

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze del Farmaco

Corso di Laurea Triennale in  
Scienze Farmaceutiche Applicate

Tesi di Laurea

**Zafferano (*Crocus sativus* L.):  
Proprietà terapeutiche in malattie  
psichiatriche e neurodegenerative**

Relatore  
Prof. Stefano Dall'Acqua

Candidata  
Erica Vignola

Anno Accademico 2022/2023

# Indice

<b>1 Introduzione .....</b>	<b>1</b>
<b>2 <i>Crocus sativus</i> L.....</b>	<b>2</b>
2.1 Origine e coltivazione.....	2
2.2 Ciclo vegetativo e aspetti botanici.....	5
2.3 Profilo fitochimico.....	10
2.4. Farmacocinetica dei principali costituenti dello zafferano .....	13
2.5 Tossicità.....	16
<b>3 Attività dei composti bioattivi di <i>C. sativus</i> a livello del sistema nervoso centrale.....</b>	<b>18</b>
3.1 Depressione.....	18
3.1.1 Nuovi studi dell'attività antidepressiva.....	19
3.2 Morbo di Alzheimer.....	23
3.2.1 Nuovi studi dell'effetto neuroprotettivo nell'Alzheimer .....	24
<b>4 Conclusione.....</b>	<b>27</b>
<b>Bibliografia .....</b>	<b>28</b>

# Capitolo 1

## Introduzione

Lo zafferano è una delle spezie più costose al mondo, ottenuta dagli stimmi essiccati di *Crocus sativus* L. (Iridaceae), che presenta una lunga tradizione di utilizzo per le sue qualità aromatiche, coloranti e terapeutiche. La sua condizione di spezia pregiata e costosa è dovuta alla coltivazione, raccolta e lavorazione e le ha valso il soprannome di ‘oro rosso’.

Viene principalmente coltivata in Iran, India e in minore parte in molti paesi mediterranei; cresce in terreni sabbiosi, argillosi e ben drenati. La sua propagazione avviene attraverso i cormi e fiorisce una volta all’anno nel periodo autunnale e per un tempo relativamente breve, restringendo così il tempo di raccolta. Quest’ultimo è un processo che generalmente viene fatto a mano aumentando la mano d’opera e i costi.

Il valore dello zafferano viene determinato dalla presenza dei suoi principali composti bioattivi dati da crocetina e i suoi esteri glicosidici chiamate crocine, picrocrocina e safranale che contribuiscono rispettivamente ad attribuire alla spezia colore, sapore e aroma.

In questa tesi si è valutata una prima parte generale riguardante la pianta di *C. sativus* sotto gli aspetti di origine, coltivazione, botanica, ciclo vegetativo, fitochimica fino ad arrivare alla valutazione degli studi che ne hanno valutato le proprietà farmacocinetiche e tossicologiche. Nella seconda parte si è deciso di riportare alcuni degli studi più recenti riguardanti le proprietà in campo neurologico dei composti bioattivi dello zafferano, che sostengono l’utilità delle integrazioni di zafferano e dei suoi composti bioattivi in malattie psichiatriche e neurodegenerative, quali la depressione e il morbo d’Alzheimer.

# Capitolo 2

## *Crocus sativus* L.

### 2.1 Origine e coltivazione

Il termine zafferano deriva dal nome arabo *za'faran* e si riferisce alla spezia ottenuta dall'essiccamento degli stimmi di *Crocus sativus* L. Questa pianta erbacea perenne presenta ancora oggi origini sconosciute, sia da un punto di vista geografico, sia da un punto di vista genetico. Gli studiosi hanno supposto che le più probabili terre di origine siano da delimitare all'Asia minore, al Medio Oriente o alle isole greche sudoccidentali (Shokrpour, 2019). Da questi punti di origine si è successivamente ipotizzato che la diffusione si sia spinta verso le regioni dell'India, della Cina e, grazie agli arabi, anche in tutto il bacino del Mediterraneo.

La derivazione geografica dello zafferano non è l'unica particolarità, anche l'origine genetica di questa straordinaria pianta è dibattuta e la più probabile teoria suggerisce che la netta somiglianza con *Crocus cartwrightianus* Herb., chiamato anche zafferano selvatico, possa essere la risposta all'origine di *C. sativus* (Nemati *et al.*, 2019). La ricerca genetica è data principalmente dalla particolarità del *C. sativus* di essere una specie triploide, una condizione che comporta alla presenza di un triplo assetto cromosomico ( $3n$ ) con un'incompatibilità per la riproduzione sessuata ottenendo così sterilità. Nel corso dei decenni si sono discusse le modalità di evoluzione del triploide valutando come punti di partenza l'autopoliploidizzazione da un singolo progenitore o l'alloploidizzazione che coinvolge più specie parentali. Secondo recenti studi si è stabilito che l'elevata variabilità degli individui di *C. cartwrightianus* e l'elevato grado di eterozigosi constatato in *C. sativus* rendono plausibile la genesi autopoliploide dello zafferano, portando all'esclusione nel processo evolutivo le altre specie di *Crocus*. (Nemati *et al.*, 2018). In sintesi, si è ipotizzato che la nascita dello zafferano sia riconducibile alla comparsa spontanea di un triploide di *C. cartwrightianus*, successivamente scoperto e scelto dall'uomo per essere addomesticato. Tuttavia le informazioni sugli antenati dello zafferano rimangono ancora ambigue e fonte di discussione e ricerca.

Per quanto riguarda il processo di addomesticamento dello zafferano, in base ad alcuni studi storici archeologici, probabilmente fu iniziato tra il 1600-1700 a.C., teorizzato dalla presenza di ritratti raffiguranti fiori di zafferano presenti negli affreschi del Palazzo Minoico di Cnosso a Creta. (Mansotra and Vakhlu, 2022).

Oggi giorno il principale paese produttore di zafferano è l'Iran con una quota del 90% sulla produzione mondiale, mentre quote di produzioni nettamente inferiori appartengono ad altri paesi come India, Grecia, Afghanistan, Marocco, Spagna e Italia (Tabella 1) (Figura 1) (Shahnoushi *et al.*, 2020).

Paese	Superficie (ha)	Produzione (tonnellate)	Resa (kg ha <sup>-1</sup> )	Quota nel mondo (%)
Iran	105,270	336	3.3	88.8
India	5707	22	3.9	5.8
Grecia	1800	7.2	4	1.9
Afghanistan	2811	6	2.1	1.58
Marocco	200	2.6	3.2	0.68
Spagna	165	2.3	14	0.6
Italia	500	1	2	0.26
Cina	500	1	2	0.26
Azerbaijan	35	0.23	6.6	0.06
Totale	116,988	378.33	–	100

**Tabella 1.** Produzione di zafferano nei principali paesi produttori di zafferano del mondo nel 2016 (Shahnoushi *et al.*, 2020). Fonte: dati del Ministero dell'Agricoltura iraniano, 2017. Rapporto di zafferano. Piano nazionale di erboristeria.

Dal punto di vista agronomico, lo zafferano predilige terreni argillosi, sciolti, ben drenati e che presentano intervalli di pH che variano da neutri a leggermente alcalini e una possibile presenza di quantità elevata di sostanza organica. Ad esempio, in Iran si ha la presenza di terreni calcarei con tessitura argillosa sabbiosa e limosa, mentre in Afghanistan terreni sabbiosi-limosi ricchi di calcio. In Italia i terreni adatti e sfruttati per la coltivazione di zafferano si trovano nelle regioni di Abruzzo, Toscana, Valle d'Aosta e Sardegna.

Le condizioni del suolo risultano essere cruciali per ottenere le migliori prestazioni dello zafferano, in termine di stimmi, di caratteristiche qualitative delle spezie, di sottoprodotti e di resa dei cormi figli (Cardone *et al.*, 2020).



**Figura 1.** La mappa mondiale dei paesi esportatori di zafferano, 2016 (Shokrpour, 2019).

La coltivazione dello zafferano può avere ciclo annuale o poliennale. Questa pianta viene propagata attraverso i cormi che vengono generalmente seminati a mano ad una profondità di 10-20 cm in un periodo che varia da maggio a settembre in base alle zone e alle condizioni climatiche. La fioritura inizia nel periodo autunnale, da ottobre a novembre, e la raccolta si effettua generalmente a mano e al mattino, quando la corolla si presenta ancora chiusa così da mantenere la massima qualità degli stammi. Dopo la separazione degli stammi dal resto del fiore, questi vengono essiccati a bassa temperatura (30-35°C) per evitare possibili deterioramenti dei metaboliti secondari della spezia (Gresta *et al.*, 2008).

La raccolta manuale e il breve periodo di fioritura di 2 settimane comportano un intenso lavoro e molta manodopera, diventando così i principali motivi per l'altissimo prezzo dello zafferano (Shokrpour, 2019).

Il miglior zafferano viene venduto intero, quindi non in polvere, all'interno di contenitori ermetici per poterne preservare l'integrità.

A causa della limitata produzione e del costo decisamente elevato, lo zafferano è una delle spezie maggiormente adulterate attraverso l'aggiunta di:

- parti della pianta, come stami e stili;

- parti di altre piante, come fiori di *Calendula officinalis* L., *Carthamus tinctorius* L., *Arnica montana* L.;
- stimmi di altre specie, come di *Curcuma longa* L. e *Allium porrum* L.

Altre adulterazioni avvengono con la paprika, miele, olio, solfati, cloruri e carbonati. Per questo motivo lo zafferano è sottoposto a certificazione seguendo la normativa dell'Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione ISO 3632 dal 1993 (Cardone *et al.*, 2020) (Melnyk, Wang and Marcone, 2010).

## 2.2 Ciclo vegetativo e aspetti botanici

*C. sativus* (Figura 2), chiamato comunemente zafferano domestico o coltivato, è una pianta erbacea, perenne, geofita e triploide sterile facente parte della famiglia delle Iridaceae.



