall'età della pianta. Per esempio il composto rappresenta il principale glucoside dell'acido caffeico nelle radici di *Plantago lanceolata* L. Tuttavia, altri studi hanno evidenziato che le foglie più giovani di *Plantago major* L. contenevano una maggiore concentrazione di plantamajoside rispetto alle foglie più vecchie. È stato poi notato che la concentrazione di plantamajoside dipende non solo dall'età ma anche dalle condizioni di crescita.

Plantamajoside presenta una vasta gamma di attività biologiche negli studi *in vivo* e *in vitro* come ad esempio attività antibiotica, anti-infiammatoria, anti ossidativa, citotossica, inibisce l'attività enzimatica ed è coinvolta nella patogenesi del diabete inibendo l'attività del glutatione e prevenendo così le complicazioni a carico dell'apparato vascolare.

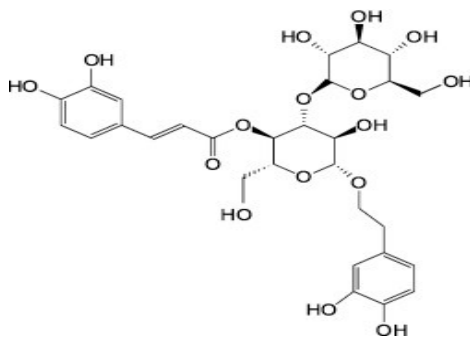


Figura 7: La struttura del plantamajoside (Ravn, 2015, p. 43)

2.5 Meccanismi dell'attività sinergica tra oli essenziali e farmaci antimicotici

L'aumento della resistenza fungina ai classici farmaci (fluconazolo, amfotericina B, flucitosina, ecc.), la loro tossicità e i costi giustificano la ricerca di nuove alternative terapeutiche antimicotiche[14].

Per un nuovo candidato antimicotico dovrebbero essere presenti le seguenti caratteristiche:

- Meccanismi d'azione selettivi
- Ridotta/nessuna tossicità per l'ospite
- Poche interazioni antagoniste con altri farmaci
- Attività preferibilmente fungicida piuttosto che fungistatica
- Ampio spettro di attività contro funghi patogeni resistenti o multiresistenti

In assenza di una monoterapia efficace, le terapie combinate vengono utilizzate per il trattamento di infezioni fungine invasive e potenzialmente pericolose per la vita [12].

I potenziali benefici della terapia combinata includono:

- Targeting complementare all'interno delle cellule fungine dovuto all'azione simultanea di diversi meccanismi
- Ampliamento dello spettro d'azione
- Riduzione della tossicità dovuta all'uso di dosaggi inferiori
- Minor numero di organismi resistenti.

Per questi nuovi approcci gli oli essenziali sono uno dei gruppi più promettenti tra i composti naturali per l'uso nella prevenzione e trattamento delle infezioni fungine [14]. E' stato dimostrato che diversi oli essenziali mostrano sinergia con antimicrobici diventando un mezzo per riutilizzare gli antibiotici clinici e fornire soluzioni per affrontare la resistenza nei patogeni fungini [15].

A causa della complessità nella composizione degli oli essenziali, il meccanismo d'azione dipende dai vari costituenti attivi presenti nella combinazione sinergica [15]. Inoltre è possibile che le variazioni nella velocità di penetrazione dell'olio essenziale attraverso la parete cellulare fungina e la struttura della membrana cellulare possano spiegare le differenze nell'efficacia di vari oli essenziali sulla crescita fungina, considerando le loro diverse composizioni[32].

I principali meccanismi dell'attività sinergica tra oli essenziali e farmaci antimicotici sono:

1) Alterazione della permeabilità della membrana cellulare: la modulazione della permeabilità della membrana ha un forte effetto sulla vitalità cellulare, determinando un risultato microbicide sul patogeno bersaglio. Ad esempio, quando l'olio essenziale di *T. vulgaris* è stato combinato con nistatina, è stata alterata la permeabilità della membrana cellulare, inibendo così la crescita cellulare.

2) Perdita di componenti intracellulari della cellula fungina: l'alterazione nella permeabilità della membrana determina la perdita di contenuto intracellulare, portando così alla morte cellulare. La combinazione di *Coriandrum sativum* L. con amfotericina B può portare alla permeazione della membrana cellulare e alla perdita dei componenti intracellulari nelle specie di *C. albicans* e *C. tropicalis*.

3) Potenziamiento della penetrazione transdermica dei farmaci: la combinazione di antibiotico ed oli essenziali può eventualmente attivare una pompa/trasportatore sulla membrana cellulare, facilitando così l'ingresso transdermico del farmaco antimicotico e la conseguente morte cellulare del patogeno. Tale meccanismo è stato dimostrato per la combinazione di *Pelargonium graveolens* L'Hér con amfotericina B e ketoconazolo contro specie di *Aspergillus niger* and *A. flavus*. Un meccanismo simile potrebbe essere efficace anche contro *Candida* spp.

4) Inibizione della formazione di biofilm fungini: i biofilm microbici sono una delle ragioni principali

per lo sviluppo di infezioni nelle malattie umane e il 65% delle infezioni è causato da microrganismi che crescono sulle superfici piuttosto che nello stato planctonico a vita libera.

È stato segnalato che gli oli essenziali di diverse piante medicinali inibiscono la formazione di biofilm di *Candida* spp.

5) Alterazione della struttura della parete cellulare: si è visto che molti oli essenziali e farmaci antibatterici e fungini interrompono la parete cellulare fungina. È stato riportato che la combinazione sinergica di *Mentha suaveolens* Ehrh. e fluconazolo altera la struttura della parete cellulare, arrestando così la crescita cellulare.

6) Inibizione della formazione del tubo germinale: la combinazione sinergica dell'olio di *Piper bredemeyeri* J.Jacq. mescolato con itraconazolo ha inibito la crescita cellulare di *C. albicans* interrompendo la formazione dei tubi germinali. Per esempio l'olio essenziale di coriandolo ha causato l'inibizione della formazione del tubo germinale nei ceppi di *C. albicans* potenziando l'effetto noto dell'amfotericina B. questo effetto non può essere osservato, invece, nei ceppi di *C. tropicalis* a causa della sua incapacità di formare tubi germinali.

7) Formazione di strutture simili a mesosomi: l'olio essenziale di *Melaleuca leucadendra* (L.) quando combinato con diversi antibiotici antimicotici ha mostrato un'azione sinergica probabilmente a causa della formazione mediata dall'olio essenziale di strutture simili a mesosomi nella membrana cellulare di *C. albicans*, rendendo così la membrana permeabile agli antibiotici.

8) Interruzione della biosintesi dell'ergosterolo: la biosintesi dell'ergosterolo è uno degli obiettivi chiave dei farmaci antimicotici clinici. È stato dimostrato che combinazioni sinergiche di mentolo (derivato della specie di menta) o timolo (da *T. vulgaris*) con nistatina e itraconazolo mirano alla biosintesi dell'ergosterolo in *C. krusei* e *C. glabrata*, con conseguente inibizione della crescita cellulare.

9) Competizione per un possibile obiettivo primario: la combinazione di *Mentha x piperita* L. e antimicrobici ha mostrato un potenziale effetto sinergico contro una vasta gamma di agenti patogeni batterici e fungini, tra cui *C. albicans*. Uno dei possibili meccanismi discussi riguarda la competizione per un bersaglio primario come i componenti di membrana con conseguente interruzione della membrana e morte cellulare.

2.6 Il quorum sensing batterico e l'interferenza con estratti vegetali

Il quorum sensing (QS) è un processo di comunicazione cellula-cellula, presente nei batteri Gram-positivi e Gram-negativi, che consente ai microrganismi di modificare collettivamente il comportamento in risposta ai cambiamenti nella densità cellulare e nella composizione della specie della comunità microbica circostante [33].

I processi controllati dal quorum sensing sono: la bioluminescenza, la secrezione di fattori di virulenza, la motilità, la simbiosi e la formazione di biofilm, che diventano improduttivi e costosi

se intrapresi da una singola cellula batterica ma efficaci a livello collettivo [33,34].

Il sistema è composto da due elementi: la molecola segnale (solitamente un omoserina lattone acilato, AHL, per i batteri Gram-negativi e un oligopeptide per i Gram-positivi) e l'attivatore trascrizionale [33].

