

PROGETTO ESPAS

Groupe de Tâche 3: Recherches et analyses pour la définition de Protocols scientifiques d'espèce végétales autochtones à haute valeur nutraceutique et de santé dans la zone de cooperation

Report intermédiaires sur la détermination de la bio-activité des métabolites objet d'étude

- **Activité 3.6.1 Caractérisation in vitro de l'activité des extraits d'espèces végétales**
- **Activité 3.6.2 Evaluation in vitro de la bio-activité des extraits d'espèces végétaux**

PROGETTO ESPAS

Report. Determinazione della bio-attività dei metaboliti oggetto di studio

Personale di ricerca coinvolto:

Dr. Michele Massimo Mammano - Coordinatore Scientifico/Ricercatore CREA DC sede di Bagheria (PA)

Dr. Giancarlo Fascella Ricercatore CREA DC sede di Bagheria (PA)

Dr. Antonio Raffo - Ricercatore CREA AN - Centro di Ricerca Alimenti e Nutrizione

Gruppo di lavoro per le attività 3.6.1 e 3.6.2:

Simonetta Ferruzza

Alberto Finamore

Barbara Guantario

Giulia Ranaldi

Marianna Roselli

Paola Zinno

INDICE

1. Potenziali effetti antimicrobici, studio della tossicità su cellule intestinali e valutazione dell'attività anti-infiammatoria di estratti fenolici di due specie di asparago selvatico: *Asparagus albus* L. e *Asparagus acutifolius* L.
2. Potenziali effetti antimicrobici e studio della tossicità su cellule intestinali di estratti fenolici di bacche di rosa.
3. Potenziali effetti antimicrobici, studio della tossicità e della riduzione dell'adesione di patogeni su cellule intestinali e valutazione dell'attività anti-infiammatoria di oli essenziali di origano

1. Potenziali effetti antimicrobici, studio della tossicità su cellule intestinali e valutazione dell'attività anti-infiammatoria di estratti fenolici di due specie di asparago selvatico: *Asparagus albus* L. e *Asparagus acutifolius* L.

1.1 Studio degli effetti antimicrobici

Background. Le malattie a trasmissione alimentare rappresentano una seria e diffusa minaccia per la salute pubblica a livello mondiale a cui è necessario rispondere con l'adozione di strategie che assicurino la sicurezza degli alimenti e la loro qualità. Alcuni agenti antimicrobici attualmente usati nelle produzioni alimentari per prolungare la *shelf life* e aumentare la sicurezza igienico sanitaria, sono meno efficaci rispetto al passato a causa della comparsa microrganismi resistenti a tali sostanze. Per questa ragione è necessario trovare nuovi antimicrobici che siano efficaci contro i microrganismi resistenti a quelli tradizionali. In risposta a questa necessità, una delle proposte più interessanti è l'impiego di conservanti naturali di origine vegetale. In questa fase dello studio sono state esplorati i potenziali effetti antimicrobici di estratti vegetali da *Asparagus albus* L. e *Asparagus acutifolius* L. nei confronti dei più comuni patogeni e alterativi correlati agli alimenti, con l'obiettivo di impiegare tali estratti in matrici alimentari per assicurarne la sicurezza igienica e la conservabilità senza compromettere le caratteristiche organolettiche e nutrizionali del prodotto.

Metodi. Aliquote di estratti fenolici portati a secco, ottenute dalle due specie di Asparago (in particolare da liofilizzato del primo e dell'ultimo terzo del turione per l'apice e la radice, rispettivamente) sono stati risospesi a 100 mg/ml sia in tampone fosfato salino (PBS) che in una soluzione etanolo:acqua 80/20 v/v e testate per l'attività antimicrobica contro microrganismi indicatori, patogeni e alterativi, appartenenti alla ceppoteca del laboratorio di microbiologia degli alimenti del CREA - centro di ricerca Alimenti e Nutrizione (**Tabella 1**).

Tabella 1. Elenco e temperatura ottimale di crescita dei microrganismi indicatori utilizzati.

| | Microrganismo indicatore | Temperatura ottimale di crescita (°C) |
|------------|--|--|
| Patogeni | <i>Listeria monocytogenes</i> OH | 30 |
| | <i>Listeria monocytogenes</i> SA | 30 |
| | <i>Listeria monocytogenes</i> CAL | 30 |
| | <i>Listeria innocua</i> 1770 | 30 |
| | <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium LT2 | 37 |
| | <i>Salmonella enterica</i> serovar GIVE | 37 |
| | <i>Salmonella enterica</i> serovar Derby | 37 |
| | <i>Escherichia coli</i> enterotossico (ETEC) K88 | 37 |
| Alterativi | <i>Pseudomonas putida</i> WSC358 | 30 |
| | <i>Pseudomonas putida</i> KT2240 | 30 |
| | <i>Pseudomonas fluorescens</i> B13 | 30 |
| | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | 37 |

In particolare, gli estratti sono stati testati mediante il *well-diffusion* test, ovvero, le sostanze vengono aggiunte in piastre Petri, all'interno di pozzetti che attraversano la profondità del terreno agarizzato precedentemente inoculato con il ceppo indicatore ad una concentrazione di 10^6 UFC/ml (Unità Formanti Colonia) e incubati alle temperature ottimali di crescita dei microrganismi. A parità di volume e concentrazione di estratto somministrato, si ottengono aloni di inibizione il cui raggio è correlato all'attività dell'estratto nei confronti del ceppo indicatore, pertanto quanto più l'estratto ha effetto antimicrobico, tanto più è ampia la lunghezza del raggio dell'alone.

Risultati. Come descritto nelle **Tabelle 2 e 3** (per *Asparagus albus* e *acutifolius*, rispettivamente), sia gli estratti risospesi in PBS sia quelli in etanolo non hanno mostrato una significativa attività antibatterica contro nessun microrganismo indicatore. L'apparente maggiore attività degli estratti

risospesi in etanolo dipende in realtà dalla presenza stessa dell'etanolo, essendo il raggio degli aloni di dimensioni uguali a quelli del controllo costituito dalla sola miscela etanolo/acqua.

Tabella 2. Pre-screening dell'attività antimicrobica degli estratti di *Asparagus albus* L.

| Microrganismo indicatore | Raggio dell'alone di inibizione (mm) | | | |
|---|--------------------------------------|--------|------------------------|--------|
| | Sospensione in PBS | | Sospensione in etanolo | |
| | Apice | Radice | Apice | Radice |
| <i>Listeria monocytogenes</i> OH | - | 0 | 0 | 2 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> SA | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> CAL | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Listeria innocua</i> 1770 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium LT2 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| <i>Salmonella enterica</i> serovar Give | 0 | 0 | 1 | 1 |
| <i>Salmonella enterica</i> serovar Derby | 0 | 0 | 1 | 1 |
| <i>Escherichia coli</i> enterotossico (ETEC) K88 | 3 | 0 | 3 | 2 |
| <i>Pseudomonas putida</i> WSC358 | 0 | 0 | 2 | 3 |
| <i>Pseudomonas putida</i> KT2240 | 3 | 0 | 3 | 3 |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> B13 | 2 | 0 | 1 | 1 |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |

L'attività è considerata per tutti non sufficiente, essendo il raggio degli aloni di inibizione sempre inferiore a 5 mm.

Tabella 3. Pre-screening dell'attività antimicrobica degli estratti di *Asparagus acutifolius* L.

| Microrganismo indicatore | Raggio dell'alone di inibizione (mm) | | | |
|---|--------------------------------------|--------|------------------------|--------|
| | Sospensione in PBS | | Sospensione in etanolo | |
| | Apice | Radice | Apice | Radice |
| <i>Listeria monocytogenes</i> OH | 0 | 0 | 2 | 1 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> SA | 0 | 0 | 3 | 2 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> CAL | 0 | 0 | 2 | 1 |
| <i>Listeria innocua</i> 1770 | 0 | 0 | 2 | 3 |
| <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium LT2 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| <i>Salmonella enterica</i> serovar Give | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Salmonella enterica</i> serovar Derby | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Escherichia coli</i> (ETEC) K88 | 0 | 0 | 2 | 1 |
| <i>Pseudomonas putida</i> WSC358 | 0 | 0 | 2 | 1 |
| <i>Pseudomonas putida</i> KT2240 | 0 | 1 | 2 | 2 |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> B13 | 0 | 2 | 2 | 2 |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |

L'attività è considerata per tutti non sufficiente, essendo il raggio degli aloni di inibizione inferiore a 5 mm.

1.2 Studio della tossicità degli estratti di apice delle due specie di asparago sulla linea di cellule intestinali Caco-2

Background. Un altro importante aspetto da considerare in relazione alla sicurezza d'uso degli estratti vegetali è la loro eventuale tossicità per l'uomo, prima di utilizzarli per la conservazione degli alimenti. Infatti, è fondamentale che, alle concentrazioni da impiegare per garantirne l'efficacia antibatterica, non si rilevino effetti tossici. Solitamente queste valutazioni vengono fatte mediante passaggi gradualmente, in cui si parte da studi *in vitro*, per passare poi a studi su animali e infine sull'uomo. In questo studio abbiamo effettuato il primo step, valutando la tossicità degli estratti di apice sulle cellule Caco-2, una linea epiteliale umana derivata da un carcinoma di colon, ampiamente utilizzata come modello di barriera intestinale.