Figura 2. Tavole parietali specie «*Crocus sativus* L. » (Erbario UniMi)

Lo zafferano è classificato tassonomicamente come:

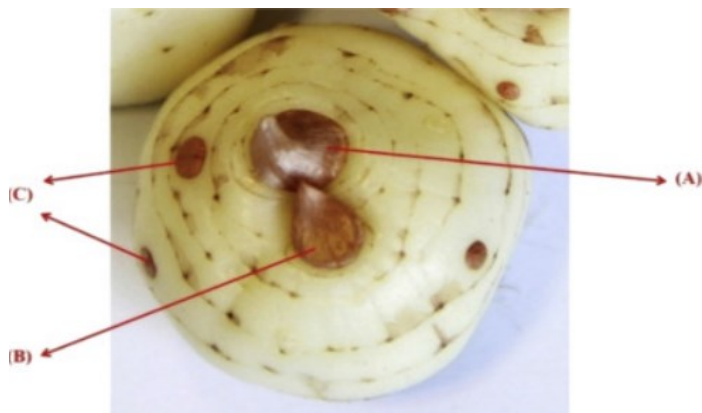
- Dominio: Eukarya
- Regno: Plantae
- Sottoregno: Tracheobionta
- Superdivisione: Spermatophyta
- Divisione: Magnoliophyta
- Classe: Liliopsida
- Sottoclasse: Liliidae
- Ordine: Liliales
- Famiglia: Iridaceae
- Genere: *Crocus*
- Specie: *sativus* (Kothari, Thakur and Kumar, 2021).

La particolarità di questa pianta è la sua condizione di triploide che ne causa sterilità. Infatti la riproduzione sessuata è assente perché l'accoppiamento cromosomico, durante la meiosi triploide, è irregolare in quanto i cromosomi non si appaiano regolarmente a due a due, portando così a una distribuzione non regolare di cromosomi fra i gameti (*poliploidia nell'Enciclopedia Treccani*, no date). Ciò comporta all'incapacità di sviluppare gameti e dunque alla non produzione di semi fertili (Kothari, Thakur and Kumar, 2021).

Infatti, la riproduzione della pianta di zafferano avviene vegetativamente grazie ai suoi cormi, chiamati comunemente anche bulbi. Queste strutture sono steli sotterranei corti e molto spessi, con forme circolari o ellittiche e basi piatte o leggermente curve. Sono caratterizzate dalla presenza di tuniche filamentose poste per ricoprire e proteggere un'epidermide liscia e color crema (Koocheki and Seyyedi, 2020).

I cosiddetti cormi madre presentano tessuti meristemati da cui generano nuovi cormi, chiamati anche cormi figli o sostituti.

La crescita e la formazione dei nuovi bulbi figli sono date dalla divisione



**Figura 3.** Morfologia del bulbo di zafferano dopo la rimozione delle tuniche fogliari. (A) Gemme apicali, (B) subapicali e (C) laterali (ascellari) (Koocheki and Seyyedi, 2020).

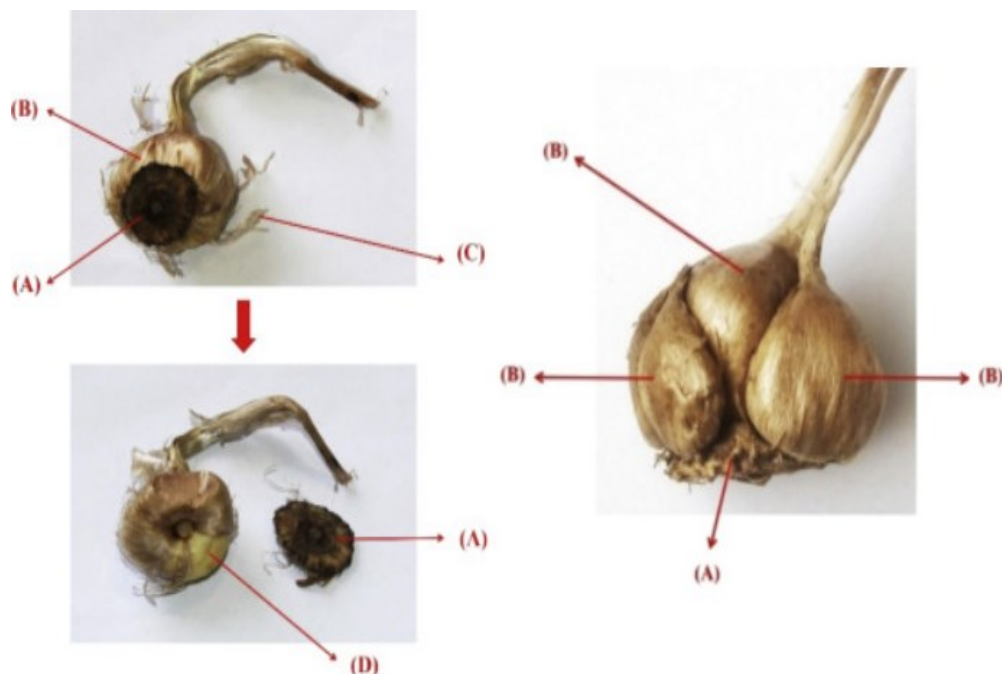


cellulare delle gemme apicali e subapicali, definite come germogli vegetativi-riproduttivi visibili sulla superficie dopo la rimozione delle tuniche fogliari, mentre le gemme laterali si differenziano per la produzione di foglie. Le gemme apicali risultano essere molto più grandi data anche la loro maggior capacità nel formare cormi figli (Figura 3).

A maggio si ha l'essiccazione della parte epigea della pianta e l'inizio della dormienza del corno. Da metà luglio fino all'inizio di agosto si sviluppano gli organi vegetativi, e con la fine di agosto si differenziano gli organi riproduttivi. A questo punto, la dormienza dello zafferano s'interrompe.

Le foglie possono presentarsi durante o dopo la fioritura, dove quest'ultima si ha con l'abbassamento delle temperature e l'inizio del periodo autunnale.

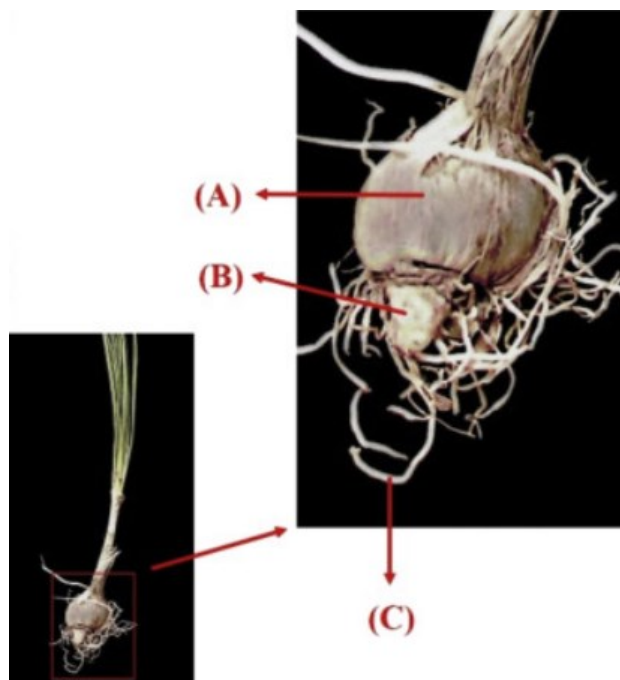
In questo processo la crescita dei cormi figli è rallentata ma riprende al termine della fioritura, e continua per tutto il periodo di crescita vegetativa che va da dicembre a maggio con un tasso massimo di crescita a dicembre. I cormi madre si degradano con la crescita dei cormi figli, fino ad appassire completamente presentandosi come dischi piatti e marroni (Figura 4) (Koocheki and Seyyedi, 2020).



**Figura 4.** Organografia del corno della figlia. (A) Cormo madre rimanente, (B) corno figlia, (C) tuniche fogliari reticolate fibrose e (D) corno epidermico liscio scoperto (Koocheki and Seyyedi, 2020).

*C. sativus* è una pianta che può raggiungere i 20-30 cm di altezza.

Le radici avventizie presenti nello zafferano sono di due tipologie: radici assorbenti o fibrose e radici contrattili (Figura 5). Le prime si sviluppano nell'area basale di ciascun corno durante la crescita dei germogli e risultano morfologicamente dritte e sottili con un diametro di 1-3 mm e una lunghezza di 15-20 cm. Svolgono la funzione di assorbire acqua e sostanze nutritive. Invece, le radici contrattili presentano dimensioni maggiori con diametro che varia da 3 a 10 mm e colorazione biancastra. Queste seconde radici hanno la capacità di penetrare il terreno, tirando il corno più in profondità (Cardone *et al.*, 2020) (Koocheki and Seyyedi, 2020).



**Figura 5.** (A) corno madre, (B) crescita iniziale della radice contrattile alla base del corno madre, (C) radice assorbente del corno madre (Koocheki and Seyyedi, 2020).

Si ha la presenza di catafilli, foglie metamorfosate, sessili, povere o prive di clorofilla che svolgono la funzione di protezione verso i germogli e le nuove foglie.

Le foglie della pianta di zafferano sono strette e sottili con una lunghezza che può arrivare fino ai 70 cm e una larghezza di 1-3 mm. Hanno forma lanceolata, dritta e stretta con margine intero e una colorazione verde scuro (Rashed-Mohassel, 2020).

Alla base dell'ovario si possono vedere le brattee e bratteole diseguali e bianche, mentre i fiori sono costituiti da un perigonio che presenta sei tepali viola, tre interni

e tre esterni, che si incontrano in corrispondenza del tubo che nasce dalla parte superiore dell'ovario.

Il gineceo o pistillo è dato da un ovario infero collegato allo stilo che termina con tre filamenti stigmatici a forma di clava, di colorazione rosso intenso.

L'androceo presenta tre stami con filamento corto e antere di colorazione gialla (Cardone *et al.*, 2020) (Figura 6).