Le molecole di segnalazione extracellulare, chiamate autoinduttori, vengono rilasciate dalla cellula batterica per entrare nel citoplasma delle cellule adiacenti. Se la concentrazione di autoinduttori all'interno della cellula batterica aumenta raggiungendo una concentrazione soglia (il quorum) queste si legheranno all'attivatore trascrizionale. Il complesso trascrizionale si legherà a sequenze del DNA per attivare determinati geni responsabili dell'accensione o inibizione di specifiche vie cellulari [34].

Per quanto riguarda i Gram negativi, esistono tre caratteristiche comuni che si trovano in quasi tutti i sistemi di rilevamento del quorum sensing:

- gli autoinduttori diffondono liberamente attraverso la membrana batterica
- le molecole segnali sono legate da specifici recettori che risiedono nella membrana interna o nel citoplasma
- il rilevamento del quorum in genere altera da decine a centinaia di geni che sono coinvolti in vari processi biologici.

Nei batteri Gram-negativi gli enzimi deputati alla produzione di AHL hanno come substrato la frazione lattonica dall'adenosilmetionina mentre, nella maggior parte dei casi, la particolare catena acilica è ottenuta da intermedi della biosintesi degli acidi grassi [33].

Molti batteri Gram-negativi producono e rilevano diversi autoinduttori: per esempio *Vibrio harveyi* utilizza tre autoinduttori diversi per la comunicazione intra-specie, intra-generi e inter-specie per regolare circa 600 geni bersaglio. L'autoinduttore finale in *V. harveyi*, e in molte altre specie batteriche, è l'autoinduttore 2 (AI-2), che consiste in un insieme di molecole autoinduttori derivate dal 4,5-diidrossi-2,3-pentandione (DPD) [33]. Inoltre nei batteri del genere *Vibrio*, il quorum sensing dipendente da AHL, è regolato da sintasi LuxI-AHL e dal regolatore di risposta LuxR-AHL, noto per controllare l'espressione della bioluminescenza [34].

Nei ceppi di *E. coli*, omoserinalattone, AI-2 e AI-3 sono gli autoinduttori più significativi coinvolti nei segnali del quorum sensing. A differenza di AI-3, che dialoga con l'ormone dei mammiferi noradrenalina per coordinare l'interazione batterio-ospite, AI-2 è responsabile della comunicazione cellulare inter-specie mentre omoserinalattone regola la comunicazione intra-specie, la formazione di biofilm e la motilità/adesività del batterio [35].

Un altro autoinduttore utilizzato ad esempio in *Pseudomonas aeruginosa* è un chinolone (noto come PQS) che, insieme a due molecole AHL controlla la formazione di biofilm e la produzione di fattori di virulenza in tale batterio [33].

Per quanto riguarda i recettori, i batteri Gram-negativi utilizzano comunemente recettori di tipo LuxR localizzati nel citoplasma per rilevare AHL. Le proteine LuxR contengono due domini

funzionali: un dominio ammino-terminale coinvolto nel legame con il ligando e un dominio carbossi-terminale che si lega al DNA. In assenza dell'autoinduttore affine, la maggior parte dei recettori di tipo LuxR si degrada mentre, a seguito del legame con autoinduttore, le proteine LuxR sono stabilizzate e processano il segnale legando regioni specifiche del DNA. I recettori utilizzano una combinazione di variazione di amminoacidi e di flessibilità nella tasca di legame per ottenere la specificità di legame dell'AHL, dimostrando una stretta specificità per i loro ligandi [33].

La seconda classe di recettori implicati nel legame degli autoinduttori nei batteri Gram-negativi sono le istidina chinasi, legate alla membrana, che segnalano i fattori di trascrizione citoplasmatica attraverso la fosforilazione. Per eseguire accuratamente i processi collegati al quorum sensing, i batteri devono rilevare, interpretare e integrare le informazioni chimiche extracellulari e convertire tali informazioni in cambiamenti nell'espressione genica [33].

Le informazioni possono essere anche alterate da fattori interni (come fluttuazioni nella trascrizione o numero di proteine) o cambiamenti esterni (temperatura, pH, osmolarità e così via).

È noto che i biofilm e la virulenza si basano su molecole di segnalazione del secondo messaggero intracellulare, tra cui guanosina monofosfato dimerico ciclico (c-di-GMP) e adenosina monofosfato ciclico (cAMP). In questo modo, la trasmissione dei segnali del quorum ai secondi messaggeri, basati su nucleotidi, consente la conversione di informazioni complesse codificate da miscele di autoinduttori in un'unica molecola di segnalazione intracellulare [33].

Le condizioni di crescita non uniformi e/o le comunità miste influenzano le funzioni del quorum sensing. Ad esempio, nelle comunità di *Vibrio cholerae*, l'ambiente esterno influenza l'attivazione dei geni di formazione di biofilm controllati dal quorum sensing. È stato anche scoperto che le cellule epiteliali dei mammiferi rilasciano un imitatore di AI-2 in risposta ai batteri o all'interruzione delle giunzioni strette. Il mimic AI-2 viene rilevato dal recettore batterico di AI-2, LuxP o LsrB, e attiva l'espressione genica guidata dal quorum sensing. Allo stesso modo, diverse piante e alghe producono imitazioni di autoinduttori che influenzano i comportamenti controllati dal quorum sensing [33].

Poiché la produzione di fattori di virulenza dipende da QS, nella maggior parte dei microrganismi è fondamentale agire sul quorum sensing al fine di limitarne la patogenicità. Di conseguenza, è opportuno sviluppare degli inibitori in grado di interferire con il sistema di comunicazione batterica. Una fonte inesauribile di tali sostanze potrebbe essere rappresentata dai prodotti naturali.

Ad oggi, un gran numero di estratti di piante sono stati testati per la loro capacità di antagonizzare il QS batterico: per esempio gli estratti derivati dall'alga marina *Delisea pulchra* (Greville) Montagne interferiscono con l'attivazione dell'espressione genica mediata da QS in *E. coli*. Inoltre, gli estratti di sei diverse piante del sud della Florida hanno diminuito la produzione di fattori di virulenza controllati da QS in *P. aeruginosa* [35].

E' stato anche dimostrato [35] che gli oli essenziali di *Thymus daenensis* Celak e *Satureja hortensis* L. presentano proprietà anti QS in *E. coli*. Questo risultato è stato confermato dalla significativa riduzione dell'espressione dei geni luxS e pfs. Costituenti di importanti oli essenziali come carvacrolo, timolo, linalolo, limonene, 1,8-cineolo ed eugenolo hanno mostrato effetti anti-QS.

Il sistema QS influenza sia l'iniziazione che la maturazione del biofilm batterico. Pertanto, agenti inibitori di QS di solito esercitano attività anti-biofilm. Il trattamento con 5% di estratto di broccolo riduce la produzione di AI-2, che gioca un ruolo importante nella virulenza di *E. coli*, con relazione dose dipendente, pur non mostrando effetti negativi sulla crescita batterica [36]. Questo suggerisce che l'estratto interferisce in modo specifico con la regolazione della sintesi di AI-2 ma non con la crescita batterica.

Si è osservata una diminuzione dei livelli di geni luxS, pfs e flhD, coinvolti nella sintesi di AI-2, in risposta al trattamento con 0,5% di estratto di broccolo modulando la trascrizione di questi geni e regolando la virulenza di *E. coli*.

Alcuni composti vegetali hanno inibito il sistema QS diminuendo la mobilità dei batteri. Lo si è chiaramente osservato, per esempio, in presenza di concentrazioni crescenti dell'estratto, ad ulteriore verifica che il broccolo agisce specificamente sulla virulenza batterica mediata da AI-2. Inoltre i livelli di trascrizione dei geni testati sono stati ridotti in risposta al trattamento con flavonoidi dell'estratto di broccolo come kaempferol o quercetina, la quale è risultata più efficace oltre ad aver influenzato l'espressione di luxS e pfs. La trascrizione di questi due geni non è stata però significativamente influenzata dalla miricetina [36].

Un altro studio [36] ha analizzato gli estratti di aglio e acido p-cumarico in quanto presentano un'attività antagonista QS sui ceppi batteri che possiedono un sistema di comunicazione di tipo LuxRI. Infatti, a seconda del ceppo microbico e della concentrazione dell'acido p-cumarico, esso può esercitare un'azione stimolante o inibitoria degli effetti nella regolamentazione del QS. L'aglio ha indotto un effetto antagonista su QS, dipendente dalla concentrazione, contro ceppi di *E. coli* e *Agrobacterium* spp. mentre l'acido p-cumarico ha inibito il QS sia di *Pseudomonas aeruginosa* che di *P. chlororaphis* senza influire il tasso di crescita.