Metodi. Le Caco-2 sono in grado di differenziare in enterociti maturi, ossia cellule polarizzate dell'intestino tenue, dotate di microvilli nella porzione apicale e di giunzioni strette tra cellule adiacenti. A tale scopo le Caco-2 sono state coltivate per gli esperimenti su filtri semipermeabili Transwell, che permettono di mantenere separati il compartimento apicale, corrispondente al *lumen* intestinale, ed il compartimento basolaterale, che corrisponde alla lamina basale. La tossicità degli estratti è stata valutata mediante due diverse misurazioni dell'integrità del monostrato cellulare: la resistenza elettrica transepiteliale (TEER) e il passaggio paracellulare del marcatore rosso fenolo. Un monostrato integro oppone resistenza al passaggio di corrente tra i due compartimenti (valori di TEER elevati, superiori a circa 1300 Ohm x cm²) e non permette il passaggio di rosso fenolo dall'apicale al basolaterale (concentrazioni di rosso fenolo in basolaterale inferiori a 1 x 10⁻⁶ cm x sec⁻¹). La TEER è stata misurata a vari tempi di trattamento con un voltmetro collegato a una coppia di elettrodi, mentre la concentrazione di rosso fenolo è stata misurata nel compartimento basolaterale al tempo finale dell'esperimento per densità ottica, ed espressa come Permeabilità apparente (Papp). Sono stati utilizzati gli estratti dei due campioni di apice di asparago, partendo da una concentrazione iniziale di 100 mg/ml in etanolo:acqua 80/20 v/v e diluendo fino ad arrivare al range 0.1-2 mg/ml, che è stato testato sulle cellule.

Risultati. Le analisi effettuate non hanno mostrato alcuna tossicità dei due campioni di apice di asparago alle concentrazioni saggate, infatti l'andamento delle TEER è rimasto costante fino a 24 h di trattamento sia con apice di *A. albus* (**Figura 1**), che di *A. acutifolius* (**Figura 2**). Inoltre, la

Permeabilità apparente del rosso fenolo, misurata a 24 h, era sempre dell'ordine di 10^{-7} cm x sec⁻¹ in tutti i campioni (**Figura 3**). Benché la Papp relativa al trattamento con etanolo 1.6 % (corrispondente al quantitativo contenuto nella concentrazione 2 mg/ml di estratti) sia risultata più elevata rispetto a quella degli altri trattamenti, tale aumento non era indicativo di un'apertura delle giunzioni, in quanto il valore era comunque ampiamente inferiore rispetto a quello soglia di 1×10^{-6} cm x sec⁻¹.

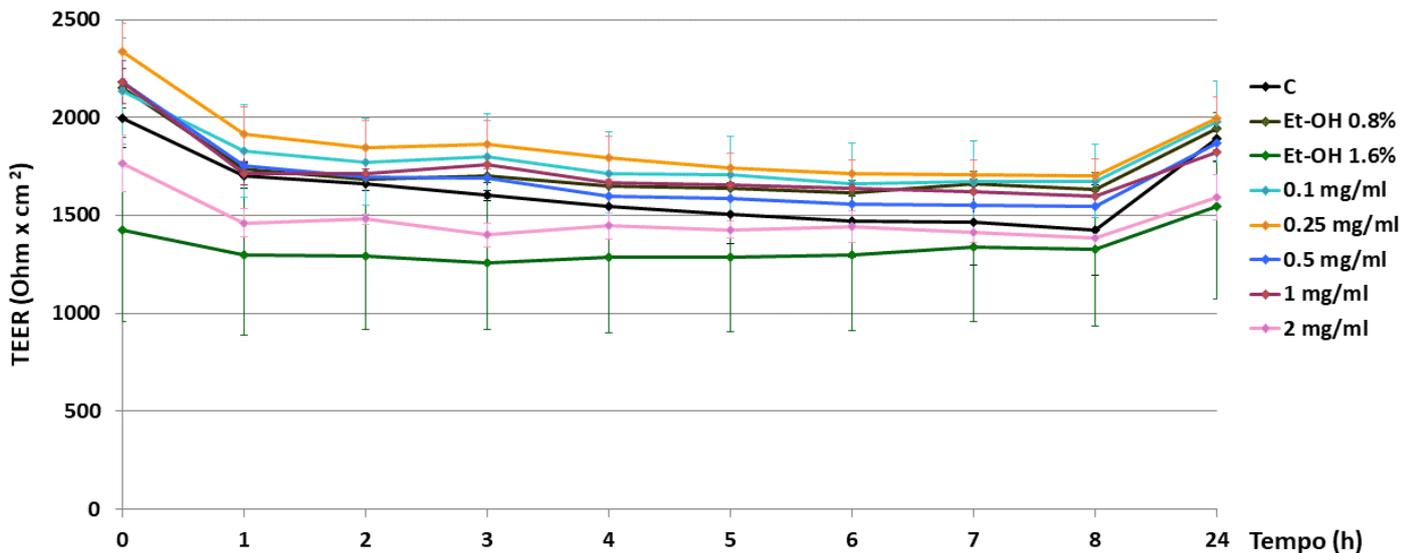


Figura 1. TEER di cellule Caco-2 trattate con diverse concentrazioni (0.1 - 2 mg/ml) di estratto di Apice di *A. albus*, saggiata fino a 24 h. C = controllo non trattato. Sono state valutate anche due concentrazioni di etanolo, equivalenti a quelle contenute nelle due concentrazioni più elevate di estratti (1 e 2 mg/ml).

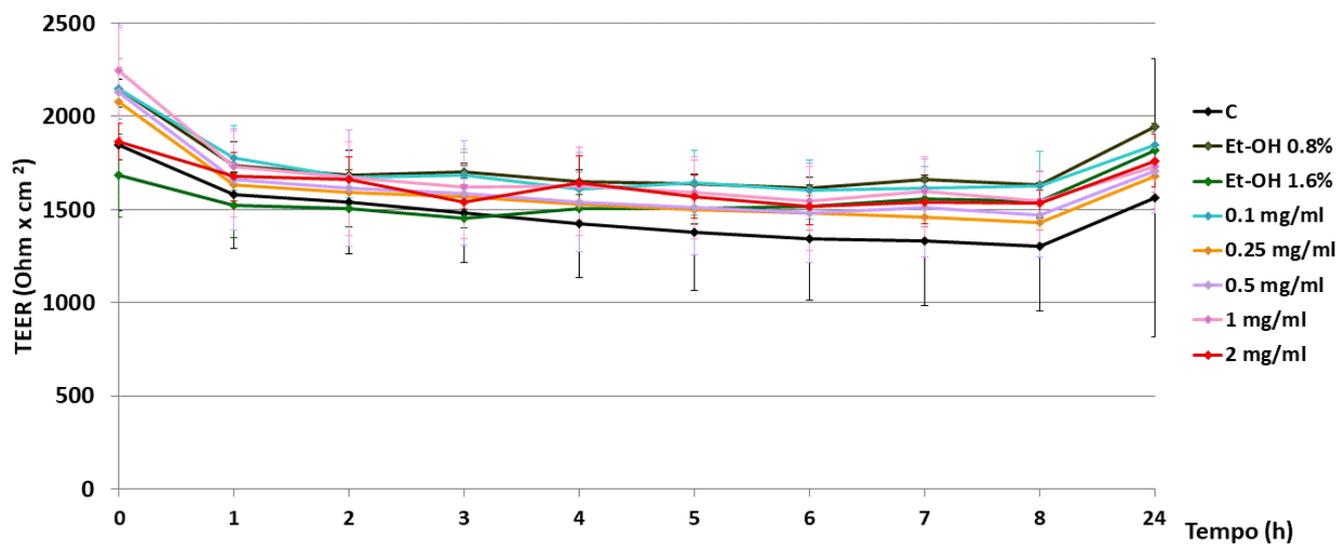


Figura 2. TEER di cellule Caco-2 trattate con diverse concentrazioni (0.1 - 2 mg/ml) di estratto di Apice di *A. acutifolius*, saggiata fino a 24 h. C = controllo non trattato. Sono state valutate anche due concentrazioni di etanolo, equivalenti a quelle contenute nelle due concentrazioni più elevate di estratti (1 e 2 mg/ml).