**Figura 6.** Foto di *Crocus sativus* (*Crocus sativus* L. - colt. - *Forum Acta Plantarum*)

## 2.3 Profilo fitochimico

Gli stimmi presentano un contenuto del 14-16% di acqua, 11-13% di sostanze azotate, 12-15% di zuccheri, 41-44% di estratti solubili, 0,6-0,9% di olio essenziale, 4-5% di fibre e 4-6% di ceneri (Cardone *et al.*, 2020).

L'analisi del profilo fitochimico degli stimmi di *C. sativus* ha evidenziato la presenza di più di 150 composti di natura volatile e non. Tuttavia, poco meno di un terzo di essi sono stati identificati (Mzabri, Addi and Berrichi, 2019).

La componente volatile è data da terpeni, alcoli terpenici e i loro esteri, tra cui il safranale, uno dei componenti principali dello zafferano. Invece tra i composti non volatili abbiamo la presenza di crocine, crocetina, picrocrocina, altri carotenoidi come la zeaxantina e il licopene, e flavonoidi, dove in questi ultimi troviamo la quercetina e il kaempferolo (Pitsikas, 2016) (Srivastava *et al.*, 2010).

Lo zafferano è una spezia preziosa per il suo alto contenuto in carotenoidi.

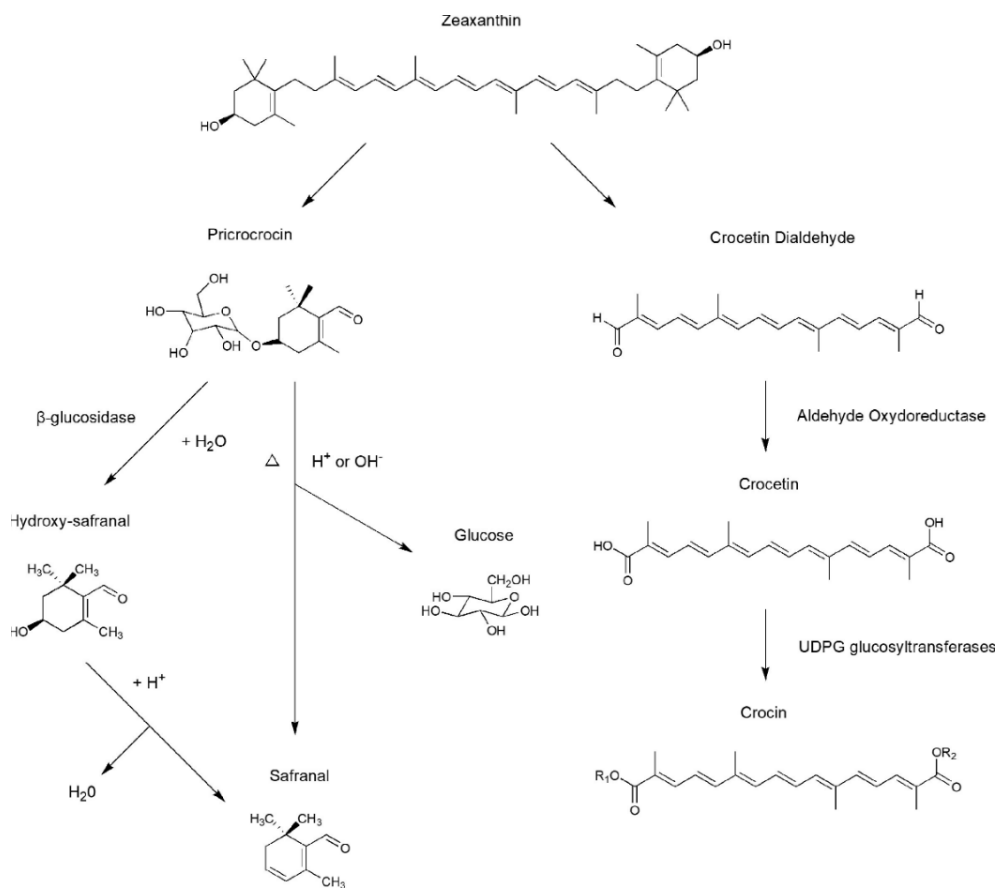
I carotenoidi sono delle molecole che fanno parte della grande famiglia dei terpenoidi: composti ottenuti dalla condensazione di unità isopreniche (C<sub>5</sub>). I due mattoni fondamentali per la costituzione dei terpeni sono dati da isopentenil difosfato (IPP) e dimetilallil difosfato (DMAPP), ottenuti da due vie biosintetiche: la via dell'acido mevalonico (citosol) e la via del metileritritol fosfato (plastidi). Quest'ultima via, chiamata anche via del 'non mevalonato', è quella principalmente coinvolta nella biosintesi dei carotenoidi.

I carotenoidi sono tetraterpenoidi (C<sub>40</sub>) derivati del fitene ottenuto dalla condensazione di due molecole di geranilgeranil difosfato (GGPP), che a sua volta è una molecola ottenuta da farnesil difosfato (FPP) e isopentenil difosfato (IPP). L'FPP è ottenuto da una molecola di geranil difosfato (GPP), formata da dimetil allil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP), e una di isopentenil difosfato (IPP) (Seifi and Shayesteh, 2020).

Si ha la presenza di due sottoclassi di carotenoidi: i caroteni, strutture idrocarburiche, e le xantofille, che a differenza dei caroteni presentano anche gruppi funzionali contenenti ossigeno.

I tre composti biologicamente attivi dello zafferano sono: crocina, picrocrocina e safranale. Il processo di sintesi di questi metaboliti secondari parte dalla formazione di fitene. L'azione di enzimi sul fitene porta all'ottenimento di licopene, un carotene che viene successivamente ciclizzato per formare  $\alpha$ -carotene e  $\beta$ -carotene. Da

quest'ultima molecola, attraverso l'idrossilazione, ha origine la zeaxantina, una sostanza facente parte delle xantofille e 'molecola madre' dei principali composti dello zafferano, da cui hanno origine la crocetina dialdeide e l'idrossi-β-ciclocitrale. Per deidrogenazione della dialdeide della crocetina si ottiene la crocetina e per glucosilazione di quest'ultima si ottiene la crocina. Invece l'idrossi-β-ciclocitrale viene convertito in picrocrocina che a sua volta viene convertita in safranale (Seifi and Shayesteh, 2020) (Figura 7).

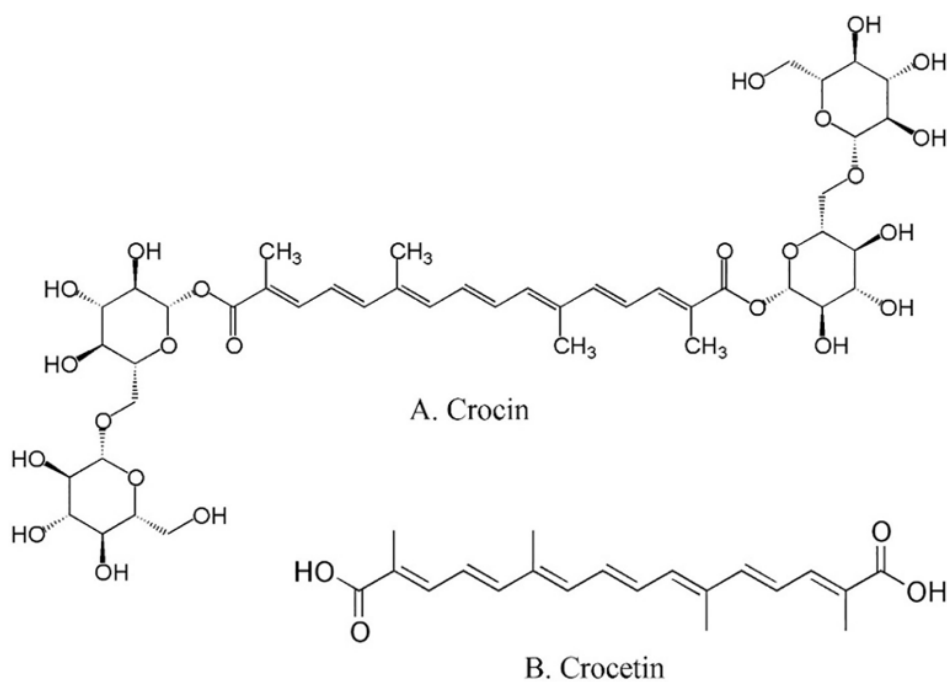


**Figura 7.** Via di biosintesi di crocina, crocetina, safranale e altri composti importanti negli stimmi dello zafferano (Bian, Zhao and Lee, 2020).

La crocetina e i suoi esteri glicosidici chiamati crocine (Figura 8) sono carotenoidi responsabili della colorazione rossastra degli stimmi.

La crocetina è un acido dicarbossilico coniugato, rappresentato da una catena idrocarburica con all'estremità gruppi carbossilici. È una molecola idrofoba e quindi solubile in olio (Srivastava *et al.*, 2010).

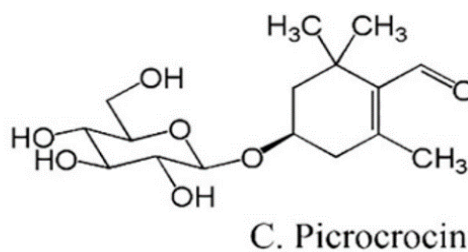
La crocina è un diestere formato da due molecole di gentiobiosio, un disaccaride formato da due unità di D-glucosio, e dall'acido dicarbossilico crocetina. A seconda del numero di molecole di zucchero si ottengono diverse forme di crocina. Tuttavia, il colore è dato principalmente dall' $\alpha$ -crocina, definita anche crocina 1 o semplicemente crocina, e risulta essere quella presente in maggiore percentuale (6-16% del peso secco). La presenza dei due gentiobiosi conferisce alla molecola di crocina idrofilia, portando al formazione di un prodotto solubile in acqua (Sharma and Kumar, 2022) (Seifi and Shayesteh, 2020).