Diversamente dall'acido p-cumarico, la cinnamaldeide induce una debole modulazione del quorum sensing, portando a ipotizzare che la classe dei derivati del cinnamato comprende più antagonisti del QS che sono più potenti a concentrazioni minori. Inoltre l'antagonismo di AI-2 è stato mostrato per canavanina, presente nella pianta di *Medicago sativa* L., che ha influenzato l'espressione di QS di *Sinorhizobium meliloti* e anche dalla curcumina, proveniente da *Curcuma longa* L., che ha ridotto efficacemente la patogenicità e il sistema QS in *P. aeruginosa* [34].

L'uso, quindi, di composti naturali a basso peso molecolare per attenuare la patogenicità batterica è un approccio nuovo e attraente soprattutto se, ai dosaggi utilizzati, questi inibitori del QS non sono tossici e non producono conseguenze negative sulla flora batterica dell'ospite [34].

3 SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'attività sinergica di estratti vegetali e antibiotici/antimicotici contro ceppi di MRSA, *E. coli* e *C. albicans* in modo da trovare quel/i composto/i che possa/possano potenziare l'attività del farmaco antimicrobico, contribuendo a determinare strategie e metodi terapeutici per risolvere i problemi relativi all'antibiotico resistenza, problemi sempre più frequenti e diffusi in ambito clinico.

Infatti, a causa dell'antibiotico resistenza, per ottenere risultati efficaci contro i microorganismi, la concentrazione necessaria ad inibire i ceppi batterici e fungini deve essere aumentata con conseguenti aspetti negativi correlati quali effetti indesiderati per il paziente e l'aumentato costo della terapia.

Sfruttando invece l'effetto sinergico di due o più agenti si riduce il dosaggio di un singolo farmaco, aumentando la sua efficacia e diminuendone la concentrazione poiché l'effetto combinato di due o più componenti in una miscela è molto più efficace dell'effetto sommatorio dei singoli componenti. Inoltre, la riduzione della concentrazione del farmaco antimicrobico riduce la possibilità nei microrganismi di escogitare vie di sopravvivenza che sono alla base del fenomeno della resistenza.

4 MATERIALI E METODI

4.1 Determinazione della minima concentrazione inibente (MIC)

La resistenza microbiologica è la mancanza di suscettibilità del microrganismo a un antimicrobico. Tale valutazione viene effettuata mediante test *in vitro* e il microrganismo è definito resistente quando la Concentrazione Minima Inibente (MIC) del farmaco supera i limiti di suscettibilità per quell'organismo.

Ogni specie batterica ha un valore di MIC caratteristico. Per questo nel presente studio, mediante il metodo per diluizione, è stata valutata la MIC di ciascun antibiotico utilizzato nei test di sinergia contro ceppi batterici e funghi per determinare la concentrazione in grado di agire in sinergia con gli estratti vegetali e inibire la crescita microbica.

Ceppi batterici e funghi di *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* sono cresciuti per 16 ore a 37°C per i batteri e a 30°C per il fungo. Le colture microbiche sono quindi state determinate mediante misurazione della densità ottica e diluite fino ad ottenere sospensioni pari a 1×10^3 CFU/mL. È stata utilizzata una piastra sterile da 96 pozzetti dove sono stati inoculati 80 µl di terreno di Luria Bertani (LB) in tutti i pozzetti per la coltivazione e il mantenimento dei microrganismi.

Nel caso di MRSA sono stati utilizzati i seguenti antibiotici: aztreonam, tetraciclina, daptomicina, gentamicina e carbenicillina. Per *E. coli* sono stati usati: carbenicillina, aztreonam, tetraciclina, gentamicina, kanamicina e acido nalidixico. Gli antimicotici utilizzati per i ceppi di *C. albicans* sono amfotericina B, fluconazolo e nistatina.

Gli antibiotici e gli antimicotici sono stati inoculati nella piastra da microtitolazione con una diluizione seriale di 1:10. Successivamente la piastra è stata aggiunta di 10 µl della coltura microbica preparata come descritto. Nella piastra sono presenti dei pozzetti che contengono solo terreno LB oppure batteri/funghi come controllo.

Le piastre sono quindi state incubate a 37°C o a 30°C sotto costante agitazione per 16 ore per favorire la crescita microbica valutata poi mediante lettura della torbidità a 620 nm. L'esperimento viene eseguito in triplicato per ciascun ceppo batterico.

In particolare, gli antimicrobici testati in questo studio sono stati:

- Per MRSA: gentamicina, daptomicina, aztreonam, tetraciclina
- Per *E. Coli*: carbenicillina, tetraciclina, aztreonam, gentamicina
- Per *C. albicans*: amfotericina B, fluconazolo.

4.2 Valutazione della concentrazione microbica degli estratti vegetali

In questo lavoro di tesi sono stati testati 8 estratti vegetali:

- 1 Estratto titolato al 1% di verbascoside
- 2 Estratto titolato al 50% di teupolioside
- 3 Estratto titolato al 66% di verbascoside
- 4 Estratto titolato al 7% di glabridina
- 5 Estratto titolato al 19% di acido rosmarinico
- 6 Estratto titolato al 60% di acido clorogenico + 5% cianidina 3 o glucoside
- 7 Estratto titolato al 61% di verbascoside
- 8 Estratto titolato al 70% di plantamajoside

La stock solution degli estratti è stata allestita in volumi di dimetilsolfossido (DMSO) tali da garantire una omogeneità di concentrazione e quindi diluita in soluzione acquosa.

Le sospensioni batteriche e fungine preparate come sopra descritto sono state seminate in piastre da 96 pozzetti ed aggiunte di concentrazioni decrescenti degli estratti vegetali al fine di determinare il loro valore di MIC. Dopo 16 ore di incubazione la torbidità delle colture è stata registrata mediante spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 620 nm.

4.3 Determinazione dell'attività sinergica mediante tecnica a scacchiera

In questo lavoro di tesi, l'eventuale sinergia tra estratti vegetali e farmaci antimicrobici è stata valutata mediante titolazione con metodo a scacchiera (checkerboard assay) utilizzando concentrazioni subMIC, ossia corrispondenti al 50% della MIC calcolata per ogni antimicrobico.

Il saggio è stato eseguito in piastre da microtitolazione a 96 pozzetti (fig. 8):

- Il terreno LB (70 µl) è stato inoculato in tutti pozzetti della piastra.
- Nelle prime quattro colonne verticali è stato inoculato l'estratto vegetale, ad attività antimicrobica (10 µl).
- Nella terza e quarta colonna sono stati aggiunti anche 10 µl antibiotico relativo al ceppo microbico esaminato per testare la combinazione dei due agenti alla concentrazione subMIC.
- La quinta e la sesta colonna invece presentano solamente l'antibiotico come controllo.
- I 10 µl di ceppi batterici o fungini sono stati inoculati in tutte e sei le colonne, oltre ad aver riservato due colonne ulteriori per confrontare il comportamento in presenza e in assenza di un agente antibatterico.

- La nona e ultima colonna è destinata solamente al LB in modo da verificare la sterilità del terreno.
- Il procedimento è stato eseguito in duplicato e le piastre sono state conservate in camera calda per 16 ore.
- Una volta passato il tempo richiesto, le piastre sono state analizzate tramite uno spettrofotometro a 620 nm.



Figura 8: La piastra da microtitolazione per la tecnica a scacchiera

4.4 Determinazione dell'indice di concentrazione inibitoria frazionaria (FICI)

Il metodo di titolazione a scacchiera è stato utilizzato per valutare il potenziale sinergico di estratti vegetali in combinazione con antibatterici e antimicotici.

I risultati del test a scacchiera vengono interpretati calcolando l'indice di concentrazione inibitoria frazionaria (FICI) per i due antimicrobici. Gli indici di concentrazione inibitoria frazionaria (FICI) delle combinazioni dei due agenti antimicrobici, calcolati dal saggio a scacchiera, sono stati utilizzati come indicatore di sinergia e per quantificare la natura dell'interazione farmacologica in vitro (sinergia, additività, indifferente o antagonismo).

La FICI, derivata dalla più bassa concentrazione di antibiotici ed estratti vegetali in combinazione, è stata calcolata utilizzando la seguente formula:

$$FICI = \Sigma FIC = FIC (\text{antibiotico}) + FIC (\text{estratto vegetale})$$

Indice FIC = (MIC dell'estratto vegetale in combinazione/MIC della pianta estratto da solo) + (MIC dell'antibiotico in combinazione/MIC del solo antibiotico).