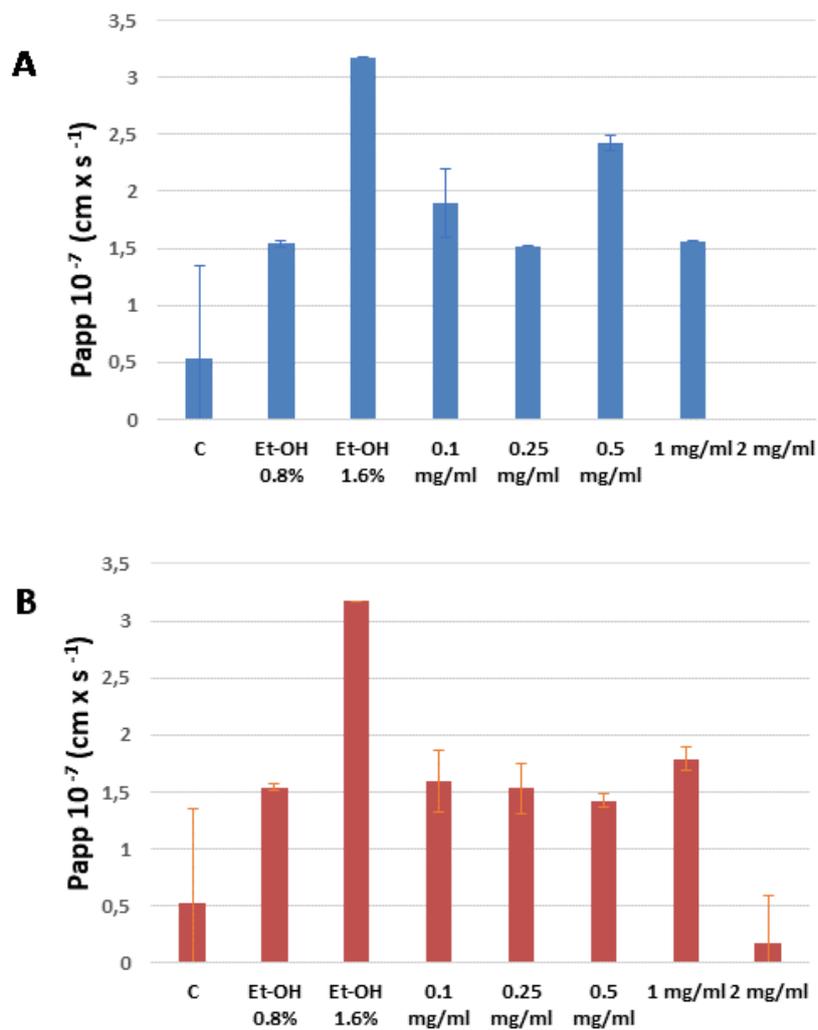


Figura 3. Permeabilità apparente del rosso fenolo in cellule Caco-2 trattate con diverse concentrazioni (0.1 - 2 mg/ml) di estratti di Apice di *A. albus* (Pannello A) e di *A. acutifolius* (Pannello B), saggiata a 24 h. C = controllo non trattato. Sono state valutate anche due concentrazioni di etanolo, equivalenti a quelle contenute nelle due concentrazioni più elevate di estratti (1 e 2 mg/ml).

1.3 Valutazione dell'attività anti-infiammatoria degli estratti di apice delle due specie di asparago in seguito a stimolo con la citochina pro-infiammatoria tumor necrosis factor (TNF)- α .

Background. Per valutare i potenziali effetti benefici degli estratti utilizzati nel presente progetto è stata valutata la loro possibile capacità anti-infiammatoria sulle cellule Caco-2. Le malattie infiammatorie intestinali, quali Colite ulcerosa e Morbo di Chron, sono malattie con eziologia multifattoriale, le cui cause non sono ancora state completamente comprese. Numerose evidenze sembrano però indicare che una dieta ricca di carboidrati, acidi grassi saturi e povera di fibre e verdure possa rappresentare un fattore di rischio per l'insorgenza di queste patologie (Rizzello et al, 2019), mentre l'aderenza alla dieta mediterranea e l'elevato consumo di verdure possono rappresentare una caratteristica protettiva (Grosse et al, 2020). Il modello di mucosa intestinale rappresentato dalle cellule Caco-2 cresciute su filtro può rappresentare un valido strumento per identificare e caratterizzare potenziali matrici alimentari protettive nei confronti dello stress infiammatorio intestinale.

Nel presente studio abbiamo quindi sottoposto le cellule intestinali Caco-2 ad uno stimolo infiammatorio rappresentato dalla citochina pro-infiammatoria Tumor Necrosis Factor (TNF)- α . Questa citochina svolge un ruolo importante nelle malattie infiammatorie intestinali, come evidenziato dai suoi alti livelli in presenza di queste patologie e dall'efficacia di terapie basate sul trattamento con anticorpi anti-TNF- α . Per valutare la potenziale capacità degli estratti di asparago di mitigare la risposta infiammatoria intestinale è stata considerata l'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B, che è un marker di infiammazione. In seguito a stimolazione con TNF- α , infatti, si attiva una cascata chinasi, che culmina con la fosforilazione del fattore di trascrizione NF- κ B, il quale trasloca nel nucleo delle cellule ed attiva una serie di geni target coinvolti nella risposta infiammatoria.

Metodi. Le cellule Caco-2 differenziate su filtro sono state incubate per 16 h in presenza degli estratti di apice di *A. albus* (AP1) e *A. acutifolius* (AP2) alle concentrazioni 1 e 2 mg/ml, aggiunti al compartimento apicale. Tali concentrazioni corrispondevano alle massime testate, che non hanno mostrato tossicità sul monostrato cellulare. Dopo l'incubazione, sono stati controllati i valori delle TEER nelle cellule di controllo e nei trattamenti. Una volta accertata l'integrità del monostrato epiteliale e l'assenza di effetti tossici, le cellule sono state incubate con TNF- α umano nel compartimento basolaterale, ad una concentrazione di 15 ng/ml. Per valutare l'avvenuta

fosforilazione del fattore di trascrizione NF- κ B mediante esperimenti di espressione proteica (Western blot), dopo 1 h di incubazione le cellule sono state raccolte in 300 μ l di buffer di lisi RIPA e conservate a -20°C per la successiva analisi. I livelli di proteina fosforilata sono stati normalizzati rispetto alla forma non fosforilata. L'espressione del gene target inibitore cellulare dell'apoptosi (cIAP)-2, la cui trascrizione è regolata da NF- κ B, è stata invece analizzata dopo 2 ore di incubazione con TNF- α mediante tecniche di real-time PCR. Il gene GAPDH è stato utilizzato come controllo interno. In questi esperimenti le cellule sono state raccolte in 350 μ l di buffer di lisi QIazol (Qiagen) e conservate a -80°C. Per verificare la significatività statistica dei dati mediante l'analisi della varianza, sono state controllate la normalità e l'omogeneità della varianza di tutte le variabili utilizzando il test di Shapiro-Wilk ed il test di Levene, rispettivamente. Nei casi in cui entrambe le condizioni erano verificate, è stata effettuato il one-way ANOVA seguito dal post hoc test di Tukey. Le differenze con valori di $p < 0,05$ sono state considerate significative, e sono indicate nelle figure con lettere diverse. L'analisi statistica è stata effettuata con il software XLSTAT di Excel (Office 2010).

Risultati. La Figura 4 mostra i dati relativi alla fosforilazione della subunità p65 della proteina NF- κ B, analizzata mediante Western blot. I risultati indicano che il TNF- α induceva l'attivazione di NF- κ B, come mostrato dall'incremento della fosforilazione di p65 di circa due volte rispetto al controllo non trattato (C). Il trattamento con i due estratti di apice di asparago (AP1 e AP2, 1 e 2 mg/ml) non induceva un aumento della fosforilazione di p65 rispetto al controllo, suggerendo che tali estratti non causavano infiammazione. Inoltre, i livelli di fosforilazione di p65 nelle cellule trattate con gli estratti e stimulate con TNF- α erano significativamente ridotti rispetto al solo trattamento con TNF- α , ad esclusione del campione AP1 2 mg/ml + TNF- α , nel quale non si osservava tale decremento. **Questo risultato è molto interessante, in quanto suggerisce un'azione anti-infiammatoria degli estratti di apice di asparago nei confronti dello stimolo con TNF- α .**