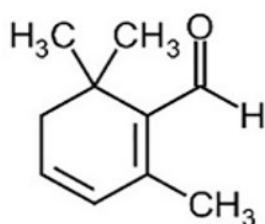
**Figura 8.** Strutture chimiche dei costituenti importanti di *Crocus sativus* L. – Crocina e crocetina (Roshanravan and Ghaffari, 2022).

La picrocrocina (Figura 9) è il glucoside del safranale e suo precursore, oltre ad essere la molecola responsabile del sapore amaro e astringente dello zafferano (Pitsikas, 2016).

Costituisce circa l'1-3% del peso secco della spezia (Cardone *et al.*, 2020).



**Figura 9.** Strutture chimiche dei costituenti importanti di *Crocus sativus* L. - Picrocrocina (Roshanravan and Ghaffari, 2022)



## D. Safranale

**Figura 10.** Strutture chimiche dei costituenti importanti di *Crocus sativus* L. - Safranale (Roshanravan and Ghaffari, 2022)

L'idrolisi della picrocrocina dà origine al safranale (Figura 10): una molecola con struttura terpenica monociclica con una funzione aldeidica e aglicone della picrocrocina. È il componente principale dell'olio essenziale distillato dello zafferano, responsabile del suo aroma caratteristico, e rappresenta circa il 30-70% della componente volatile e lo 0,001-0,006% della sostanza secca. Si presenta a basse concentrazioni o nulle negli stimmi freschi e la sua presenza è data dai processi di essiccazione, quindi disidratazione, e conservazione dello zafferano (Cardone *et al.*, 2020) (Pitsikas, 2016) (Melnyk, Wang and Marcone, 2010).

## 2.4. Farmacocinetica dei principali costituenti dello zafferano

La farmacocinetica riguardante i carotenoidi è nota.

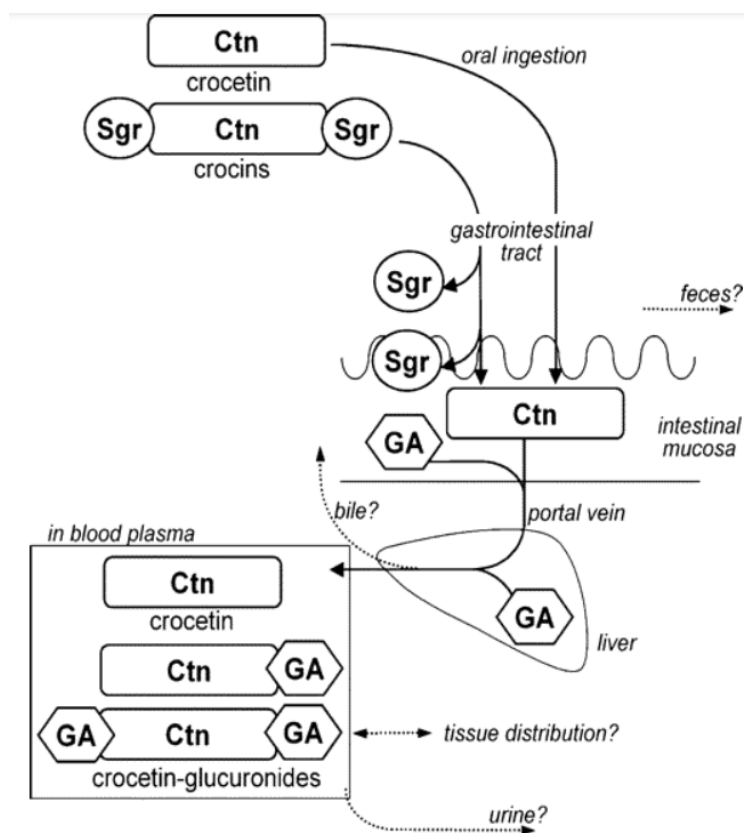
Date le proprietà lipofile, i carotenoidi vengono assorbiti a livello della mucosa intestinale per diffusione passiva e incorporati nei chilomicroni: lipoproteine costituite da trigliceridi e piccole quantità di colesterolo, fosfolipidi e proteine. Dopodiché vengono secreti a livello del flusso sanguigno.

I componenti dello zafferano sono per la maggior parte esteri glucosidici dei carotenoidi, quindi presentano proprietà idrofile (Moratalla-López *et al.*, 2019). Studi riguardanti l'assorbimento di crocetina e delle crocine somministrate per via orale a modelli animali (topi) hanno portato alle seguenti conclusioni: le crocine vengono idrolizzate a crocetina nel lume gastrointestinale o nella mucosa intestinale prima di passare nella circolazione sanguigna. Una volta ottenuta la crocetina, questa viene parzialmente metabolizzata in coniugati monoglucuronidi e diglucuronidi nella mucosa intestinale o nel fegato o in entrambi.

Il destino metabolico della crocetina (Figura 11), rispetto a quello dei comuni carotenoidi, è diverso. Infatti, si è visto che questa molecola è caratterizzata da un rapido assorbimento e glucuronazione, seguiti da un veloce aumento della sua

concentrazione a livello sanguigno, possibile indicatore di un assorbimento a livello della vena porta (Asai *et al.*, 2005) (Zhang *et al.*, 2017).

Asai *et al.*, 2005 hanno inoltre constatato che i metaboliti coniugati della crocetina si presentavano nel plasma del topo anche dopo 8 ore dalla somministrazione sia di crocetina che di crocina, mentre la crocetina in forma libera era scomparsa dopo 8 ore dalle dosi. In conclusione, i coniugati della crocetina possono agire come molecole bioattive o possono agire come veicoli per il trasporto della crocetina ai tessuti bersaglio.



**Figura 11.** Destino metabolico proposto della crocetina e delle crocine somministrate per via orale nei topi. Ctn, frazione di crocetina; GA, frazione di acido glucuronico; e Sgr, frazione zuccherina (gentiobiosio o glucosio) (Asai *et al.*, 2005)

Umigai *et al.*, 2011, attraverso uno studio clinico di valutazione del profilo farmacocinetico della crocetina in capsula dopo una singola somministrazione orale a tre dosi (7,5 mg, 15 mg, 22,5 mg) su 10 volontari adulti e sani (5 uomini e 5 donne), hanno riscontrato che la crocetina raggiungeva una massima concentrazione plasmatica dopo 4-4,8 ore dalla somministrazione orale e presentava un'emivita di



6,1-7,5 ore. Inoltre, grazie a questo studio si è appurato che non sussistono effetti avversi gravi fino a 22,5 mg di dosaggio di crocetina.

In uno studio più recente, si è valutata la somministrazione di due dosi (56 mg e 84 mg) di affron®, un estratto commerciale degli stimmi di zafferano prodotto nello stabilimento di Pharmactive Biotech Products S. L. a Madrid (Spagna), a 13 volontari umani sani. La preparazione galenica conteneva safranale (0,04% ± 0,01), picrocrocina (3,21% ± 0,07), diglucoside di kaempferolo (0,13% ± 0,01), crocine (3,63% ± 0,05) e crocetina (0,03% ± 0,01) e diversi eccipienti (ipromellosa, macrogol (PEG) 8000 e cera carnauba). Si sono raccolti campioni di sangue ogni 30 minuti dopo 3 e 24 ore dalla somministrazione. I risultati hanno riportato che il principale composto a livello plasmatico fosse crocetina con concentrazione massime raggiunte dopo 1-1,5 ore, mentre crocina, picrocrocina e safranale non sono stati rilevati (Almodóvar *et al.*, 2020).

Due studi hanno ipotizzato che la crocetina circolante possa prendere legame con l'albumina sierica umana ed altre proteine sieriche, e diverse tecniche sono state utilizzate per dimostrare la possibile formazione di questi complessi stabili che potrebbero contribuire al processo di distribuzione attraverso il sangue (Miller *et al.*, 1982) (Salem *et al.*, 2019).

Ci sono studi recenti che hanno portato alla luce questioni irrisolte riguardanti il ruolo del microbiota intestinale nei processi metabolici dei principali composti. Lo studio di Zhang *et al.*, 2019 ha rilevato che composti come crocina e crocetina non risultano presenti a livello neuronale post somministrazione orale o endovenosa. Dunque, è stata ipotizzata la possibile presenza di altri metaboliti non ancora identificati che potrebbero essere implicati nei benefici neurologici. In un altro studio (Shakya *et al.*, 2020) è stata somministrata della crocina (600 mg/kg), per via orale, a ratti maschi pretrattati con una miscela di antibiotici e a ratti di controllo. Si è visto che la quantità di crocetina prodotta da idrolisi della crocina era più alta nei controlli rispetto ai modelli animali trattati, così suggerendo che il metabolismo della crocina da parte del microbiota intestinale sia un fattore critico per comprendere le azioni terapeutiche e farmacologiche della crocina e della crocetina.

Uno studio *in vitro* effettuato da Lautenschläger *et al.*, 2015, è stato realizzato per determinare se la crocetina e la crocina fossero in grado di superare la barriera intestinale e di penetrare la barriera ematoencefalica (BBB). L'indagine ha stabilito che dopo l'idrolisi delle crocine a crocetina, quest'ultima viene assorbita a livello della barriera intestinale attraverso la diffusione transcellulare passiva in misura

elevata e in breve tempo. Successivamente questa molecola riesce a penetrare con lentezza la barriera ematoencefalica per raggiungere il SNC, in quanto presenta alta affinità con i recettori NMDA. Per questo studio sono stati utilizzati due tipi di modelli in vitro che imitavano la BBB: cellule endoteliali capillari cerebrali suine (BCEC) e barriera del liquido cerebrospinale del sangue (BCSFB).

In sintesi, tutti questi studi hanno portato alla conclusione che uno dei principali composti bioattivi degli stimmi dello zafferano che viene assorbito, metabolizzato ed è capace di raggiungere i diversi tessuti, incluso il cervello, per esplicare una attività terapeutica, è la crocetina assieme ai suoi metaboliti.