Quando più di una combinazione ha prodotto una variazione del valore MIC dell'estratto o dell'antibiotico, l'indice FIC è stato espresso come media dei valori FIC ottenuti.

L'interpretazione della FICI e delle varie azioni degli agenti antimicrobici è stata la seguente:

- $FICI \leq 0,5$ sinergia (l'effetto congiunto è più forte della somma degli effetti dei singoli agenti)
- $FICI 0,5 < FIC \leq 1$ additività (l'effetto congiunto è uguale della somma degli effetti dei singoli agenti)
- $FICI 1 < FICI \leq 2$ indifferenza (effetto congiunto è pari all' effetto di uno dei singoli agenti)
- $FICI > 2$ antagonismo (effetto combinato è più debole rispetto alla somma degli effetti dei singoli agenti o più debole dell'effetto di entrambi i singoli agenti)

La media delle FICI di tutte le combinazioni è stata utilizzata per classificare i risultati come sinergia, additività, indifferenza o antagonismo.

4.5 Saggio di bioluminescenza in *Vibrio harveyi* BB120

V. harveyi è un batterio Gram negativo, con proprietà bioluminescenti e rappresenta l'organismo chiave nella ricerca per l'esame della bioluminescenza microbica e del quorum sensing.

In questo studio è stato utilizzato l'estratto titolato al 60% di acido clorogenico + 5% cianidina 3-o-glucoside e l'estratto titolato al 70% di plantamajoside insieme ai ceppi di *E. coli*, in quanto sono risultate le uniche combinazioni capaci di indurre effetto sinergico con gli antibiotici.

L'obbiettivo di questo esperimento è verificare se, in presenza di *E. coli* e di questi due liofili contenuti nel surnatante, vi sia una diminuzione della bioluminescenza di *V. harveyi* causato dall'inibizione del quorum sensing.

Per prima cosa, per la determinazione della cultura, *E. coli*, è stato misurato l'OD mediante uno spettrofotometro e poi diluita fino ad ottenere una sospensione pari a 1×10^3 CFU/ml. Successivamente sono state allestite provette con il seguente contenuto:

1. 4 ml della coltura di *E. coli*.
2. 4 ml di *E. coli* + 400 μ l di estratto titolato al 60% di acido clorogenico + 5% cianidina 3-o-glucoside (10% vol/vol).
3. 4 ml di *E. coli* + 400 μ l di estratto titolato al 70% di plantamajoside (10% vol/vol).

Le colture sono state incubate a 37°C per 16 ore.

Al termine dell'incubazione, i campioni sono stati centrifugati a 6000 RPM per 6 minuti per separare il surnatante. In piastre da microtitolazione, 10 μ L di terreno di coltura filtrato sono stati aggiunti a 90 μ l della coltura fresca di *V. harveyi* cresciuto in terreno Marine Broth e diluito 1:5000.

Per ogni esperimento sono state allestite due piastre da microtitolazione: una per l'analisi della bioluminescenza e l'altra per quantificare la crescita batterica mediante lettura spettrofotometrica al fine di verificare che il surnatante non interferisca con la crescita di *V. harvey* e quindi con il segnale bioluminescente.

I risultati ottenuti dalla lettura di bioluminescenza sono stati normalizzati con i dati ottenuti alla lettura spettrofotometrica. Successivamente, i dati sono stati espressi come percentuale attribuendo il 100% di bioluminescenza ai campioni di *V. harvey* incubati con il terreno proveniente dalle colture di *E. coli* incubato senza gli estratti vegetali.

5 RISULTATI

5.1 Valori di MIC per gli antimicrobici e gli estratti vegetali

La determinazione mediante microdiluizione in piastre da 96 pozzetti della concentrazione minima inibitoria (MIC) degli antimicrobici testati ha portato ad individuare i valori riportati in Tabella 1 da cui sono stati calcolati i valori di subMIC poi usati nei saggi di sinergia (Tabella 2)

Tabella 1: La MIC degli antimicrobici

MIC (Minima Concentrazione Inibitoria)							
CEPPO	ANTIBIOTICI					ANTIMICOTICI	
	Tetraciclina	Gentamicina	Daptomicina	Aztreonam	Carbenicillina	Amfotericina-B	Fluconazolo
MRSA	1 mg/l	2 mg/l	1 mg/l	1 mg/l			
<i>E. coli</i>	0,5 mg/l	2 mg/l		1 mg/l	8 mg/l		
<i>C. albicans</i>						1 mg/l	2 mg/l

Tabella 2: La subMIC degli antimicrobici

subMIC							
CEPPO	ANTIBIOTICI					ANTIMICOTICI	
	Tetraciclina	Gentamicina	Daptomicina	Aztreonam	Carbenicillina	Amfotericina-B	Fluconazolo
MRSA	0,5 mg/l	1 mg/l	0,5 mg/l	0,5 mg/l			
<i>E. coli</i>	0,25 mg/l	1 mg/l		0,5 mg/l	4 mg/l		
<i>C. albicans</i>						0,5 mg/l	1 mg/l

Gli estratti vegetali da soli non hanno dimostrato nessun effetto antibatterico o antifungino e sono quindi stati usati nei saggi di sinergia alla concentrazione più elevata possibile corrispondente a 1 parte su 10.

5.2 Determinazione dell'attività sinergica tra estratti vegetali e antibiotici in ceppi di MRSA

I dati ottenuti mediante saggi con metodo a scacchiera sono stati elaborati come descritto per calcolare l'indice FICI. I dati relativi alla lettura allo spettrofotometro (riportati in O.D.) sono riportati nei grafici in Figura 9(a-d); i dati relativi agli indici FICI calcolati sono riportati in Tabella 3.

Da tali dati emerge che il ceppo MRSA è resistente nei confronti della maggior parte delle combinazioni liofilo-antibiotico testate.

Nei grafici in figura 9-11 sono riportate le letture allo spettrofotometro di MRSA in presenza e in assenza dell'antibiotico, in presenza di ciascun estratto vegetale e nelle combinazioni tra liofilo e antibiotico per valutare le varie interazioni. Per definire un'interazione sinergica tra estratto vegetale e antibiotico, attraverso i dati presenti nel grafico, è necessario che la colonna relativa alla combinazione liofilo-antibiotico sia minore di quella dell'antibiotico utilizzato come riferimento.

Il grafico in Figura 9a mostra le interazioni tra estratti vegetali e gentamicina (subMIC 1 mg/l) in cui si evince che nessuna combinazione presenta degli effetti sinergici. Infatti nella tab.1 sono presenti dei valori FICI che vanno da 0,67 a 1,60 delineando così delle interazioni di tipo additivo o indifferente.

La daptomicina (grafico in fig. 9b), con una subMIC di 0,5 mg/l, ha mostrato invece degli effetti sinergici in combinazione con L6 e L8, ossia rispettivamente estratto al 60% di acido clorogenico + 5% cianidina 3 o glucoside ed estratto al 70% di plantamajoside. Analizzando gli indici FICI (0,52 per L6 e 0,54 per L8) viene dimostrata ulteriormente la sinergia per questi due estratti vegetali. Nelle altre combinazioni invece, i valori FICI variano da 0,60 a 1,70.

Anche l'aztreonam (fig.9c), testato a una concentrazione subMIC di 0,5 mg/l, ha mostrato degli effetti debolmente sinergici solo in combinazione con l'estratto al 60% di acido clorogenico + 5% cianidina 3 o glucoside in quanto presenta un valore FICI di 0,56. Le altre combinazioni presentano delle FICI con un minimo di 0,90 e un massimo di 2 evidenziando attività indifferente/antagonista.

Nel caso di tetraciclina (fig. 9d), testato a una concentrazione subMIC di 0,5 mg/l, l'antibiotico non ha mostrato effetti sinergici in nessuna combinazione ma piuttosto additivi. In effetti i valori FICI variano da 0,70 a 0,82.

Complessivamente, se pur in misura meno evidente, solo gli estratti L6 e L8 hanno esibito un'azione sinergica con gli antibiotici testati, in particolare la daptomicina e l'aztreonam, come evidenziato in tabella 3.

Tabella 3: I valori FICI di combinazioni antibiotici-estratti vegetali nei ceppi di MRSA – Evidenziato in giallo le interazioni sinergiche.