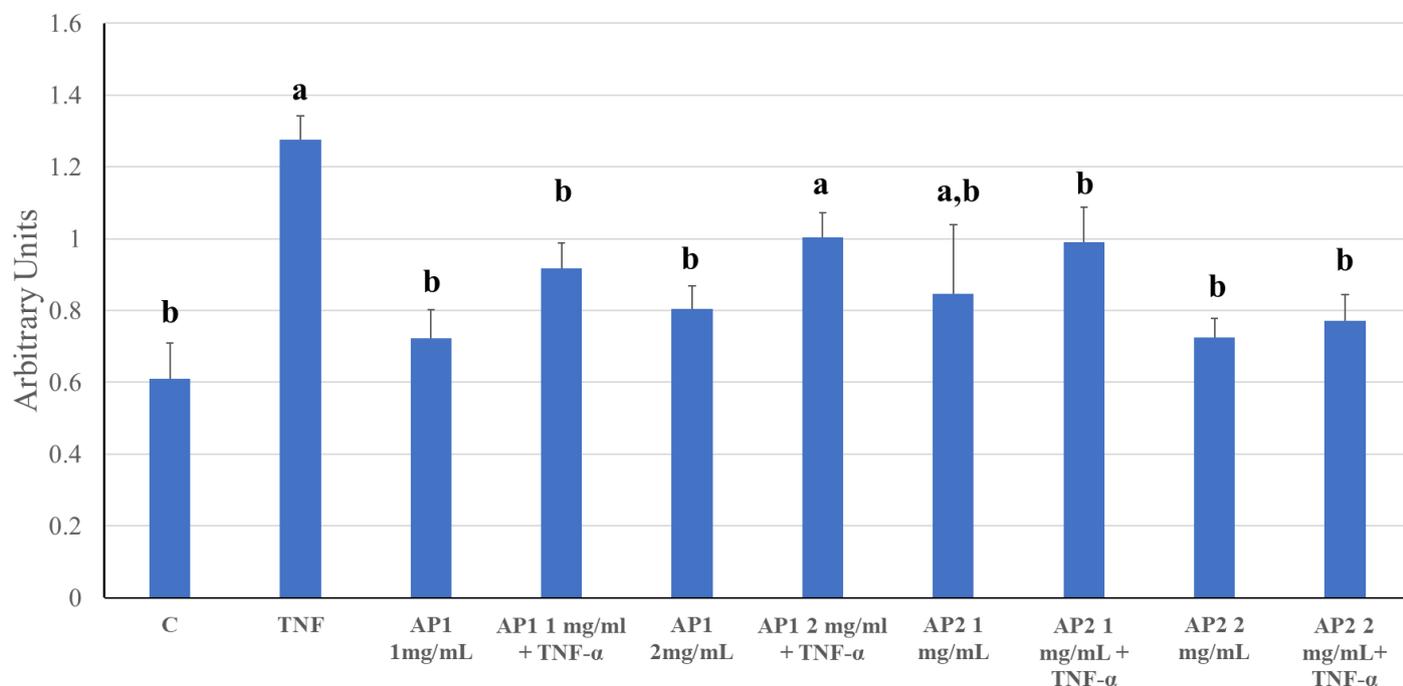


Figura 4. Attivazione di NF-kB attraverso valutazione dello stato di fosforilazione della subunità p65 analizzata mediante Western blot in cellule Caco-2 incubate per 16 h con gli estratti di apice di *A. albus* (AP1) e *A. acutifolius* (AP2) alle concentrazioni 1 e 2 mg/ml, in presenza o meno di TNF- α . C= controllo non trattato. I dati sono espressi come unità arbitrarie date dal rapporto delle densità delle bande ottenute dall'analisi della proteina p65 fosforilata rispetto alla sua forma non fosforilata \pm deviazione standard. Le differenze con valori di $p < 0,05$ sono considerate significative, e sono indicate con lettere diverse.

Per valutare la potenziale azione anti-infiammatoria ad opera degli estratti di apice di *A. albus* (AP1) e *A. acutifolius* (AP2) in seguito a stimolo infiammatorio con TNF- α , è stata analizzata l'espressione genica di cIAP2. Come mostrato in Figura 5, il TNF- α induceva l'espressione del gene target di 3 volte rispetto al controllo non trattato. Gli estratti di apice da soli, ad entrambe le concentrazioni testate, non hanno indotto l'aumento dell'espressione di cIAP2, suggerendo che tali estratti non sono in grado di attivare il pathway di NF-kB. Inoltre non è stato osservato alcun effetto da parte degli estratti nel ridurre l'espressione di cIAP2 in seguito a stimolo infiammatorio, infatti i livelli di espressione genica risultano paragonabili o addirittura superiori (vedi AP2 2 mg/ml + TNF) rispetto a quelli di TNF- α . Dunque i due estratti di apice di asparago non hanno mostrato

effetti nel regolare l'espressione del gene target analizzato, tuttavia è necessario approfondire con ulteriori esperimenti, sia per valutare la loro azione su altri geni coinvolti nel pathway di NF- κ B, sia per spiegare l'apparente discrepanza rilevata nei dati relativi allo stato di fosforilazione della subunità p65 di NF- κ B.

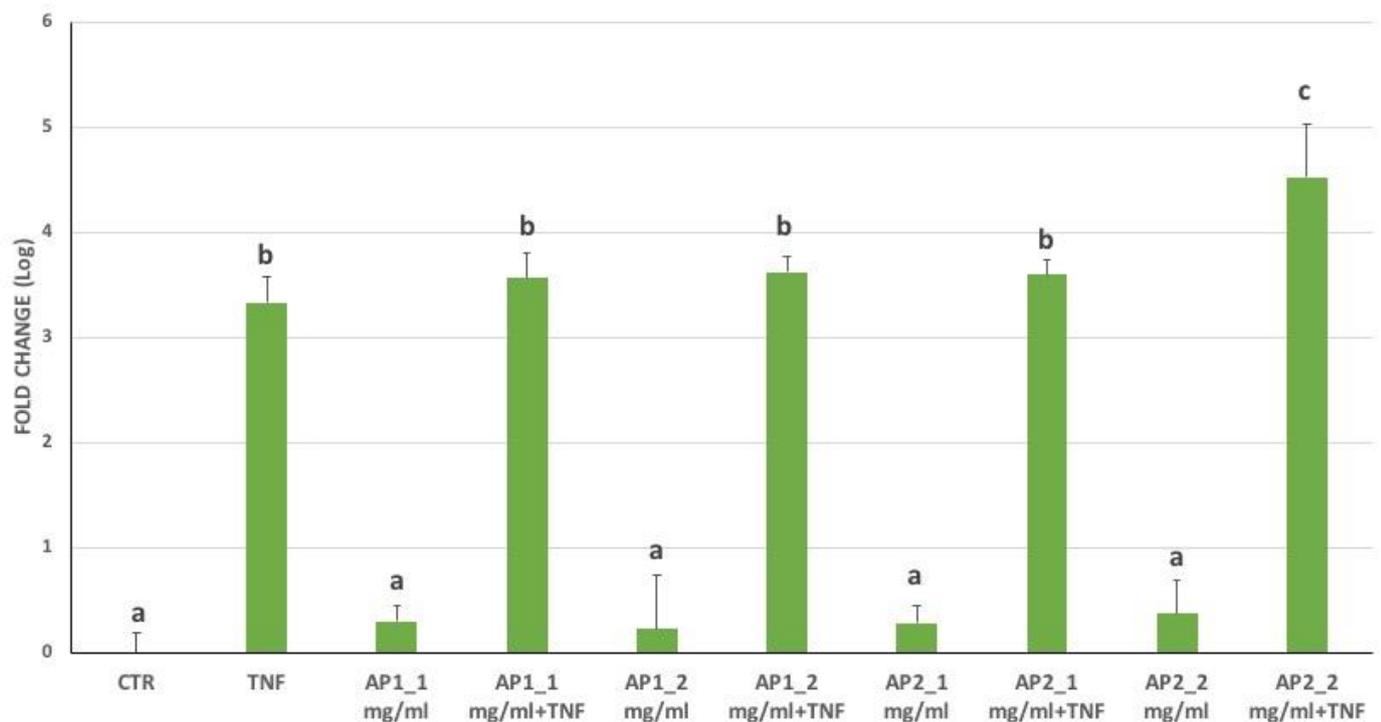


Figura 5. Studio dell'espressione di cIAP2 mediante real-time PCR. Le cellule intestinali Caco-2 sono state trattate 2 h con TNF- α 15 ng/ μ l (TNF) da solo o in presenza degli estratti di apice di *A. albus* (AP1) e *A. acutifolius* (AP2) alle concentrazioni 1 e 2 mg/ml. I dati sono espressi come Fold Change (Log) \pm deviazione standard. Le differenze con valori di $p < 0,05$ sono considerate significative, e sono indicate con lettere diverse.

REFERENZE

Grosse CSJ, Christophersen CT, Devine A, Lawrance IC. The role of a plant-based diet in the pathogenesis, etiology and management of the inflammatory bowel diseases. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2020, 14(3):137-145. doi: 10.1080/17474124.2020.1733413.

Rizzello F, Spisni E, Giovanardi E, et al. Implications of the Westernized Diet in the Onset and Progression of IBD. *Nutrients.* 2019;11(5):1033. doi:10.3390/nu11051033

2. Potenziali effetti antimicrobici e studio della tossicità su cellule intestinali di estratti fenolici di bacche di rosa.

2.1 Studio degli effetti antimicrobici di 5 diverse specie di rosa

Background. Negli ultimi anni, la comunità scientifica ha mostrato un crescente interesse per l'uso di estratti vegetali nelle produzioni alimentari poiché fonti di numerosi composti bioattivi dalle proprietà antiossidanti e antimicrobiche. L'impiego di tali sostanze si configura come una valida strategia alternativa alla abituale aggiunta di additivi che comporta il rischio di insorgenza di antibiotico resistenza. Tra gli estratti di derivazione vegetale quelli provenienti dalle bacche prodotte dalla rosa sono considerati una fonte ricca in antiossidanti e sostanze antibatteriche. Da studi riportati in letteratura emerge che l'effetto antimicrobico degli estratti vegetali è influenzato dalla specie vegetale, dal metodo di coltivazione, dalla sua composizione chimica, nonché dal metodo di estrazione e dal tipo di solvente utilizzato. I dati ottenuti da questi studi descrivono l'effetto antimicrobico degli estratti ottenuti dai frutti di Rosa imputandolo alla presenza di composti fenolici nella loro composizione chimica (Cendrowski et al., 2020).

Metodi. Lo screening di attività antimicrobica è stato realizzato allestendo spot test. Brevemente, estratti fenolici di bacche di 5 diverse specie di rosa: *Rosa canina* (CA), *Rosa corymbifera* (CO), *Rosa rubiginosa* (RUB), *Rosa rugosa* (RUG) e *Rosa micrantha* (MI) sono stati risospesi in una soluzione etanolo:acqua 80/20 v/v per ottenere una concentrazione di 1 g/ml di estratto. Tali estratti sono stati testati, a due diverse concentrazioni (1 g/ml e 0.5 g/ml), per l'attività antimicrobica contro microrganismi indicatori, patogeni e alterativi, appartenenti alla ceppoteca del laboratorio di microbiologia degli alimenti del CREA - centro di ricerca Alimenti e Nutrizione. Le aliquote dei campioni sono stati aggiunte in piastre Petri contenenti terreno agarizzato precedentemente inoculato con il ceppo indicatore ad una concentrazione di 10^6 UFC/ml (Unità Formanti Colonia) e incubati alle temperature ottimali di crescita dei microrganismi. A parità di volume di estratto somministrato, si ottengono aloni di inibizione il cui raggio è correlato all'attività antimicrobica nei confronti del ceppo indicatore.