## 2.5 Tossicità

Lo zafferano è una spezia utilizzata da tempi immemori, dunque la sua sicurezza è supportata da un utilizzo tradizionale come principalmente additivo alimentare. Con l'aumento dell'interesse di questa spezia a livello medicinale e terapeutico, si è richiesta una valutazione sulla sicurezza e sulla tossicità dello zafferano per comprendere a pieno i suoi possibili dosaggi senza causare effetti avversi che possano mettere a rischio la salute umana.

Una particolarità è stata riscontrata nella molecola di safranale. Uno studio dato da Hosseinzadeh *et al.*, 2013, ha ricavato valori di LD<sub>50</sub>, dopo somministrazione intraperitoneale (IP), di 1,48 mL/Kg nei topi maschi, di 1,88 mL/Kg nei topi femmine e di 1,50 mL/Kg nei ratti Wistar maschi. Invece con la somministrazione orale, i valori cambiavano rispettivamente in: 21,42, 11,42 e 5,53 mL/kg. Come dimostrano i dati di questo studio si ha una differenza significativa di LD<sub>50</sub> tra le due vie di somministrazione dovuta probabilmente a maggior effetto di primo passaggio e a una minor velocità di assorbimento con il trattamento orale. Questo studio conferma che la tossicità acuta del safranale risulta essere nulla nel caso della somministrazione orale e bassa in quella intraperitoneale. Questo studio ha anche valutato la tossicità subacuta del safranale ed è risultato che questa molecola a dosi di 0,1, 0,25 e 0,5 ml/kg per 21 giorni con somministrazione orale non ha causato alcun decesso nei ratti. Tuttavia, gli animali trattati hanno mostrato alcune prove di tossicità, con cambiamenti comportamentali come iperattività ed eccitazione, dopo 5-7 minuti di trattamento che potrebbero essere correlati alla natura irritante della maggior parte degli oli essenziali. Inoltre, il safranale ha comportato ad una riduzione del livello di colesterolo totale, dei trigliceridi e della fosfatasi alcalina

(ALP), ma ha anche aumentato il livello di acido lattico deidrogenasi (LDH) e azoto ureico sierico (BUN). Dagli esami istologici dei tessuti si è ulteriormente riscontrato che il safranale ha comportato tossicità a livello di reni e polmoni. In sintesi, lo studio ha stabilito che il safranale, rispetto allo zafferano e alla crocina, ha un effetto più tossico sugli indici ematologici e biochimici.

Dal punto di vista clinico, uno studio ha riscontrato che un'alta dose di zafferano (comprese 400 mg) per 7 giorni riduceva significativamente i parametri ematologici e biochimici in volontari adulti (Modaghegh *et al.*, 2008).

Secondo alcuni studi la dose sicura di zafferano si aggira attorno a 1,5 g al giorno, mentre dosi superiori a 5 g al giorno possono dare effetti avversi e 20 g rappresentano la dose letale. In conclusione, grazie ai diversi studi animali e clinici fatti per valutare la tossicità dello zafferano, le dosi efficaci in terapia si aggirano tra i 30 e i 50 mg al giorno, risultando nettamente inferiori alle dosi possibilmente tossiche (maggiori di 5 g al giorno).

Lo zafferano e i suoi costituenti risultano avere un ampio indice terapeutico e le dosi terapeutiche, valutate attraverso gli studi, non producono tossicità significativa (Mehri, Razavi and Hosseinzadeh, 2020).

# Capitolo 3

## Attività dei composti bioattivi di *C. sativus* a livello del sistema nervoso centrale

### 3.1 Depressione

Oggigiorno il peso dei disturbi mentali aggrava sempre di più le condizioni di salute fisica, psicologica e comportamentale della popolazione mondiale.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) stima che 971 milioni di persone in tutto il mondo sono affette da disturbi mentali, dove la depressione è stata identificata come una delle principali disabilità croniche (Korczak *et al.*, 2023).

Uno degli impatti più gravi e negativi sulla salute mentale umana è stato causato dallo scoppio della pandemia di SARS-CoV-2. Questa situazione critica a livello mondiale ha portato con sé una serie di effetti collaterali, dovuti a cambiamenti e interruzioni forzate nello stile di vita (lutti, problematiche lavorative ed economiche, isolamento e solitudine) che si sono riversati sulla popolazione portando a un incremento e a una diffusione su vasta scala di disturbi psichiatrici, quali ansia e depressione. Si è visto che questi fattori stressogeni hanno colpito anche persone non sottoposte direttamente ad essi, in quanto influenzate negativamente dalla paura di esserne colpite; stato emotivo alimentato soprattutto dall'enorme esposizione mediatica che ha avuto il terribile periodo di pandemia (Landi *et al.*, 2022).

La depressione è uno dei disturbi psichiatrici più diffusi al mondo caratterizzato da umore basso dato da uno stato di tristezza, perdita di interesse nelle attività quotidiane, affaticamento con riduzione della capacità di pensare o concentrarsi, sentimenti di inutilità o colpa, pensieri suicidi o legati alla morte e disturbi legati al sonno e all'appetito (Shafiee *et al.*, 2018).

L'origine precisa della depressione non è nota, ma generalmente si pensa a una sinergia di fattori ambientali e fattori genetici. Dunque, l'insorgenza e lo sviluppo di questo disturbo vengono attribuiti a fattori di stress ambientali, quali maltrattamenti soprattutto infantili, conflitti interpersonali, traumi o comorbilità con altre malattie.

Dall'altro canto, i meccanismi a livello biologico non sono ancora determinati in modo chiaro, ma si pensa che un cambiamento epigenetico di un certo numero di geni dovuto a fattori di stress, possa alterare sistemi biologici e portare allo sviluppo di sintomi depressivi. I risultati indicano che i geni coinvolti nello sviluppo della depressione sono quelli della trasmissione serotoninergica e della neurotrofina (Park *et al.*, 2019).

L'intervento psichiatrico e psicoterapeutico professionale è fortemente consigliato ma alcuni pazienti tendono ad essere riluttanti a ricevere aiuto e dunque trattamenti di supporto e cura psicologica. I trattamenti farmacologici esistenti sono di diverso tipo e includono formulazioni quali antidepressivi triciclici, inibitori delle monoamminossidasi, inibitori della ricaptazione della serotonina e della serotonina-noradrenalina. Queste sostanze possono essere favorevoli se prescritte in modo adeguato, ma comportano con sé anche una serie di effetti collaterali indesiderati riguardanti principalmente problematiche sessuali e gastrointestinali, perdita di appetito, ansia e possibile sindrome da sospensione (Musazadeh *et al.*, 2022) (Abbaszade-Cheragheali *et al.*, 2022).

Per queste ultime motivazioni, per pazienti che presentano bassa tollerabilità o non rispondono agli antidepressivi, o per la presenza di depressione lieve, si è riscontrata la necessità di vagliare altri approcci terapeutici innovativi che possano dare effetti desiderati ma con minore tossicità (Musazadeh *et al.*, 2022) (Korczak *et al.*, 2023).

L'utilizzo di prodotti naturali come terapie alternative nel trattamento dei disturbi psichiatrici è stato consolidato nell'ultimo decennio, supportato anche dai numerosi risultati farmacologici e studi clinici che confermano pienamente la presenza di effetti simili agli antidepressivi sintetici. Tuttavia, nella maggior parte dei casi i composti responsabili dell'attività non sono completamente identificati, motivo per il quale si presentano problematiche a livello del processo di standardizzazione del materiale vegetale e di monitoraggio del principio attivo a livello farmacocinetico. Questi fattori sono la causa principale delle discrepanze e di eterogeneità presenti nei risultati degli studi, portando alla tipica problematica di confusione e ambiguità che alleggia sui prodotti naturali (Korczak *et al.*, 2023).

### **3.1.1 Nuovi studi dell'attività antidepressiva**

Abbaszade-Cheragheali *et al.*, 2022 hanno sviluppato uno studio con lo scopo di determinare i potenziali effetti antidepressivi della crocina su modelli animali

sottoposti a stress cronico lieve (UCMS), un protocollo convalidato di induzione della depressione.

In questo studio, sono stati utilizzati sessanta ratti Wistar maschi adulti dal peso di 200-250 g e forniti da Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences. Sono stati divisi in sei gruppi da dieci animali ciascuno, tra cui un veicolo e cinque sperimentali. I gruppi erano i seguenti:

- Veicolo: 1 ml/kg di sonda gastrica salina normale al giorno durante il protocollo alle 7 del mattino;
- Cr30mg: 30 mg/kg di crocina;
- UCMS: solo procedura UCMS, 1 ml/kg di sonda gastrica salina normale al giorno durante il protocollo alle 7 del mattino;
- UCMS -Cr10mg: UCMS + 10 mg/kg crocina;
- UCMS -Cr20mg: UCMS + 20 mg/kg crocina;
- UCMS -Cr30mg: UCMS + 30 mg/kg crocina.

Quattro gruppi sono stati sottoposti a UCMS. Durante la procedura, i ratti sono stati pretrattati con crocina, acquistata dal Testa Quality Control Laboratory, Mashhad, Iran e somministrata tramite sonda gastrica durante il protocollo alle 7 del mattino.

Per un totale di quattro settimane, UCMS comprendeva inclinazione della gabbia a 45 ° per 24 ore, lettiera umida per 24 ore, nuoto in acqua fredda a 4 ° C per 5 minuti, nuoto in acqua calda a 45 ° C per 5 minuti, accoppiamento con un altro animale indotto dallo stress per 24 ore, privazione di cibo e acqua separatamente per 24 ore. Successivamente all'applicazione di questo protocollo sono stati eseguiti test comportamentali che comprendevano il campo aperto, il nuoto forzato e i test di labirinto elevato. Alla fine, i ratti sono stati anestetizzati, sacrificati e i tessuti cerebrali sono stati sottoposti a test biochimici.