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8
gentamicina (subMIC 1 mg/l)	1,60	0,90	0,95	1,40	0,80	0,87	0,72	0,67
daptomicina (subMIC 0,5 mg/l)	1,70	1,10	1,00	1,30	0,75	0,52	0,60	0,54
aztreonam (0,5 mg/l)	1,90	1,40	1,90	2,00	1,35	0,56	1,70	0,90
tetraciclina (0,5 mg/l)	0,70	0,82	0,76	0,71	0,70	0,78	0,76	0,75

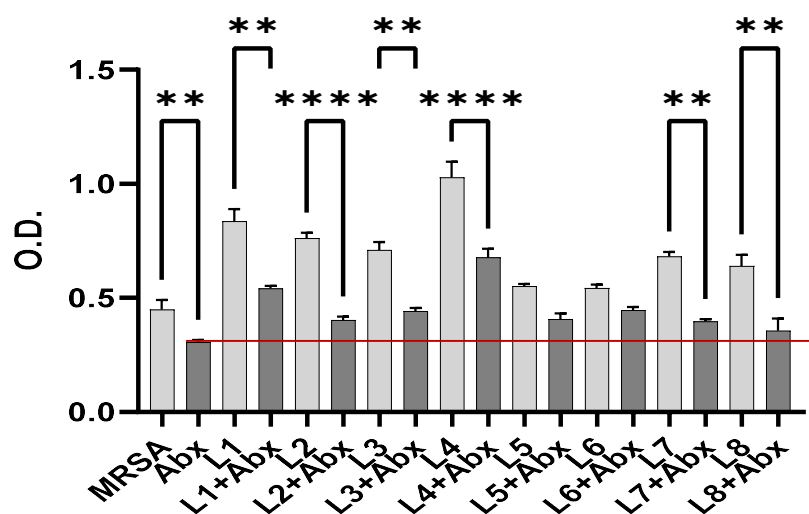


Figura 9a: Interazione tra estratti vegetali e gentamicina contro ceppi di MRSA.

Barre grigio chiaro: estratto vegetale..
 Barre grigio scuro: estratto vegetale con antibiotico.
 Linea rossa: livello di efficacia antibiotico.

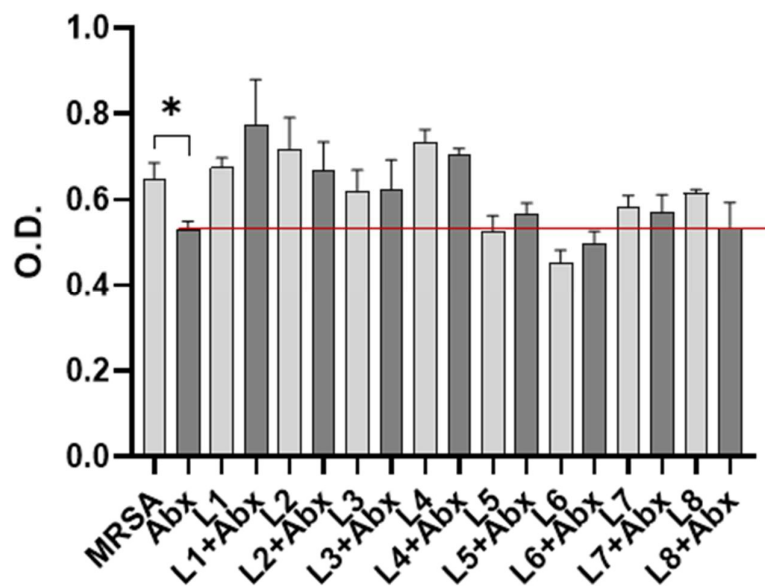


Figura 9b: Interazione tra estratti vegetali e daptomicina contro ceppi di MRSA.
 Barre grigio chiaro: estratto vegetale. .
 Barre grigio scuro: estratto vegetale con antibiotico.
 Linea rossa: livello di efficacia antibiotico.

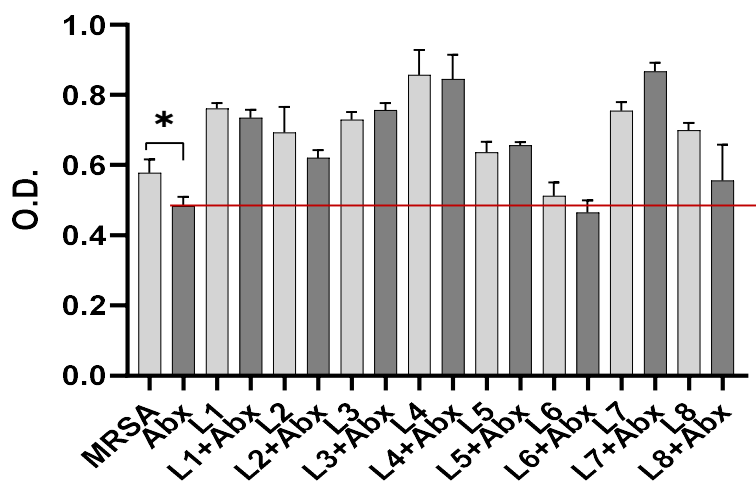


Figura 9c: Interazione tra estratti vegetali e aztreonam contro ceppi di MRSA.
 Barre grigio chiaro: estratto vegetale.
 Barre grigio scuro: estratto vegetale con antibiotico.
 Linea rossa: livello di efficacia antibiotico.

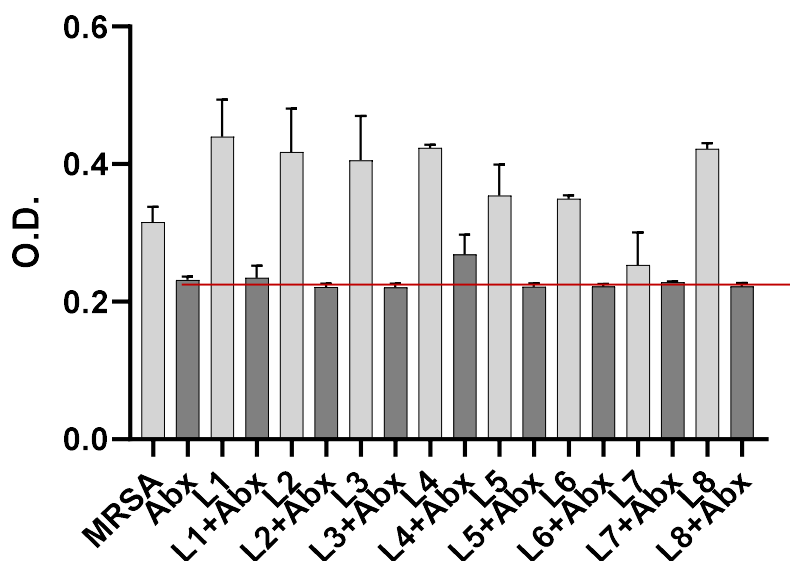


Figura 9d: Interazione tra estratti vegetali e tetraciclina contro ceppi di MRSA.

Barre grigio chiaro: estratto vegetale.
 Barre grigio scuro: estratto vegetale con antibiotico.
 Linea rossa: livello di efficacia antibiotico.

5.2 Determinazione dell'attività sinergica tra estratti vegetali e antibiotici in ceppi di *E. coli*

Analizzando i risultati ottenuti anche in questo caso, è emerso che i ceppi di *E. coli* sono risultati resistenti contro la maggior parte delle combinazioni testate.

La carbenicillina (mostrata in grafico in fig. 10a), testata ad una subMIC di 4 mg/l, ha mostrato degli effetti sinergici in combinazione con L6 e L8, ossia rispettivamente estratto al 60% di acido clorogenico + 5% cianidina 3 o glucoside ed estratto al 70% di plantamajoside. I valori FICI per questi due liofilati (0,43 per L6 e 0,4 per L8) mostrano l'esistenza di una effettiva interazione sinergica. Invece, per quanto riguarda le altre combinazioni, i valori FICI variano da 0,80 fino ad un massimo di 1,20 escludendo una possibile energia.

Nel caso di tetraciclina (fig. 10b), l'antibiotico è stato testato alla concentrazione subMIC di 0,25 mg/l e ha presentato un'attività sinergica quando è stato aggiunto agli estratti L6 e L8. Questa combinazione è risultata la migliore tra quelle testate in quanto ha avuto valori FICI al di sotto

dello 0,5 (0,40 nel caso di L6 e 0,45 per L8). Nelle altre combinazioni non si è verificata una sinergia in quanto i valori FICI variano da 0,76 a 1,30.