Risultati. La crescita dei microrganismi impiegati per il test, *L. monocytogenes* OH, *L. monocytogenes* CAL, *L. innocua* 1770, *S. saprophyticus*, *S. enterica* Typhimurium LT2, *S. enterica*

Give, *S. enterica* Derby, *E. coli* enterotossico (ETEC) K88, *P. putida* WSC358, *P. putida* KT2240, *P. fluorescens* B13, non è stata inibita da nessuno dei 5 estratti di bacche di rosa, testati alle due diverse concentrazioni, infatti, non sono mai stati rilevati aloni di inibizione (dati non mostrati). La produzione scientifica riguardante l'attività antimicrobica di estratti delle specie di Rosa, al momento è ancora esigua e i dati ottenuti in questo studio non sono confrontabili con quelli riportati in letteratura. Infatti, i lavori che indagano in tal verso, riportano tecniche differenti da quelle utilizzate in questo studio per ottenere gli estratti. Cendrowski et al. (2020), ad esempio, descrive le proprietà antimicrobiche di estratti di frutti di *Rosa rugosa* ottenuti con diverse tecniche di estrazione (acquosa, etanolica, supercritica e enzimatica) e su un set di specie e pathovars di microrganismi patogeni diverso da quello testato nel nostro lavoro. Infine, le ricerche analoghe (Nowak et al., 2014; Tatke et al., 2015; Ulusoy et al., 2009) riportano effetti antimicrobici di estratti ottenuti da diverse parti della pianta (foglie, radici, fiori ecc.).

2.2 Studio della tossicità degli estratti di due specie di rosa sulla linea di cellule intestinali Caco-2

Background. La rosa, in particolare le bacche prodotte dalla pianta, merita un'attenzione particolare come potenziale fonte di antiossidanti naturali e sostanze bioattive. È stato scoperto che sono ricche di polifenoli (tra cui tannini, flavonoidi, acidi fenolici e antociani), carotenoidi (principalmente licopene, -criptoxantina,-carotene, rubixantina, gazaniaxantina e zeaxantina), polisaccaridi, olio essenziale (contiene alcoli, aldeidi, monoterpeni, sesquiterpeni ed esteri), acidi grassi polinsaturi (nei semi), vitamina A, B1, B2, B6, D, E e K e nutrienti minerali (principalmente fosforo, potassio, calcio, magnesio, manganese e zinco) (Ercisli, 2007). Nonostante siano note in letteratura le proprietà antiossidanti delle bacche di rosa e come queste siano influenzate dal tipo di estrazione (etanolica, in metanolo, ecc.) (Cendrowski et al., 2020), le informazioni relative ai potenziali effetti tossici degli estratti fenolici di rosa sull'intestino, che rappresenta il primo sito di impatto di questi composti con l'organismo, non sono stati ancora caratterizzati. In questo studio abbiamo quindi utilizzato il modello cellulare intestinale umano, rappresentato dalla linea intestinale Caco-2, per valutare questi aspetti.

Metodi. Sulla base dei risultati ottenuti dall'analisi dei composti fenolici presenti negli estratti di bacche delle cinque diverse specie, sono state scelte le due specie con il più alto contenuto di polifenoli totali, ossia la *Rosa corymbifera* e poi la *Rosa canina*, per valutare la loro tossicità sulla linea di cellule intestinali Caco-2. Tali cellule sono in grado di differenziare in enterociti maturi, ossia cellule polarizzate dell'intestino tenue, dotate di microvilli nella porzione apicale e di giunzioni strette tra cellule adiacenti. A tale scopo le Caco-2 sono state coltivate per 17-21 giorni su filtri semipermeabili Transwell, che permettono di mantenere separati il compartimento apicale, corrispondente al *lumen* intestinale, ed il compartimento basolaterale, che corrisponde alla lamina basale. La tossicità degli estratti è stata valutata mediante due diverse misurazioni dell'integrità del monostrato cellulare: la resistenza elettrica transepiteliale (TEER) e il passaggio paracellulare del marcatore rosso fenolo. Un monostrato integro oppone resistenza al passaggio di corrente tra i due compartimenti (valori di TEER elevati, superiori a circa 1300 Ohm x cm²) e non permette il passaggio di rosso fenolo dall'apicale al basolaterale (concentrazioni di rosso fenolo in basolaterale inferiori a 1 x 10⁻⁶ cm x sec⁻¹). La TEER è stata misurata a vari tempi di trattamento con un voltmetro collegato a una coppia di elettrodi, mentre la concentrazione di rosso fenolo è stata

misurata al tempo finale dell'esperimento per densità ottica, ed espressa come Permeabilità apparente (Papp). I due estratti di *Rosa corymbifera* e *Rosa canina* sono stati utilizzati partendo da una concentrazione iniziale di 1 g/ml in etanolo:acqua 80/20 v/v e diluendo fino al range 1-25 mg/ml, che è stato testato sulle cellule.

Risultati. Le analisi effettuate non hanno mostrato alcuna tossicità dei due campioni di rosa fino alle concentrazioni di 20 mg/ml, infatti l'andamento delle TEER per il range di concentrazioni 1-20 mg/ml è rimasto costante fino a 24 h di trattamento sia con *Rosa corymbifera* (**Figura 1**), che con *Rosa canina* (**Figura 2**). La concentrazione di 25 mg/ml ha avuto invece un effetto diverso a seconda della specie di rosa considerata, infatti mentre la *Rosa canina* 25 mg/ml è stata ben tollerata dalle cellule fino a 24 ore, la medesima concentrazione di *Rosa corymbifera* ha indotto invece un sensibile calo delle TEER già dopo due ore di trattamento. Anche le concentrazioni di 10 e 20 mg/ml di *R. corymbifera* hanno causato un aumento di permeabilità, ma di minore entità, tale danno si è dimostrato essere reversibile, in quanto cellule mantenute in terreno di coltura fresco per 24 ore dopo il trattamento mostravano valori di TEER paragonabili al controllo, indicando un completo recupero (*recovery*, R) della permeabilità del monostrato (**Figura 1**). I risultati delle TEER sono stati confermati dai dati relativi al passaggio di rosso fenolo, infatti la Permeabilità apparente a 24 h era sempre dell'ordine di 10^{-7} cm x sec⁻¹ in tutti i campioni di *Rosa canina* (**Figura 3B**) e nei campioni di *Rosa corymbifera* fino a 20 mg/ml (**Figura 3A**), mentre il valore di Papp relativo al trattamento con *Rosa corymbifera* 25 mg/ml risultava superiore rispetto a quello soglia di 1×10^{-6} cm x sec⁻¹, indicando apertura delle giunzioni. Questo differente comportamento delle due specie di rosa alla concentrazione 25 mg/ml di estratti potrebbe essere ascrivibile al diverso profilo quantitativo di polifenoli presenti. La concentrazione 2% di etanolo, corrispondente a quella presente negli estratti 25 mg/ml, non si è invece dimostrata tossica per le cellule.

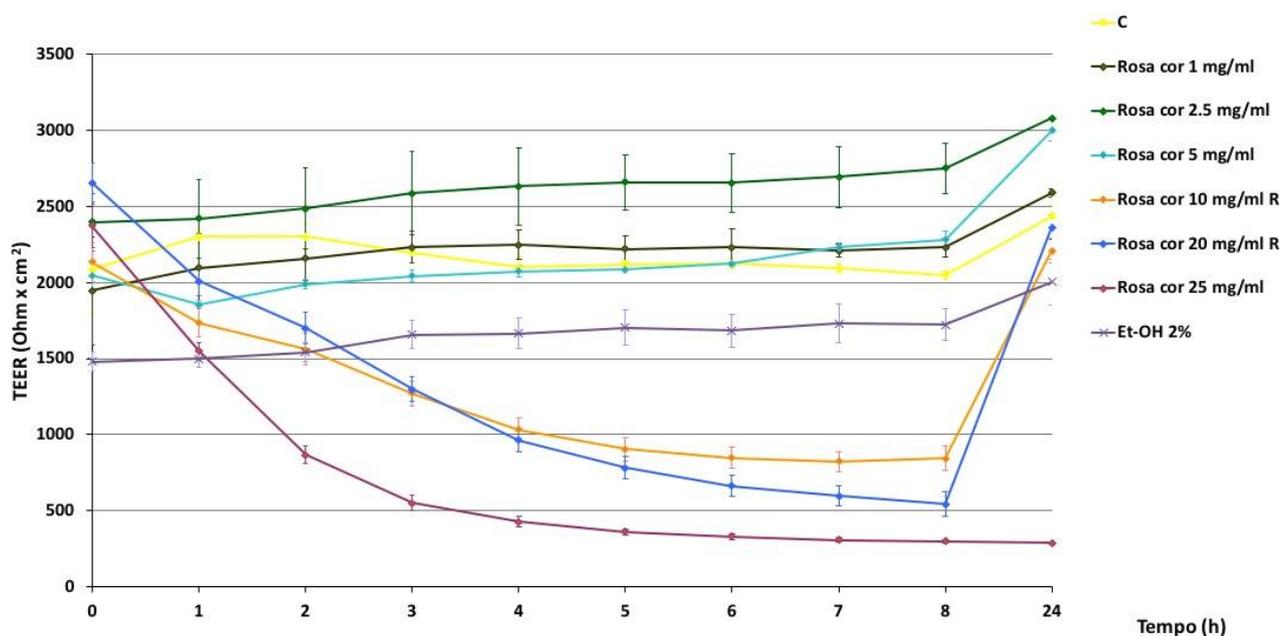


Figura 1. TEER di cellule Caco-2 trattate con diverse concentrazioni (1 - 25 mg/ml) di estratto di bacca di *Rosa corymbifera* (*Rosa cor*), saggiata fino a 24 h. C = controllo non trattato. E' stata valutata anche la concentrazione di etanolo 2%, equivalente a quella contenuta nella concentrazione più elevata di estratto. Per valutare la reversibilità degli effetti osservati nei casi in cui le TEER hanno avuto un calo moderato, dopo 8 ore di trattamento i mezzi sperimentali contenenti gli estratti sono stati sostituiti con mezzo di coltura fresco: campioni indicati con "R", ossia "Recovery" accanto alle concentrazioni 10 e 20 mg/ml..