I risultati di questo test hanno riscontrato che il modello UCMS ha portato all'insorgenza di depressione e ansia nei ratti.

Grazie a questo studio si è visto che nei ratti esposti a UCMS, i livelli sierici di corticosterone, malondialdeide corticale (MDA), fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleuchina-6 (IL-6) sono aumentati, mentre sono diminuiti quelli di interleuchina-10 (IL-10), superossido dismutasi (SOD), catalasi (CAT) e tiolo. Inoltre, si ha avuto anche una riduzione del livello del fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF) nei tessuti corticali.

Dunque, l'applicazione del protocollo UCMS ha portato a iperattività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, stress ossidativo e neuroinfiammazione: un'associazione di fattori biologici descritta come la causa della patogenesi di ansia e depressione. L'aspetto positivo dello studio è stato dato dal pretrattamento con crocina che ha dimostrato la sua capacità di far fronte agli effetti negativi dell'UCMS a livello di tutti i parametri sopra indicati, invertendoli e di conseguenza migliorando anche i risultati dei test comportamentali. In conclusione, la crocina e i suoi possibili meccanismi nel modulare e ripristinare i livelli biologici normali di sostanze implicate nel stress ossidativo, nell'infiammazione cerebrale e ridurre i livelli di corticosterone, possono essere utilizzati nel trattamento della depressione e dell'ansia causate dallo stress cronico.

Uno studio più recente condotto da Chen *et al.*, 2023, della durata di 28 giorni, ha avuto lo scopo di studiare l'effetto antidepressivo e il meccanismo dell'olio essenziale di zafferano (SEO) nei topi esposti a stress lieve cronico imprevedibile (CUMS).

La ragione dietro a questo studio risiede nell'aromaterapia: una terapia alternativa focalizzata sull'utilizzo degli oli essenziali come regolatori delle funzioni cerebrali ed emozionali attraverso la stimolazione dei nervi olfattivi. Le piccole molecole lipofile presenti negli oli essenziali hanno la capacità di attraversare la barriera ematoencefalica e modulare a livello biologico i sintomi della depressione.

Nello studio sono stati utilizzati topi maschi adulti specifici privi di agenti patogeni dal peso di circa 25 g forniti da Hangzhou Pasio Biotechnology Co., Ltd., Hangzhou (Cina).

Sono stati suddivisi in sette gruppi per otto componenti ciascuno.

I gruppi erano:

- gruppo di controllo: acqua, soluzione salina dose 0.1mL/10g;
- gruppo CUMS: protocollo CUMS, acqua, soluzione salina dose 0.1mL/10g;
- gruppo di controllo positivo: protocollo CUMS, acqua, fluoxetina dose 0.1mL/10g;
- 2% SEO: protocollo CUMS, SEO 100 µL, soluzione salina dose 0.1mL/10g;
- 4% SEO: protocollo CUMS, SEO 100 µL, soluzione salina dose 0.1mL/10g;
- 6% SEO: protocollo CUMS, SEO 100 µL, soluzione salina dose 0.1mL/10g;
- gruppo solvente: protocollo CUMS, olio di cocco frazionato, soluzione salina dose 0.1mL/10g.

La somministrazione per inalazione di SEO, acqua o olio di cocco frazionato è avvenuta due volte al giorno per 4 ore ciascuna, ed è iniziata l'ottavo giorno, una settimana dopo a un'alimentazione adattiva, mentre la fluoxetina e la soluzione salina sono state somministrate attraverso sonda gastrica a mezzogiorno.

Tranne il gruppo di controllo, tutti gli altri gruppi sono stati sottoposti a stress lieve cronico imprevedibile, protocollo che comprendeva fattori stressogeni come digiuno (12 ore), assenza di acqua (12 ore), lettiera bagnata (24 ore), gabbia inclinata a 45° (24 ore), nuoto in acqua a 5 °C (3 min), nuoto in acqua a 40 °C (3 min), taglio della coda (2 min), illuminazione notturna, scuotimento della gabbia (20 min), contenzione cronica (6 ore) e sovraffollamento (24 ore).

L'olio essenziale di zafferano è stato acquistato dalla Yujing Ningzhi Biotechnology Co., Ltd. (Pechino, Cina) e diluito con olio di cocco frazionato (Poli Aromatic Medicine Technology Co., Ltd., Shanghai, Cina).

I composti chimici della SEO sono stati identificati tramite gascromatografia-spettrometria di massa, e comprendevano composti aromatici quali alcoli (63,23%), terpenoidi (12,64%), esteri (10,15%) e aldeidi (0,53%). Inoltre, sono stati definiti i principali composti potenzialmente bioattivi nell'attività antidepressiva, i quali risultavano essere alcol feniletileico, safranale, cinnamato di benzile, farnesol, elemicina, cinnamil cinnamato e beta-pinene.

Per misurare gli effetti antidepressivi e neuroprotettivi esercitati da SEO si sono attuati diversi tipi di test, tra cui quelli comportamentali, di valutazione sierologica dei livelli di dopamina (DA), 5-serotonina (5-HT), BDNF e di acido  $\gamma$ -aminobutirrico (GABA), di istopatologia e di analisi Western blot per la valutazione proteica nell'ippocampo.

I risultati dello studio hanno riscontrato che la via di segnalazione MAPK-CREB1-BDNF risulta essere quella di competenza del SEO per poter svolgere il suo effetto antidepressivo. Questa via è importantissima in quanto svolge la funzione essenziale di sopravvivenza, differenziazione, sviluppo e plasticità sinaptica delle cellule neuronali. Si è visto che nei modelli animali sottoposti a CUMS, l'attività di questa via e tutte le relative molecole che la compongono risultavano diminuite in modo significativo, risultato coerente con studi precedenti e conferma ulteriore che questa via risulta essere strettamente correlata alla depressione. Infatti, i topi sottoposti al protocollo hanno mostrato la presenza di sintomi simil depressivi, confermati anche dai test comportamentali e dall'esame istopatologico che dimostrava la presenza di danni ai nervi dell'ippocampo.



L'utilizzo di SEO ha ridotto i sintomi depressivi comportamentali e ha riparato il danno ai neuroni dell'ippocampo, agendo positivamente sulla via di segnalazione MAPK-CREB1-BDNF e ha invertito la diminuzione di 5-HT, DA, GABA e BDNF nel siero.

La miglior efficacia antidepressiva è stata osservata nel 4% di SEO.

### **3.2 Morbo di Alzheimer**

Il morbo di Alzheimer (AD) è una malattia neurodegenerativa e la forma più comune di demenza nelle persone di età superiore ai 65 anni. Questo disturbo porta a un progressivo e irreversibile deterioramento delle capacità cognitive e della memoria, associato a un graduale declino del funzionamento intellettuale e mentale con continui cambiamenti nella personalità e nel comportamento.

I meccanismi che portano allo sviluppo di questa malattia non sono ancora del tutto definiti, ma prendono in causa molteplici fattori tra cui l'avanzamento d'età, predisposizione genetica, stress ossidativo e ambientale, infiammazione, lesioni traumatiche alla testa, depressione o ipertensione.

A livello biologico, l'AD è rappresentato dalla formazione di numerose placche amiloidi extracellulari, chiamate anche placche senili presenti nei vasi sanguigni e nella superficie esterna dei neuroni del cervello. Queste placche sono costituite dall'accumulo anomalo del peptide beta-amiloide (A $\beta$ ), ottenuto dalla proteolisi della proteina precursore dell'amiloide (APP), molecola presente nel cervello e nei tessuti periferici. Inoltre, nei soggetti con AD, si hanno la presenza di grovigli neurofibrillari, dovuti a un'iperfosforilazione anomala delle proteine Tau, un gruppo di proteine strutturali con funzioni fisiologiche soprattutto a livello dei microtubuli. L'associazione di questi due fattori extra- e intracellulari è la causa del danneggiamento delle cellule cerebrali sane, portandole alla morte e dunque a una progressiva neurodegenerazione.

Attualmente non esiste una cura per l'AD. Esistono dei farmaci per il trattamento dei sintomi, divisi in inibitori della colinesterasi, tra cui troviamo il donepezil, rivastigmina, galantamina e tacrina, e l'antagonista del recettore metil-D-aspartato (NMDA) chiamato memantina. I primi hanno azione nell'aumentare la disponibilità di acetilcolina nel cervello, in quanto la progressione della malattia porta sempre meno alla produzione di acetilcolina, importante neurotrasmettitore degli impulsi nervosi. La seconda tipologia di farmaco blocca il recettore NMDA del neurotrasmettitore del glutammato, in quanto un'eccessiva attività di questo

recettore causa eccitotossicità, cioè un effetto tossico dovuto a un'alta esposizione al glutammato che può portare alla morte cellulare (*eccitotossicità in 'Enciclopedia della Scienza e della Tecnica'*).

Gli inibitori della colinesterasi vengono utilizzati in pazienti con AD da lieve a moderato, mentre gli antagonisti NMDA sono prescritti in caso di AD da moderato a grave. Questi due farmaci possono essere anche associati in una terapia di combinazione in quanto svolgono funzioni diverse.

L'utilizzo di questi farmaci ha un'efficacia modesta nel ritardare il processo neurodegenerativo, ma comportano anche a numerosi effetti collaterali. È per questo che la ricerca si è focalizzata nello sviluppare nuovi farmaci più sicuri e pratici, ma anche nel vagliare nuovi approcci terapeutici alternativi per la prevenzione e il trattamento dell'AD. La fitoterapia può essere un trattamento nuovo e complementare, e tra le varie piante prese in considerazione per le malattie neurodegenerative troviamo lo zafferano e i suoi costituenti (Finley and Gao, 2017) (Saeedi and Rashidy-Pour, 2021).

### **3.2.1 Nuovi studi dell'effetto neuroprotettivo nell'Alzheimer**

Uno studio condotto da Baluchnejadmojarad, Mohamadi-Zarch and Roghani, 2019 ha avuto come scopo quello di valutare un possibile effetto benefico del safranale sui deficit cognitivi presenti su un modello animale affetto da AD.