L'aztreonam (fig.10c), testato a una subMIC di 0,5 mg/l, non ha mostrato invece alcun effetto sinergico con gli estratti vegetali utilizzati per questo ceppo. Infatti in tab.2 il valore più basso tra gli indici trovati è pari a 1.

Al contrario, la gentamicina (fig.10d), con una subMIC di 1 mg/l, ha esibito degli effetti sinergici sempre con i liofilati 6 e 8 in quanto presenta dei valori FICI rispettivamente di 0,30 e 0,40. Anche in questo caso le altre combinazioni non hanno mostrato sinergia.

In generale si può dedurre che, come nei ceppi di MRSA, anche nei batteri Gram negativi vi sia una sinergia tra alcuni estratti vegetali e antibiotici. In particolare l'estratto al 60% di acido clorogenico con 5% cianidina 3 o glucoside e l'estratto al 70% di plantamajoside sono risultati molto più efficaci in questo ceppo che nell'altro. In tab.4 sono stati evidenziati i valori corrispondenti ad un effetto sinergico.

Tabella 4: I valori FICI di combinazioni antibiotici-estratti vegetali nei ceppi di E. coli – Evidenziato in giallo le interazioni sinergiche.

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8
carbenicillina (subMIC 4 mg/l)	0,80	1,20	0,90	1,10	1,00	0,43	0,96	0,40
tetraciclina (0,25 mg/l)	0,76	1,10	1,30	1,20	1,10	0,40	1,00	0,45
aztreonam (0,5 mg/l)	1,10	1,00	1,23	1,00	1,15	1,00	1,30	1,20
gentamicina (1 mg/l)	1,00	1,20	1,30	1,30	1,10	0,30	1,00	0,40

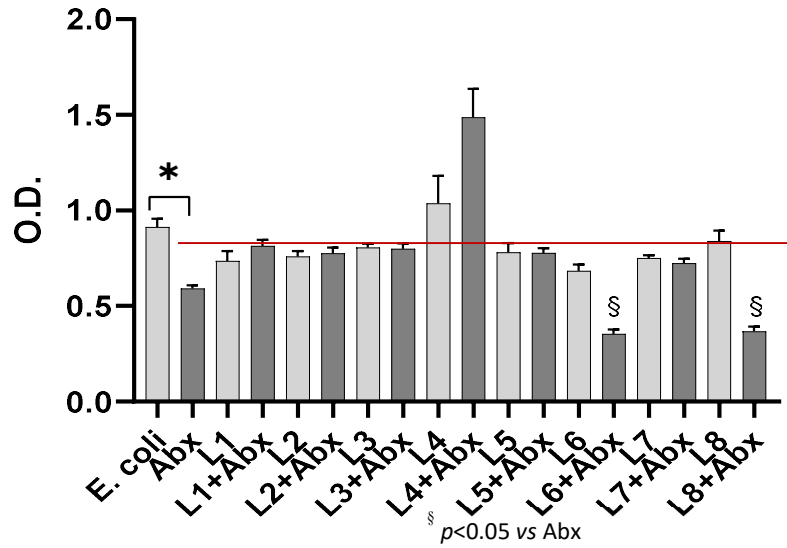


Figura 10a: Interazione tra estratti vegetali e carbenicillina contro ceppi di *E. coli*.

Barre grigio chiaro: estratto vegetale..
 Barre grigio scuro: estratto vegetale con antibiotico.
 Linea rossa: livello di efficacia antibiotico.

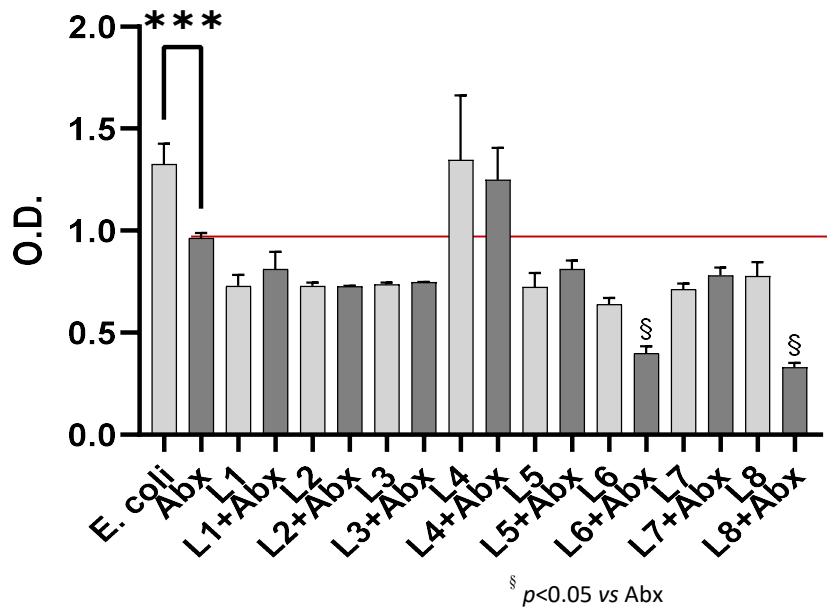


Figura 10b: Interazione tra estratti vegetali e tetraciclina contro ceppi di *E. coli*.

Barre grigio chiaro: estratto vegetale.
 Barre grigio scuro: estratto vegetale con antibiotico.
 Linea rossa: livello di efficacia antibiotico.

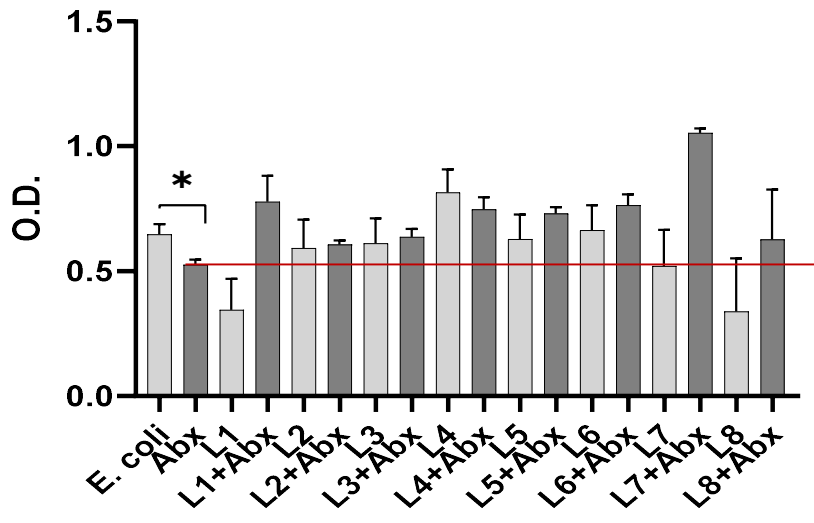


Figura 10c: Interazione tra estratti vegetali e aztreonam contro ceppi di E. coli.

Barre grigio chiaro: estratto vegetale.
 Barre grigio scuro: estratto vegetale con antibiotico.
 Linea rossa: livello di efficacia antibiotico.

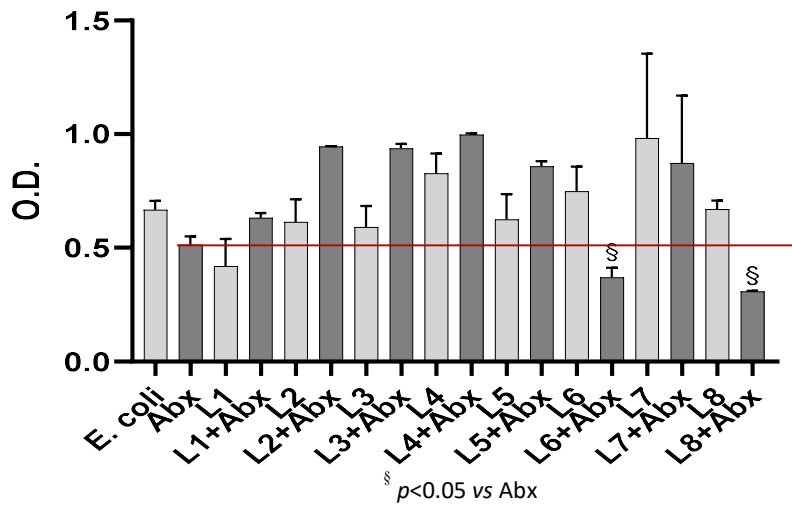


Figura 10d: Interazione tra estratti vegetali e gentamicina contro ceppi di E. coli.

Barre grigio chiaro: estratto vegetale.
 Barre grigio scuro: estratto vegetale con antibiotico.
 Linea rossa: livello di efficacia antibiotico.