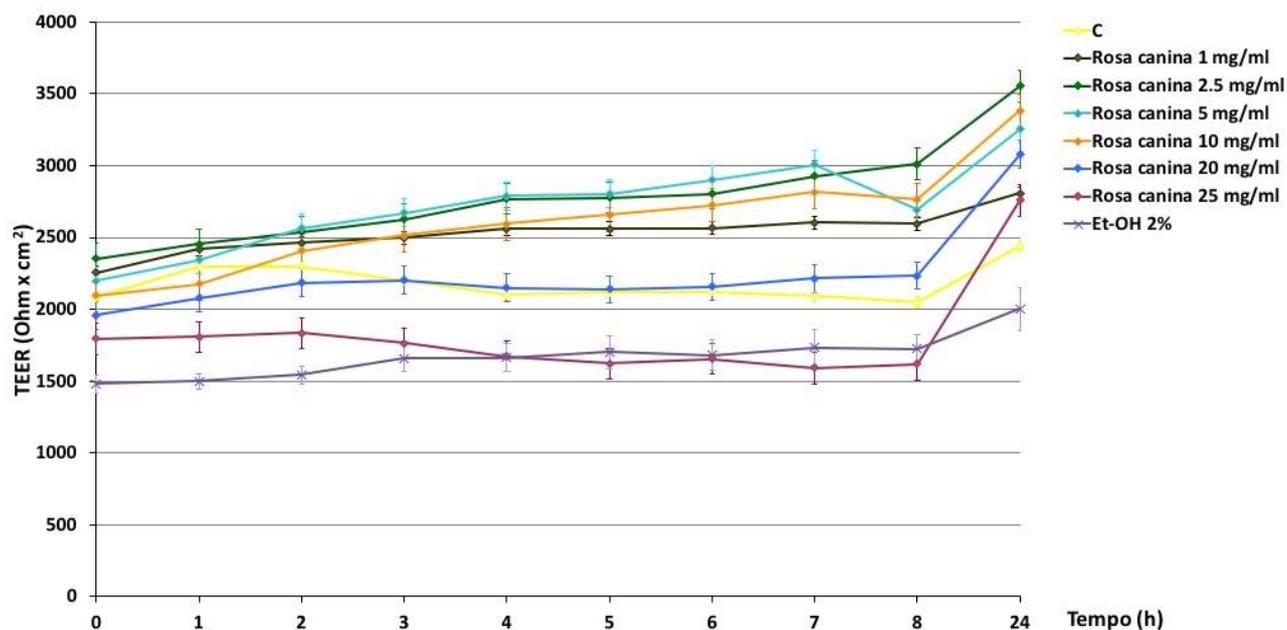


Figura 2. TEER di cellule Caco-2 trattate con diverse concentrazioni (1 - 25 mg/ml) di estratto di bacca di *Rosa canina*, saggiata fino a 24 h. C = controllo non trattato. E' stata valutata anche la concentrazione di etanolo 2%, equivalente a quella contenuta nella concentrazione più elevata di estratto.

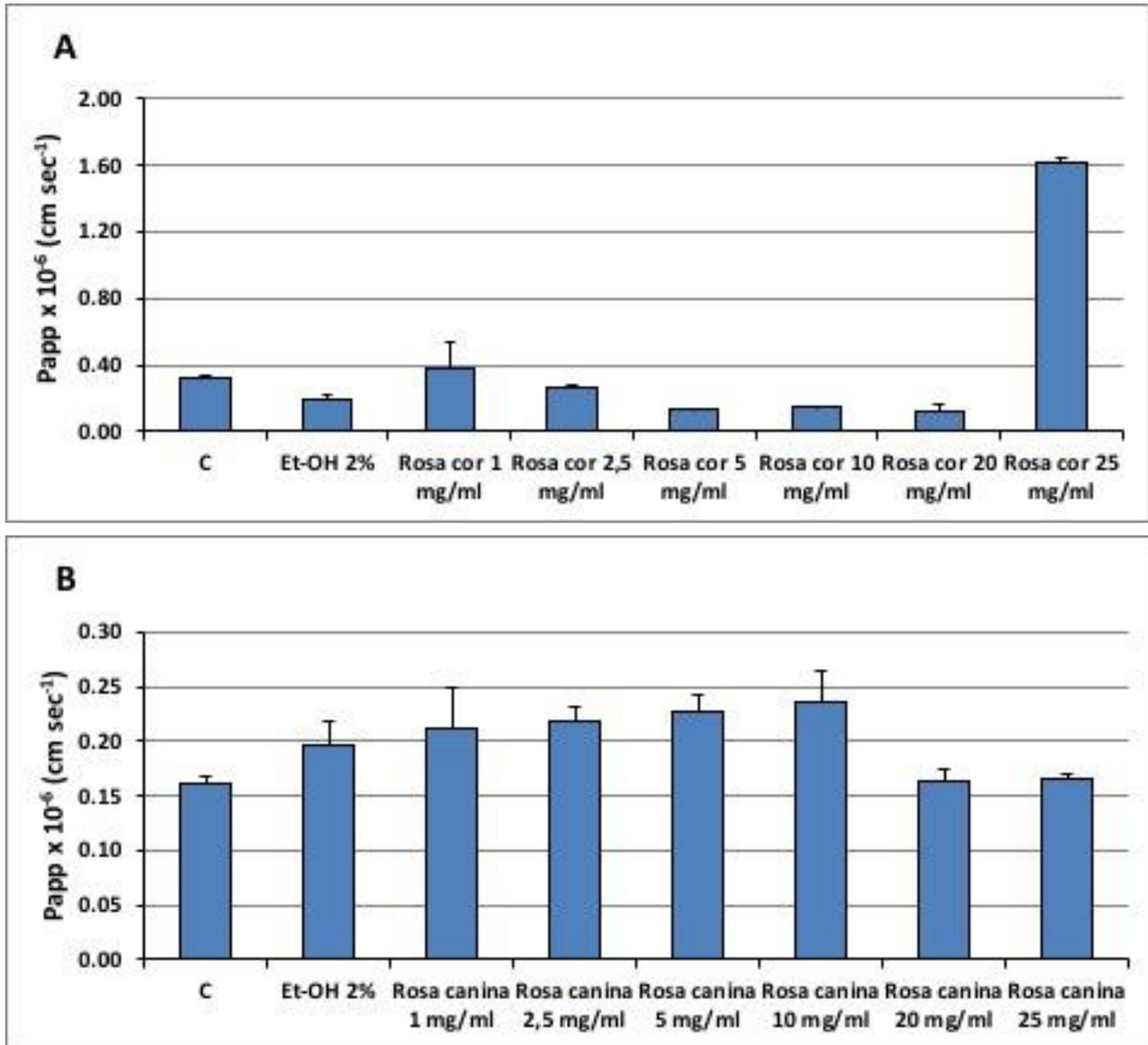


Figura 3. Permeabilità apparente del rosso fenolo in cellule Caco-2 trattate con diverse concentrazioni (1 - 25 mg/ml) di estratti di *Rosa corymbifera* (*Rosa cor*) (Pannello A) e *Rosa canina* (Pannello B), saggiata a 24 h. C = controllo non trattato. E' stata valutata anche la concentrazione di etanolo 2%, equivalente a quella contenuta nella concentrazione più elevata di estratto.

REFERENZE

Cendrowski A, Kraśniewska K, Przybył JL, Zielińska A, Kalisz S. Antibacterial and Antioxidant Activity of Extracts from Rose Fruits (*Rosa rugosa*). *Molecules*. 2020, 25(6):1365. doi: 10.3390/molecules25061365.

Ercisli, S. Chemical composition of fruits in some rose (*Rosa* spp.) species. *Food Chem*. 2007, 104, 1379–1384. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.01.053

Nowak R., Olech M., Pecio Ł., Oleszek W., Los R., Malm J., Rzymowska J. Cytotoxic, antioxidant, antimicrobial properties and chemical composition of rose petals. *J. Sci. Food Agric*. 2014, 94:560–567. doi: 10.1002/jsfa.6294

Tatke P., Satyapal U.S., Mahajan D.C., Naharwar V. Phytochemical Analysis, In-Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of Flower Petals of *Rosa damascene*. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res*. 2015, 7:246–250

Ulusoy S., Boşgelmez-Tinaz G., Seçilmiş-Canbay H. Tocopherol, Carotene, Phenolic Contents and Antibacterial Properties of Rose Essential Oil, Hydrosol and Absolute. *Curr. Microbiol*. 2009, 59:554–558. doi: 10.1007/s00284-009-9475-y

3. Potenziali effetti antimicrobici, studio della tossicità e della riduzione dell'adesione di patogeni su cellule intestinali e valutazione dell'attività anti-infiammatoria di oli essenziali di origano.