Per questo studio, della durata di 21 giorni e un periodo di adattamento di una settimana, sono stati utilizzati sessantasei ratti maschi Wistar (Istituto Pasteur, Teheran) dal peso di 210-260 g. Si sono distribuiti in sei gruppi come segue:

- placebo;
- placebo trattati con safranale (dose 0,2 mL/Kg);
- beta-amiloide;
- beta-amiloide trattati con safranale (dose 0,025 mL/Kg);
- beta-amiloide trattati con safranale (dose 0,1 mL/Kg);
- beta-amiloide trattati con safranale (dose 0,2 mL/Kg).

Per i gruppi affetti da AD, sono stati iniettati 2  $\mu$ L di amiloide  $\beta_{1-40}$  a livello intraippocampale.

Il safranale è stato somministrato per via orale attraverso sonda gastrica, un'ora dopo all'iniezione di amiloide  $\beta_{1-40}$ , una volta al giorno per la durata di una settimana.

Alla terza settimana, dopo l'intervento con amiloide  $\beta_{1-40}$ , sono stati condotti test comportamentali, tra i quali troviamo il labirinto a Y, l'evitamento passivo, la

discriminazione di nuovi oggetti e il labirinto del braccio radiale. Alla fine della terza settimana, i ratti sono stati anestetizzati e sacrificati per attuare test biochimici e istologici.

In accordo con altri studi, l'iniezione di amiloide  $\beta_{1-40}$  intraippocampale comporta a deficit nei processi di apprendimento e memoria, verificati grazie ai test comportamentali. Questi ultimi hanno riscontrato che l'assunzione orale di safranale alle dosi di 0,2 mL/Kg nei ratti dopo l'iniezione, era significativamente valida nel mitigare i deficit cognitivi rispetto ai ratti beta-amiloide<sub>1-40</sub>.

Inoltre, in questo studio sono stati valutati i biomarcatori dello stress ossidativo, in quanto quest'ultimo risulta essere incrementato e inappropriato durante la progressione di AD. Infatti, si è riscontrato che il gruppo beta-amiloide aveva un livello significativamente più alto di malondialdeide corticale (MDA) e una diminuzione significativa di catalasi (CAT), superossido dismutasi (SOD) e glutazione (GSH). I ratti beta-amiloidi trattati con safranale 0,2 mL/Kg presentavano il maggior miglioramento dello stress ossidativo rispetto a quelli beta-amiloidi.

Sono stati verificati anche i biomarcatori dell'infiammazione comprendenti IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  e NF- $\kappa$ B. Questi marcatori si presentavano a livelli elevati dopo l'iniezione di beta-amiloide<sub>1-40</sub>, indice di infiammazione nel cervello, tipica nelle malattie neurodegenerative come l'AD, dovuta al rilascio di citochine proinfiammatorie con conseguente danno neuronale. Anche in questo caso i ratti beta-amiloidi trattati con 0,2 mL/Kg presentavano valori migliori nell'infiammazione rispetto al gruppo beta-amiloide.

Si è inoltre riscontrato che l'attività dell'acetilcolinesterasi (AChE) nell'ippocampo era elevata nel gruppo beta-amiloide, indicazione di disfunzione colinergica centrale che può giocare un ruolo fondamentale nella patogenesi dell'AD. Il safranale 0,2 mL/Kg somministrato ai ratti beta-amiloidi ha riscontrato un'inversione significativa di questo parametro inappropriato.

In conclusione, lo studio ha riportato che il trattamento con safranale di ratti beta-amiloidei potrebbe prevenire il declino dell'apprendimento e della memoria grazie all'attività neuroprotettiva attraverso diverse vie molecolari e quindi poter venir considerato come un supplemento terapeutico per rallentare lo sviluppo di malattie neurodegenerative come l'Alzheimer.

Uno studio recente condotto da Rasi Marzabadi *et al.*, 2022 ha valutato i possibili effetti dello zafferano a livello cognitivo e sui marcatori biologici nei pazienti affetti da AD lieve e moderata.

È uno studio clinico randomizzato in doppio cieco con un totale di 82 pazienti, dove 22 di essi sono stati esclusi dal campione. I 60 pazienti arruolati sono stati suddivisi in due gruppi da 30 ciascuno, in cui 3 pazienti per ogni gruppo non hanno potuto successivamente continuare lo studio. I gruppi erano suddivisi in:

- gruppo di intervento: donepezil 10 mg + capsula di estratto etanolic di zafferano 15 mg/due volte al giorno;
- gruppo di controllo: donepezil 10 mg + placebo due volte al giorno.

La somministrazione ha avuto una durata di 12 settimane. Ogni capsula di zafferano (Saffrotin ®, Impiran, Teheran, Iran) conteneva 1,65-1,75 mg di crocina, e risultava indistinguibile dal placebo per rivestimento, forma, dimensione, odore, consistenza e colore.

I risultati hanno riscontrato che la supplementazione di zafferano non dava effetti positivi a livello cognitivo globale nei pazienti con AD trattati con donepezil. L'aspetto positivo dell'integrazione di zafferano si esplicava con la capacità di ridurre significativamente IL-1 $\beta$  e MDA, e con aumento della capacità antiossidante totale nel siero (TAC) al contrario del placebo.

La problematica dello studio, a confronto con studi precedenti, è data dal fattore tempo. A causa del breve periodo, associato alle dimensioni piccole del campione, all'alto tasso di abbandono e alla probabile necessità di utilizzare regimi più consistenti di zafferano, non si sono potuti identificare e valutare cambiamenti cognitivi positivi sulla memoria.

Tuttavia, la somministrazione di zafferano ha dato effetti positivi verso lo stress ossidativo e sul profilo infiammatorio su pazienti presentanti AD trattati con donepezil e zafferano rispetto a quelli con somministrazione di donepezil e placebo.

# Capitolo 4

## Conclusione

Molti studi indicano che *C. sativus* e i suoi principali costituenti sono attivi contro lo stress ossidativo e la neuroinfiammazione: due situazioni coinvolte nella patogenesi e nei percorsi biochimici di disturbi psichiatrici e neurodegenerativi, come la depressione e il morbo di Alzheimer.

In letteratura scientifica sono presenti numerose prove precliniche e cliniche che ne dimostrano l'attività favorevole a livello neuronale, portando questa pianta a confermare un valore aggiunto a quelli già presenti tradizionalmente e candidandola ulteriormente come oggetto d'attenzione per studi futuri.

La ricerca futura dovrebbe essere diretta nel condurre studi specifici riguardanti la farmacocinetica e la farmacodinamica delle molecole bioattive dello zafferano, così da fare chiarezza sulle lacune dei meccanismi d'azione e da poter utilizzare a pieno e consapevolmente lo zafferano come supporto e aiuto nella salute umana. Oltretutto, la supplementazione nei diversi disturbi dovrebbe essere sostenuta da studi più mirati nel valutare il potenziale nella prevenzione, nella monoterapia e nella sinergia con altre sostanze come farmaci e prodotti naturali. È necessario intraprendere ricerche più dettagliate sul dosaggio, sui metodi di somministrazione, su campioni più ampi e tempi di somministrazione più lunghi. Un altro punto importante per questi nuovi approcci preventivi e terapeutici è quello di andare a sviluppare strategie nel miglioramento della promozione dell'accesso al sistema nervoso centrale dagli agenti neuroprotettivi a base di sostanze naturali, lavorando sulla biodisponibilità con l'impiego ad esempio di nanotecnologie, che potrebbero potenzialmente favorire l'efficacia clinica e la risposta terapeutica.

# Bibliografia

Abbaszade-Cheragheali, A. *et al.* (2022) 'Crocine, the main active saffron (*Crocus sativus* L.) constituent, as a potential candidate to prevent anxiety and depressive-like behaviors induced by unpredictable chronic mild stress', *Neuroscience Letters*, 791, p. 136912. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2022.136912>.

Almodóvar, P. *et al.* (2020) 'Bioaccessibility and Pharmacokinetics of a Commercial Saffron (*Crocus sativus* L.) Extract', *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020, p. e1575730. Available at: <https://doi.org/10.1155/2020/1575730>.

Asai, A. *et al.* (2005) 'Orally Administered Crocetin and Crocins Are Absorbed into Blood Plasma as Crocetin and Its Glucuronide Conjugates in Mice', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(18), pp. 7302–7306. Available at: <https://doi.org/10.1021/jf0509355>.

Baluchnejadmojarad, T., Mohamadi-Zarch, S.-M. and Roghani, M. (2019) 'Safranal, an active ingredient of saffron, attenuates cognitive deficits in amyloid  $\beta$ -induced rat model of Alzheimer's disease: underlying mechanisms', *Metabolic Brain Disease*, 34(6), pp. 1747–1759. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11011-019-00481-6>.

Bian, Y., Zhao, C. and Lee, S.M.-Y. (2020) 'Neuroprotective Potency of Saffron Against Neuropsychiatric Diseases, Neurodegenerative Diseases, and Other Brain Disorders: From Bench to Bedside', *Frontiers in Pharmacology*, 11. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2020.579052> (Accessed: 4 February 2023).

Cardone, L. *et al.* (2020) 'Saffron (*Crocus sativus* L.), the king of spices: An overview', *Scientia Horticulturae*, 272, p. 109560. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109560>.

Chen, Z. *et al.* (2023) 'Saffron essential oil ameliorates CUMS-induced depression-like behavior in mice via the MAPK-CREB1-BDNF signaling pathway', *Journal of Ethnopharmacology*, 300, p. 115719. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115719>.

*Crocus sativus* L. - colt. - *Forum Acta Plantarum* (no date). Available at: <https://www.actaplantarum.org/forum/viewtopic.php?t=116787&p=720176#p720176> (Accessed: 1 February 2023).