5.3 Determinazione dell'attività sinergica tra estratti vegetali e antibiotici in *C. albicans*

In *C. albicans* non si è verificato alcun effetto sinergico tra estratti vegetali e antibiotici testati. Infatti per amfotericina B (fig.11a), testata alla subMIC di 0,5 mg/l, i valori FICI variano da 1 a 1,50 evidenziando perciò degli effetti additivi o indifferenti. Risultati analoghi si sono ottenuti anche per fluconazolo (fig.11b) che presenta dei valori FICI tra 0,90 e 1,50. Da questi dati si può dedurre che gli estratti vegetali non sono in grado di inibire la crescita fungina e neppure di agire in sinergia con gli antimicotici. Nessun valore sinergico è evidenziato in tab.5.

Tabella 5: I valori FICI di combinazioni antibiotici-estratti vegetali nei ceppi di *C. albicans* – Evidenziato in giallo le interazioni sinergiche

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8
amfotericina B (subMIC 0,5 mg/l)	1,10	1,00	1,20	1,50	1,20	1,00	1,20	1,50
fluconazolo (1 mg/l)	0,90	1,20	1,40	1,10	1,30	1,50	1,00	1,00

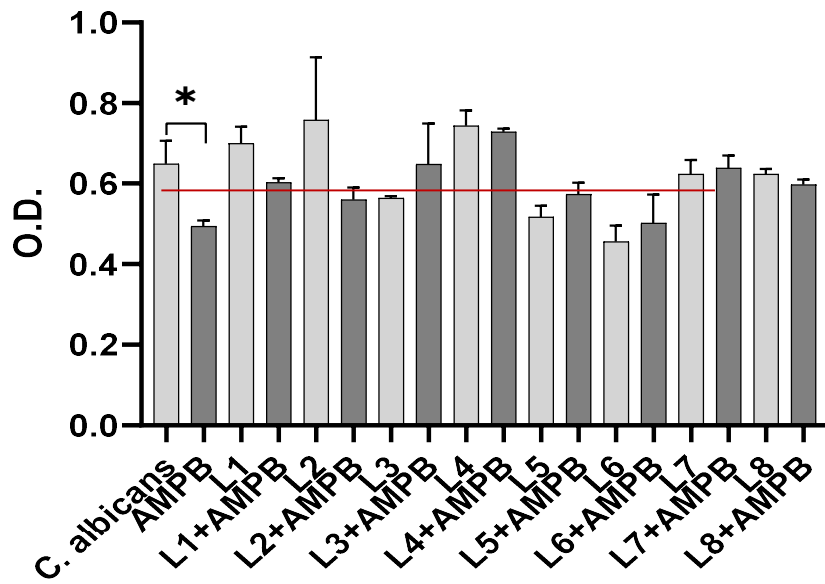


Figura 11a: Interazione tra estratti vegetali e amfotericina B contro ceppi di *C. albicans*.

Barre grigio chiaro: estratto vegetale.
 Barre grigio scuro: estratto vegetale con antibiotico.
 Linea rossa: livello di efficacia antibiotico.

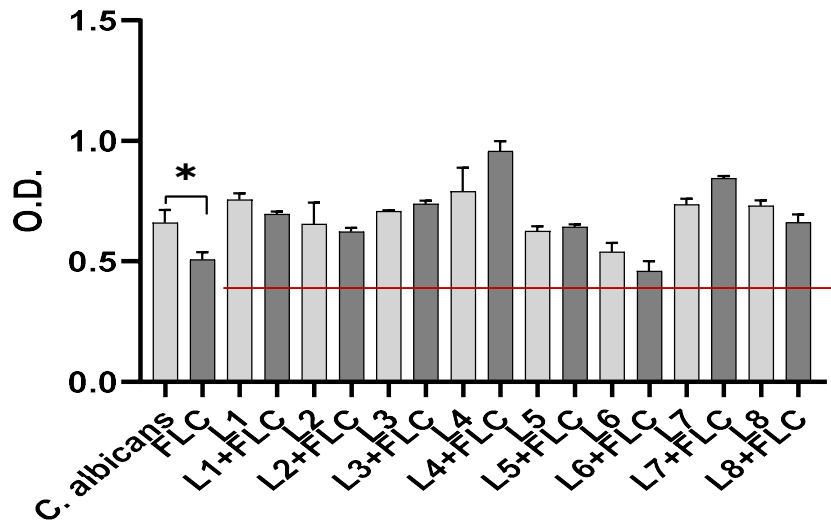


Figura 11b: Interazione tra estratti vegetali e fluconazolo contro ceppi di *C. albicans*.

Barre grigio chiaro: estratto vegetale.
 Barre grigio scuro: estratto vegetale con antibiotico.
 Linea rossa: livello di efficacia antibiotico.

5.4 Analisi della bioluminescenza

I risultati ottenuti dalla lettura di bioluminescenza sono stati normalizzati con i dati ottenuti alla lettura spettrofotometrica indicativa della crescita batterica. Successivamente i dati presentati nel grafico in fig. 12, sono stati espressi come percentuale attribuendo il 100% di bioluminescenza ai campioni di *V. harvey* incubati con il terreno proveniente dalle colture di *E. coli* non incubate con gli estratti vegetali.

Dai dati emerge che il ceppo di *E. coli* incubato con i liofilati 6 e 8, cioè rispettivamente l'estratto al 60% di acido clorogenico + 5% cianidina 3-o-glucoside ed estratto al 70% di plantamajoside, ha provocato una diminuzione circa del 50% di bioluminescenza del batterio *V. harvey*, rispetto al campione contenente solo con il terreno di coltura di *E. coli*. Di conseguenza è possibile dedurre che i due estratti vegetali dimostrano la capacità di inibire il sistema del Quorum sensing di *E. coli* e quindi di disarmarne il potenziale patogeno.

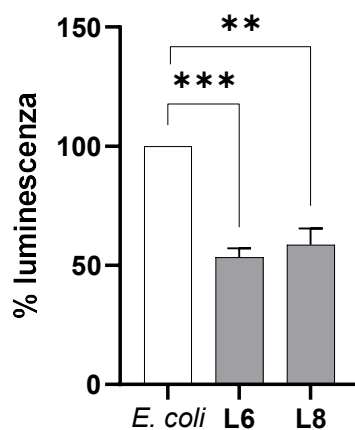


Figura 12: percentuale luminescenza data dal terreno di coltura di *E. coli* da solo e in presenza del liofilo 6 e 8.

6 CONCLUSIONI

Dai risultati ottenuti emerge che nei ceppi di *C. albicans*, non si è verificato alcun effetto sinergico tra i liofilati e gli antimicotici. Anche i ceppi di MRSA sono risultati resistenti nei confronti della maggior parte (29 su 32) delle combinazioni liofilo-antibiotico testate. Il confronto con gli altri estratti testati è inficiato dalla bassa concentrazione dei principi attivi presenti in questi ultimi, cosa che potrebbe giustificare i risultati non soddisfacenti nei confronti di due ceppi di microrganismi che presentano strutture esterne (parete cellulare) complesse. Difatti, solo due degli otto estratti vegetali testati, ossia l'estratto al 60% di acido clorogenico + 5% cianidina 3-o-glucoside ed estratto al 70% di plantamajoside, hanno esibito una debole interazione sinergica in MRSA con alcuni antibiotici testati, daptomicina e aztreonam, rivelandosi perciò come risultati insoddisfacenti.

I batteri Gram negativi invece hanno una porzione esterna della parete detta membrana esterna costituita da lipidi. In *E. coli*, gli stessi estratti vegetali hanno mostrato un effetto sinergico con gli antibiotici carbenicillina, tetraciclina e gentamicina.

Questo studio ha quindi permesso di identificare un'azione sinergica tra due estratti vegetali e antibiotici in grado di inibire la sintesi della parete cellulare batterica e la sintesi proteica nei confronti del batterio Gram negativo.

Per quanto riguarda il batterio Gram negativo, i risultati del test di sinergismo sono stati ulteriormente confermati dalla lettura della bioluminescenza. Infatti i due liofilati incubati con *E. coli* hanno significativamente diminuito la bioluminescenza del batterio *V. harvey*, dimostrando la loro capacità di interferire con il sistema del Quorum sensing di *E. coli* e quindi di contrastarne il potenziale patogeno.