3.1 Studio degli effetti antimicrobici

Background. Grazie alla grande varietà di molecole in essi contenute, gli oli essenziali, costituiti da miscele di sostanze volatili a temperatura ambiente, sono ritenuti un ottimo bacino da cui attingere per la ricerca di nuovi antimicrobici. Questi composti possono rivelarsi letali per le cellule microbiche o in alcuni casi possono inibire la produzione di metaboliti secondari come, ad esempio, le micotossine. In letteratura è ampiamente descritta l'attività antimicrobica di questi composti nei confronti di un ampio spettro di patogeni responsabili di malattie a trasmissione alimentare (MTA), anche quando impiegati a basse concentrazioni. Al fine di valutare l'effetto antimicrobico degli oli essenziali di origano (*Origanum vulgare* subsp. *viridulum* x *Origanum isthmicum* e *Origanum heracleoticum*), sono stati condotti diversi test microbiologici, quali spot test, test di contatto diretto, challenge test su matrice alimentare e studio della riduzione dell'adesione di patogeni indicatori su cellule intestinali Caco-2.

Spot test

Metodi. Gli oli essenziali sono stati ottenuti mediante distillazione in corrente di vapore (metodo Clevenger) da foglie e fiori essiccati di piante di origano appartenenti a due diverse specie, l'ibrido *O. vulgare* subsp. *viridulum* x *O. isthmicum* e la specie *O. heracleoticum*, cresciute in diverse condizioni di altitudine e di caratteristiche pedologiche. Gli oli essenziali di *O. vulgare* x *O. isthmicum* sono indicati come CAR1, CAR2 e CAR3, in quanto caratterizzati da quantità elevate di carvacrolo, mentre quelli di *O. heracleoticum*, indicati come HERAC3 e HERAC5, sono caratterizzati da elevate quantità di timolo. Un primo di screening di attività antimicrobica è stato realizzato allestendo degli spot test. Brevemente, aliquote di oli essenziali CAR1, CAR2 e CAR3, e HERAC3 e HERAC5 sono stati aggiunte in piastre Petri contenenti terreni agarizzati precedentemente inoculati con gli stessi ceppi indicatori descritti per l'asparago, ad una concentrazione di 10^6 unità formanti colonia (UFC)/ml, ed incubate alle temperature ottimali di crescita dei diversi microrganismi. A parità di volume di olio essenziale somministrato, si ottengono

aloni di inibizione il cui raggio è correlato all'attività antimicrobica nei confronti del ceppo indicatore. L'ampicillina (50 µg/ml) è stata utilizzata come controllo positivo.

Risultati. I risultati dello screening degli spot test sono riportati in **Tabella 1** e sono espressi come raggio in mm dell'alone di inibizione della crescita microbica. La capacità antimicrobica è considerata alta quando il valore del raggio dell'alone di inibizione è superiore a 7,5 mm, media quando è compresa tra 5 e 7,5 mm, e bassa quando è inferiore a 5 mm.

Tabella 1. Risultati dello screening per la valutazione dell'attività antimicrobica degli oli essenziali estratti da *O. vulgare* x *O. isthmicum* e *O. heracleoticum*. L'ampicillina è stata utilizzata come controllo positivo

| Microorganismo indicatore | Raggio dell'alone di inibizione (mm) | | | | | Controllo Amp 50 µg/ml |
|---|--|------|------|-------------------------|--------|------------------------------|
| | <i>O. vulgare</i> x <i>O. isthmicum</i> | | | <i>O. heracleoticum</i> | | |
| | CAR1 | CAR2 | CAR3 | HERAC3 | HERAC5 | |
| <i>Listeria monocytogenes</i> OH | 15 | 10 | 12,5 | 15 | 12,5 | 10 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> SA | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 12,5 | 10 | 10 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> CAL | 10 | 10 | 10 | 12,5 | 10 | 11,5 |
| <i>Listeria innocua</i> 1770 | 7,5 | 7,5 | 7,5 | 10 | 9 | 12,5 |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i> (isolato) | 15 | 15 | 12,5 | 7,5 | 10 | 11,5 |
| <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium LT2 | 10 | 7,5 | 10 | 15 | 10 | 12,5 |
| <i>Salmonella enterica</i> Give | 15 | 10 | 15 | 12,5 | 10 | 10 |
| <i>Salmonella enterica</i> Derby | 10 | 10 | 10 | 10 | 15 | 10 |
| <i>E. coli</i> enterotossico (ETEC) K88 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 10 | 7,5 | 7,5 |
| <i>Pseudomonas putida</i> WSC358 | 10 | 7,5 | 10 | 9 | 6 | 7,5 |
| <i>Pseudomonas putida</i> KT2240 | 10 | 7,5 | 5 | 7,5 | 5 | 10 |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> B13 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 7,5 | 6,5 | 10 |

Gli oli essenziali estratti dall'ibrido *O. vulgare* x *O. isthmicum* hanno mostrato un'attività antimicrobica con aloni di dimensioni diverse. In particolare, tutti i microrganismi patogeni considerati si sono mostrati suscettibili all'attività inibente di CAR1, CAR2 e CAR3, con aloni di inibizione il cui raggio superava i 7,5 mm, ad eccezione di *L. monocytogenes* SA, nei confronti del quale gli oli avevano bassa attività. Tra i microrganismi alterativi invece, il maggiore effetto

antimicrobico si è osservato nei confronti di *S. saprophiticus*, con aloni il cui raggio era superiore a 12,5 mm, mentre gli aloni di inibizione dal raggio di 2,5 mm prodotti nei confronti di *P. fluorescens* B13, hanno dimostrato la scarsa suscettibilità agli oli essenziali di questa specie vegetale.

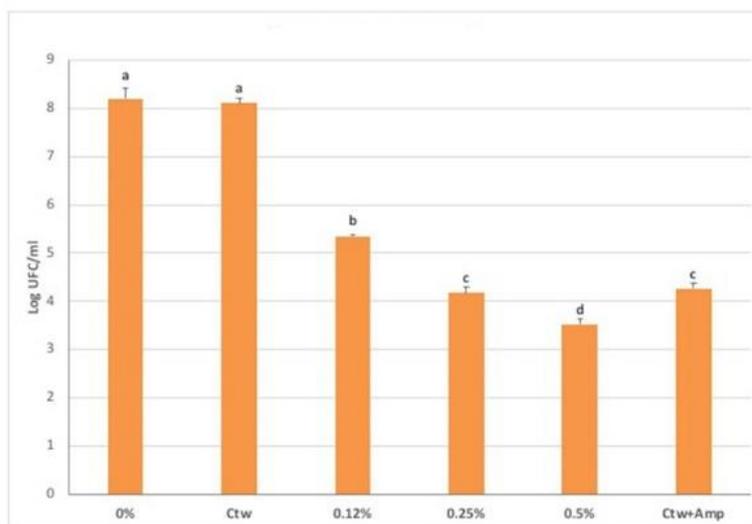
Gli OE estratti da *O. heracleoticum* hanno mostrato un'attività media nei confronti di *P. putida* KT2240 e *P. fluorescens* B13 (raggio compreso tra 5 e 10 mm) e un'alta attività inibente nei confronti di tutti gli altri microrganismi patogeni e alterativi.

Test di contatto diretto

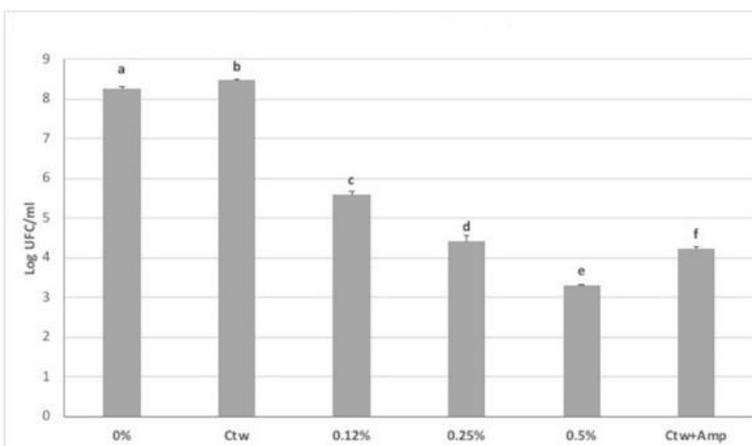
Metodi. Per fornire una quantificazione dell'attività antimicrobica, si è proceduto all'allestimento di un ulteriore test per contatto eseguito con i patogeni nei confronti dei quali gli oli si erano mostrati più efficaci ad inibirne la crescita. In particolare, sono stati saggiati gli oli CAR1, HERAC3 ed HERAC5 a diverse concentrazioni (0,12%-0,25%-0,50%), nei confronti di *L. monocytogenes* OH come rappresentante dei Gram positivi, e di *S. enterica* Typhimurium LT2 come rappresentante dei Gram negativi. Le soluzioni contenenti le diverse concentrazioni di olio essenziale e il patogeno indicatore (10^8 UFC/ml) sono state incubate per 30 minuti alle temperature ottimali del microrganismo considerato, e successivamente piastrate sui substrati di crescita idonei a ciascun patogeno. Campioni trattati con soluzioni allo 0% di olio essenziale, allo 0% di olio essenziale più 0.25% Tween 80 (CTw) e con Ampicillina 50 µg/ml (Amp) sono stati utilizzati come controllo. I risultati delle conte vitali, ottenute dopo 24 h di incubazione, sono espressi in log UFC/ml delle medie geometriche \pm deviazione standard. Prima di effettuare l'analisi della varianza, la normalità e l'omogeneità della varianza di tutte le variabili sono state verificate mediante il test di Shapiro-Wilk ed il test di Levene, rispettivamente. Nei casi in cui entrambe le condizioni erano verificate, è stata effettuato il one-way ANOVA seguito dal post hoc test di Tukey. Nei casi in cui i dati non mostravano una distribuzione normale, è stato applicato il test di Kruskal-Wallis seguito dal post hoc test di Dunn, mentre quando non era verificata l'omogeneità della varianza, è stata applicato il Welch one-way ANOVA seguito dal post hoc test di Tamhane. Le differenze con valori di $p < 0,05$ sono considerate significative, e sono indicate nelle figure con lettere diverse. L'analisi statistica è stata effettuata con il software XLSTAT di Excel (Office 2010).