*eccitotossicità* in 'Enciclopedia della Scienza e della Tecnica' (no date). Available at: [https://www.treccani.it/enciclopedia/eccitotossicita\\_\(Enciclopedia-della-Scienza-e-della-Tecnica\)](https://www.treccani.it/enciclopedia/eccitotossicita_(Enciclopedia-della-Scienza-e-della-Tecnica)) (Accessed: 11 February 2023).

*Erbario UniMi* (no date). Available at: [https://erbario.lim.di.unimi.it/tavole\\_parietali\\_elenco.php?id\\_specie=13078&nome=Crocus%20sativus](https://erbario.lim.di.unimi.it/tavole_parietali_elenco.php?id_specie=13078&nome=Crocus%20sativus) (Accessed: 1 February 2023).

- Finley, J.W. and Gao, S. (2017) ‘A Perspective on *Crocus sativus* L. (Saffron) Constituent Crocin: A Potent Water-Soluble Antioxidant and Potential Therapy for Alzheimer’s Disease’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(5), pp. 1005–1020. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04398>.
- Gresta, F. *et al.* (2008) ‘Effect of mother corm dimension and sowing time on stigma yield, daughter corms and qualitative aspects of saffron (*Crocus sativus* L.) in a Mediterranean environment’, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(7), pp. 1144–1150. Available at: <https://doi.org/10.1002/jsfa.3177>.
- Hosseinzadeh, H. *et al.* (2013) ‘Acute and Subacute Toxicity of Safranal, a Constituent of Saffron, in Mice and Rats’, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 12(1), pp. 93–99.
- Koocheki, A. and Seyyedi, S.-M. (2020) ‘Chapter 7 - Saffron “seed”, the corm’, in A. Koocheki and M. Khajeh-Hosseini (eds) *Saffron*. Woodhead Publishing (Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition), pp. 93–118. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818638-1.00007-1>.
- Korczak, M. *et al.* (2023) ‘Phytotherapy of mood disorders in the light of microbiota-gut-brain axis.’, *Phytomedicine*, 111, p. 154642. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2023.154642>.
- Kothari, D., Thakur, R. and Kumar, R. (2021) ‘Saffron (*Crocus sativus* L.): gold of the spices—a comprehensive review’, *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 62(5), pp. 661–677. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13580-021-00349-8>.
- Landi, G. *et al.* (2022) ‘The trajectories of anxiety and depression during the COVID-19 pandemic and the protective role of psychological flexibility: A four-wave longitudinal study’, *Journal of Affective Disorders*, 307, pp. 69–78. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2022.03.067>.
- Lautenschläger, M. *et al.* (2015) ‘Intestinal formation of trans-crocetin from saffron extract (*Crocus sativus* L.) and in vitro permeation through intestinal and blood brain barrier’, *Phytomedicine*, 22(1), pp. 36–44. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.10.009>.
- Mansotra, R. and Vakhlu, J. (2022) ‘*Crocus Sativus* Saffron: A 360-Degree Overview’, in J. Vakhlu *et al.* (eds) *The Saffron Genome*. Cham: Springer International Publishing (di libri Compendium of Plant Genomes), pp. 3–25. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-3-031-10000-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-031-10000-0_1).
- Mehri, S., Razavi, B.-M. and Hosseinzadeh, H. (2020) ‘Chapter 34 - Safety and toxicity of saffron’, in A. Koocheki and M. Khajeh-Hosseini (eds) *Saffron*. Woodhead Publishing (Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition), pp. 517–530. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818638-1.00035-6>.
- Melnyk, J.P., Wang, S. and Marcone, M.F. (2010) ‘Chemical and biological properties of the world’s most expensive spice: Saffron’, *Food Research International*, 43(8), pp. 1981–1989. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.07.033>.

- Miller, T.L. *et al.* (1982) 'Binding of Crocetin to Plasma Albumin', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71(2), pp. 173–177. Available at: <https://doi.org/10.1002/jps.2600710209>.
- Modagheh, M.-H. *et al.* (2008) 'Safety evaluation of saffron (*Crocus sativus*) tablets in healthy volunteers', *Phytomedicine*, 15(12), pp. 1032–1037. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.06.003>.
- Moratalla-López, N. *et al.* (2019) 'Bioactivity and Bioavailability of the Major Metabolites of *Crocus sativus* L. Flower', *Molecules*, 24(15), p. 2827. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules24152827>.
- Musazadeh, V. *et al.* (2022) 'Saffron, as an adjunct therapy, contributes to relieve depression symptoms: An umbrella meta-analysis', *Pharmacological Research*, 175, p. 105963. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105963>.
- Mzabri, I., Addi, M. and Berrichi, A. (2019) 'Traditional and Modern Uses of Saffron (*Crocus Sativus*)', *Cosmetics*, 6(4), p. 63. Available at: <https://doi.org/10.3390/cosmetics6040063>.
- Nemati, Z. *et al.* (2018) 'Phylogeny of the saffron-crocus species group, *Crocus* series *Crocus* (Iridaceae)', *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 127, pp. 891–897. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.06.036>.
- Nemati, Z. *et al.* (2019) 'Saffron (*Crocus sativus*) is an autotriploid that evolved in Attica (Greece) from wild *Crocus cartwrightianus*', *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 136, pp. 14–20. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.03.022>.
- Park, C. *et al.* (2019) 'Stress, epigenetics and depression: A systematic review', *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 102, pp. 139–152. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.04.010>.
- Pitsikas, N. (2016) 'Constituents of Saffron (*Crocus sativus* L.) as Potential Candidates for the Treatment of Anxiety Disorders and Schizophrenia', *Molecules*, 21(3), p. 303. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules21030303>.
- poliploidia nell'Enciclopedia Treccani* (no date). Available at: <https://www.treccani.it/enciclopedia/poliploidia> (Accessed: 31 January 2023).
- Rashed-Mohassel, M.-H. (2020) 'Chapter 4 - Evolution and botany of saffron (*Crocus sativus* L.) and allied species', in A. Koocheki and M. Khajeh-Hosseini (eds) *Saffron*. Woodhead Publishing (Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition), pp. 37–57. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818638-1.00004-6>.
- Rasi Marzabadi, L. *et al.* (2022) 'Saffron reduces some inflammation and oxidative stress markers in donepezil-treated mild-to-moderate Alzheimer's Disease patients: A randomized double-blind placebo-control trial', *Journal of Herbal Medicine*, 34, p. 100574. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2022.100574>.



- Roshanravan, N. and Ghaffari, S. (2022) ‘The therapeutic potential of *Crocus sativus* Linn.: A comprehensive narrative review of clinical trials’, *Phytotherapy Research*, 36(1), pp. 98–111. Available at: <https://doi.org/10.1002/ptr.7286>.
- Saeedi, M. and Rashidy-Pour, A. (2021) ‘Association between chronic stress and Alzheimer’s disease: Therapeutic effects of Saffron’, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 133, p. 110995. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110995>.
- Salem, A.A. *et al.* (2019) ‘Characterization of human serum albumin’s interactions with safranal and crocin using multi-spectroscopic and molecular docking techniques’, *Biochemistry and Biophysics Reports*, 20, p. 100670. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2019.100670>.
- Seifi, A. and Shayesteh, H. (2020) ‘Chapter 15 - Molecular biology of *Crocus sativus*’, in A. Koocheki and M. Khajeh-Hosseini (eds) *Saffron*. Woodhead Publishing (Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition), pp. 247–258. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818638-1.00015-0>.
- Shafiee, M. *et al.* (2018) ‘Saffron in the treatment of depression, anxiety and other mental disorders: Current evidence and potential mechanisms of action’, *Journal of Affective Disorders*, 227, pp. 330–337. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2017.11.020>.
- Shahnoushi, N. *et al.* (2020) ‘Chapter 21 - Economic analysis of saffron production’, in A. Koocheki and M. Khajeh-Hosseini (eds) *Saffron*. Woodhead Publishing (Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition), pp. 337–356. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818638-1.00021-6>.
- Shakya, R. *et al.* (2020) ‘Effects of Intestinal Microbiota on Pharmacokinetics of Crocin and Crocetin in Male Sprague-Dawley Rats’, *Metabolites*, 10(11), p. 424. Available at: <https://doi.org/10.3390/metabo10110424>.
- Sharma, S. and Kumar, D. (2022) ‘Chemical Composition and Biological Uses of *Crocus sativus* L. (Saffron)’, in M.H. Masoodi and M.U. Rehman (eds) *Edible Plants in Health and Diseases: Volume II : Phytochemical and Pharmacological Properties*. Singapore: Springer, pp. 249–277. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-981-16-4959-2\\_7](https://doi.org/10.1007/978-981-16-4959-2_7).
- Shokrpour, M. (2019) ‘Saffron (*Crocus sativus* L.) Breeding: Opportunities and Challenges’, in J.M. Al-Khayri, S.M. Jain, and D.V. Johnson (eds) *Advances in Plant Breeding Strategies: Industrial and Food Crops: Volume 6*. Cham: Springer International Publishing, pp. 675–706. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-23265-8\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-030-23265-8_17).
- Srivastava, R. *et al.* (2010) ‘*Crocus sativus* L.: A comprehensive review’, *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), pp. 200–208. Available at: <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70919>.

Umigai, N. *et al.* (2011) 'The pharmacokinetic profile of crocetin in healthy adult human volunteers after a single oral administration', *Phytomedicine*, 18(7), pp. 575–578. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.10.019>.

Zhang, Y. *et al.* (2017) 'Sensitive analysis and simultaneous assessment of pharmacokinetic properties of crocin and crocetin after oral administration in rats', *Journal of Chromatography B*, 1044–1045, pp. 1–7. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.12.003>.

Zhang, Y. *et al.* (2019) 'Orally Administered Crocin Protects Against Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury Through the Metabolic Transformation of Crocetin by Gut Microbiota', *Frontiers in Pharmacology*, 10. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2019.00440> (Accessed: 6 February 2023).