In conclusione l'estratto al 60% di acido clorogenico + 5% cianidina 3-o-glucoside e l'estratto al 70% di plantamajoside hanno confermato, nei limiti di questo studio, la loro possibilità di agire in sinergia con alcuni antibiotici in modo da potenziarne l'effetto contro gli agenti patogeni Gram negativi e contribuire a limitare i problemi legati all'antibiotico resistenza.

7 BIBLIOGRAFIA

- [1] Hemaiswarya S., Kruthiventi A.K., Doble M. (2008) Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*. 15: 639–652.
- [2] Stefanović O.D., Stanojević D.D., Comić L.R. (2012) Synergistic antibacterial activity of *Salvia officinalis* and *Cichorium intybus* extracts and antibiotics. *Acta Poloniae Pharmaceutica*. 69(3):457-63.
- [3] Endo E. H., Costa G.M., Makimori R.Y., Ueda-Nakamura T., Nakamura C.V. , Dias Filho B.P. (2018) Anti-biofilm activity of *Rosmarinus officinalis*, *Punica granatum* and *Tetradenia riparia* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and synergic interaction with penicillin. *Journal of Herbal Medicine*.14:48-54.
- [4] Rolta R., Sharma A., Sourirajan A., Mallikarjunan K.P., Dev K. (2021) Combination between antibacterial and antifungal antibiotics with phytochemicals of *Artemisia annua* L: A strategy to control drug resistance pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*. 266:1-10.
- [5] Ahmad I. and Beg A.Z. (2001) Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*. 74(2):113-23.
- [6] Nakagawa S., Greg G. Hillebrand G.G., Nunez G. (2020) *Rosmarinus officinalis* L. (Rosemary) Extracts Containing Carnosic Acid and Carnosol are Potent Quorum Sensing Inhibitors of *Staphylococcus aureus* Virulence. *Antibiotics* (Basel, Switzerland). 9(4):1-11.
- [7] Reuk-ngam N., Chimnoi N., Khunnawutmanotham N., and Techasakul S. (2014) Antimicrobial Activity of Coronarin D and Its Synergistic Potential with Antibiotics. *BioMed Research International*. 2014: 1-8.
- [8] Bag A. and Chattopadhyay R.R. (2015) Evaluation of Synergistic Antibacterial and Antioxidant Efficacy of Essential Oils of Spices and Herbs in Combination. *PLoS One*. 10(7):1-17.
- [9] Wu S.C., Liu F., Zhu K., Shen J.Z. (2019) Natural Products That Target Virulence Factors in Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of agricultural and food chemistry*. 67(48):13195-13211.
- [10] Abidi S.H., Ahmed K., Sherwani S.K., Kazmi S.U. (2015) Synergy between antibiotics and natural agents results in increased antimicrobial activity against *Staphylococcus epidermidis*. *The journal of infection in developing countries*. 9(9):925-9.
- [11] Kaper J.B. (2005) Pathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*. 295(6-7):355-6.
- [12] Fuentesfria A.M., Pippi B., Dalla Lana D.F, Donato K.K., De Andrade S.F. (2018) Antifungals

- discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. *Letters in Applied Microbiology*. 66(1):2-13.
- [13] Revie N.M., Kali R., Iyer K.R., Robbins N., Cowen L.E. (2018) Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. *Curr. Opin. Microbiol.* 45:70-76.
- [14] Silva F., Susana Ferreira S., Duarte A., Mendonça D.I., Domingues F.C. (2011) Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. *Phytotherapy research*. 19(1):42-7.
- [15] Bhattacharya R., Rolta R., Dev K., Sourirajan A. (2021) Synergistic potential of essential oils with antibiotics to combat fungal pathogens: Present status and future perspectives. *Phytotherapy research*. 35(11):6089-6100.
- [16] Aburjai T., Darwish R.M., Al-Khalil S., Mahafzah A., Al-Abbadi A. (2001) Screening of antibiotic resistant inhibitors from local plant materials against two different strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Ethnopharmacology*. 76(1):39-44.
- [17] Stefanovic D.O. (2017) Synergistic activity of antibiotics and bioactive plants extracts: a study against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *IntechOpen - Bacterial pathogenesis and antibacterial control*. Chapter 2: 23-48.
- [18] Moon S.E., Kim H.Y., Cha J.D. (2011) Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. *Archives of Oral Biology*. 56(9):907-16.
- [19] Horiuchi K., Shiota S., Kuroda T., Hatano T., Yoshida T. and Tsuchiya T. (2007) Potentiation of Antimicrobial Activity of Aminoglycosides by Carnosol from *Salvia officinalis*. *Biol. Pharm. Bull.* 30(2) 287—290.
- [20] Caufin S., Navarra C., Riva S., Danieli B. (2014) Enzymatic acylation as an efficient tool for an easy access to specific acyl derivatives of the natural antioxidants verbascoside, teupolioside and echinacoside. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 104:42-47.
- [21] Tian X.Y., Li M.X., Lin T., Qiu Y., Zhu Y.T., Li X.L., Tao W.D., Wang P., Ren X.X., Chen L.P. (2021) A review on the structure and pharmacological activity of phenylethanoid glycosides. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 209:1-59.
- [22] Alipieva K., Korkina L., Orhan I.E., Georgiev M.I. (2014) Verbascoside-a review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. *Biotechnology Advances*. 32(6):1065-76.
- [23] Rana S., Narinderpal Kaur N., Devi P. (2020) A Review on Pharmacognostic Profile of *Ajuga reptans*. *Research & Reviews: A Journal of Pharmacognosy (stm journals)* 7(1):9-18.
- [24] Li C.X., Li T.H., Zhu M., Lai J., Wu Z.P. (2021) Pharmacological properties of glabridin (a flavonoid extracted from licorice): A comprehensive review. *Journal of Functional Foods*. 85.
- [25] Simmler C., Pauli G.F., Chen S.N. (2013) Phytochemistry and biological properties of glabridin. *Fitoterapia*. 90:160-84.
- [26] Gupta V.K. , Fatima A., Faridi U., Negi A.S., Shanker K., J K Kumar, Rahuja N., Luqman

- S., Sisodia B.S., Saikia D., Darokar M.P., Khanuja S.P.S. (2008) Antimicrobial potential of *Glycyrrhiza glabra* roots. *Journal of Ethnopharmacology*. 116(2):377-80.
- [27] Fatima A., Gupta V.K, Luqman S., Negi A.S., Kumar J.K., Shanker K., Saikia D., Srivastava S., Darokar M.P., Khanuja S.P.S (2009) Antifungal activity of *Glycyrrhiza glabra* extracts and its active constituent glabridin. *Phytotherapy Research*. 23(8):1190-3.
- [28] Lu H., Tian Z., Cui Y., Liu Z., Ma X. (2020) Chlorogenic acid: A comprehensive review of the dietary sources, processing effects, bioavailability, beneficial properties, mechanisms of action, and future directions. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 19(6):3130-3158.
- [29] Naveed M., Hejazi V., Abbas M., Kamboh A. A., Khan G.J., Shumzaid M., Ahmad F., Babazadeh D., FangFang X., Modarresi-Ghazani F., WenHua L., XiaoHui Z. (2018) Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 97:67-74.
- [30] Petersen M. and Simmonds M. S. J. (2003) Rosmarinic acid. *Phytochemistry*. 62(2):121-5.
- [31] Ravn H.W., Mondolot L., Kelly M.T., Lykke A.M. (2015) Plantamajoside — A current review. *Phytochemistry Letters*. 12:42-53.
- [32] Giordani R., Regli P., Kaloustian J., Mikail C., Abou L., Portugal H. (2004) Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phytotherapy research*. 18(12):990-5.
- [33] Papenfort K. and Bassler B. (2016) Quorum-Sensing Signal-Response Systems in Gram-Negative Bacteria. *Nat. Rev. Microbiol*. 14(9): 576–588.
- [34] Bodini S. F., [Manfredini](#) S., Epp M., Valentini S., Santori F. (2009) Quorum sensing inhibition activity of garlic extract and p-coumaric acid. *Letters in Applied Microbiology*. 49(5):551-5.
- [35] Sharifi A. and Nayeri Fasaee B. (2022) Selected plant essential oils inhibit biofilm formation and luxS- and pfs-mediated quorum sensing by *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*. 74(6):916-923.
- [36] Lee K.M., Lim J., Nam S., Yoon M.Y., Kwon Y.K., Jung B.Y, Park Y., Park S. & Yoon S.S. (2011) Inhibitory effects of broccoli extract on *Escherichia coli* O157:H7 quorum sensing and in vivo virulence. *FEMS Microbiol. Lett*. 321(1):67-74.