Risultati. I risultati sono mostrati nelle **Figure 1** e **2** per *L. monocytogenes* OH e *S. enterica* Typhimurium LT2, rispettivamente. I tre oli essenziali mostravano capacità antimicrobiche simili nei confronti di *L. monocytogenes* OH. In particolare, già a basse concentrazioni di olio essenziale (0,12%) si verificava una riduzione di circa 3 log della concentrazione microbica. Proporzionalmente ad un'aumentata concentrazione dell'olio (0,25% e 0,50%) conseguiva una riduzione di circa 4 e 4,5 log, rispettivamente, del titolo microbico. Inoltre, il trattamento con CAR1 ed HERAC5 allo 0,25% mostrava una riduzione della concentrazione microbica simile a quella ottenuta con l'impiego della sola Ampicillina, mentre per tutti gli oli il trattamento allo 0,5% dimostrava avere un effetto superiore a quello dell'Ampicillina nella riduzione della carica microbica (**Figura 1**). Similmente, gli oli mostravano nei confronti di *S. enterica* Typhimurium un'attività antimicrobica che si traduceva in una riduzione del titolo microbico di circa 1 log UFC/ml, quando applicati a una concentrazione dello 0,12%, aumentando proporzionalmente il loro effetto fino a una riduzione di circa 4 log UFC/ml, quando applicati ad una concentrazione dello 0,5%. Per *S. Typhimurium*, l'effetto antimicrobico degli oli impiegati alla concentrazione dello 0,5% era simile a quello della Ampicillina (**Figura 2**).

A



B



C

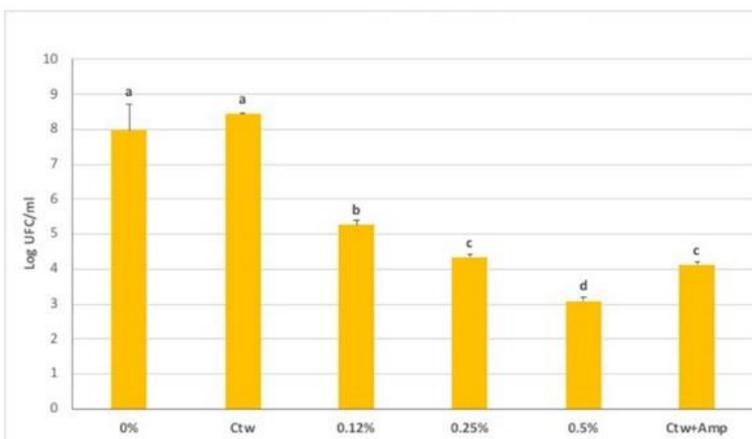
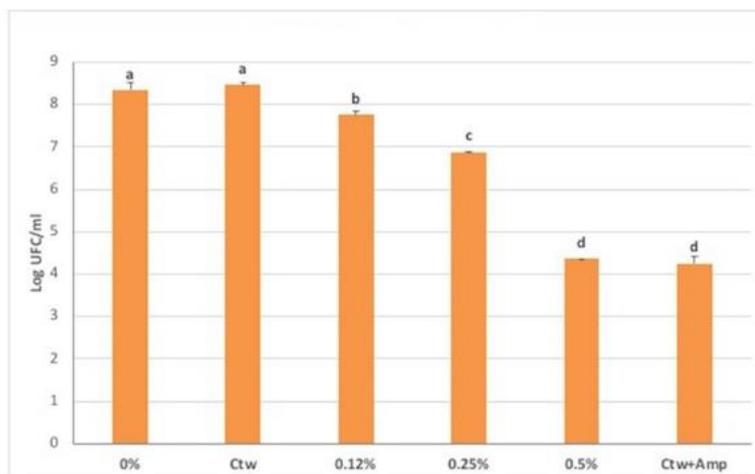
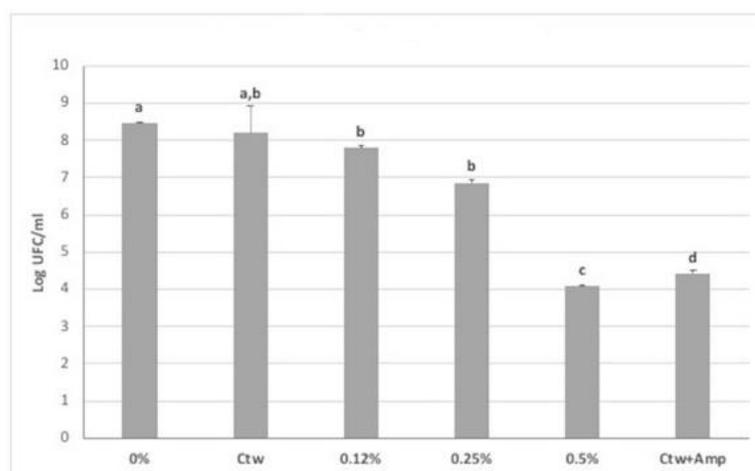


Figura 1. Test di contatto diretto: CAR1 (A), HERAC3 (B) e HERAC5 (C) vs. *Listeria monocytogenes* OH. Come controlli sono state ottenute preparazioni allo 0% di olio essenziale, 0% di olio essenziale + 0.25% Tween 80 (CTw), Ampicillina 50 µg/ml + 0.25% Tween 80 (CTw+Amp). La vitalità cellulare è espressa come media geometrica in UFC/ml ± deviazione standard. Le differenze con valori di $p < 0,05$ sono considerate significative, e sono indicate con lettere diverse.

A



B



C

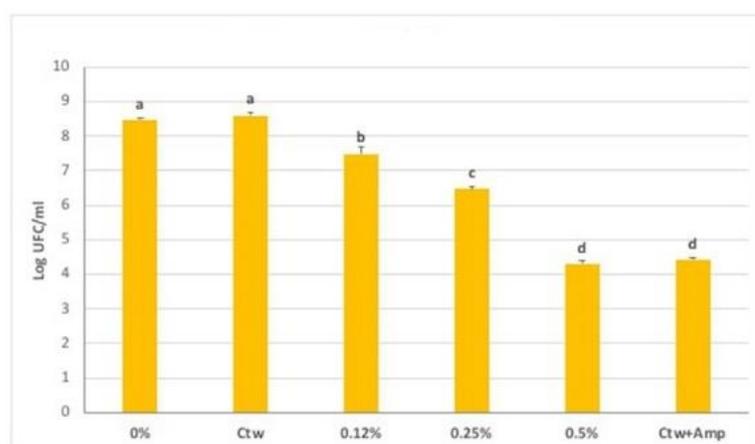


Figura 2. Test di contatto diretto: CAR1 (A), HERAC3 (B) e HERAC5 (C) vs *Salmonella enterica* Typhimurium LT2. Come controlli sono state ottenute preparazioni allo 0% di olio essenziale, 0% di olio essenziale + 0.25% Tween 80 (CTw), Ampicillina 50 µg/ml + 0.25% Tween 80 (CTw+Amp). La vitalità cellulare è espressa come media geometrica in UFC/ml ± deviazione standard. Le differenze con valori di $p < 0,05$ sono considerate significative, e sono indicate con lettere diverse.

Challenge test

Metodi. L'effetto antimicrobico dell'olio essenziale HERAC5 è stato ulteriormente studiato tramite l'allestimento di challenge test su carne di manzo. Un trito di carne di manzo è stato artificialmente contaminato con una concentrazione di circa 10^5 UFC/g di *Listeria monocytogenes* o *Salmonella* Typhimurium, e ne è stata osservata la dinamica di crescita durante la conservazione a 4 °C per 7 giorni in presenza e in assenza di olio essenziale HERAC5 alla concentrazione di 0,5%. I dati sono espressi in log UFC/g delle medie geometriche ± deviazione standard. L'analisi statistica applicata è quella precedentemente descritta.

Risultati. I risultati del *challenge test* contro *L. monocytogenes* OH sono riportati in **Figura 3**. La popolazione batterica è rimasta sostanzialmente invariata a 1 (T1) e 2 (T2) giorni nei campioni contaminati sia in presenza che in assenza di olio essenziale, mentre è stata osservata una riduzione di circa 1 e 2 log della carica microbica a 3 (T3) e a 7 giorni (T7) rispettivamente, di conservazione in presenza di olio essenziale HERAC5. Parallelamente, è stata valutata l'assenza di *L. monocytogenes* nella matrice alimentare nel campione non contaminato artificialmente (dati non mostrati).

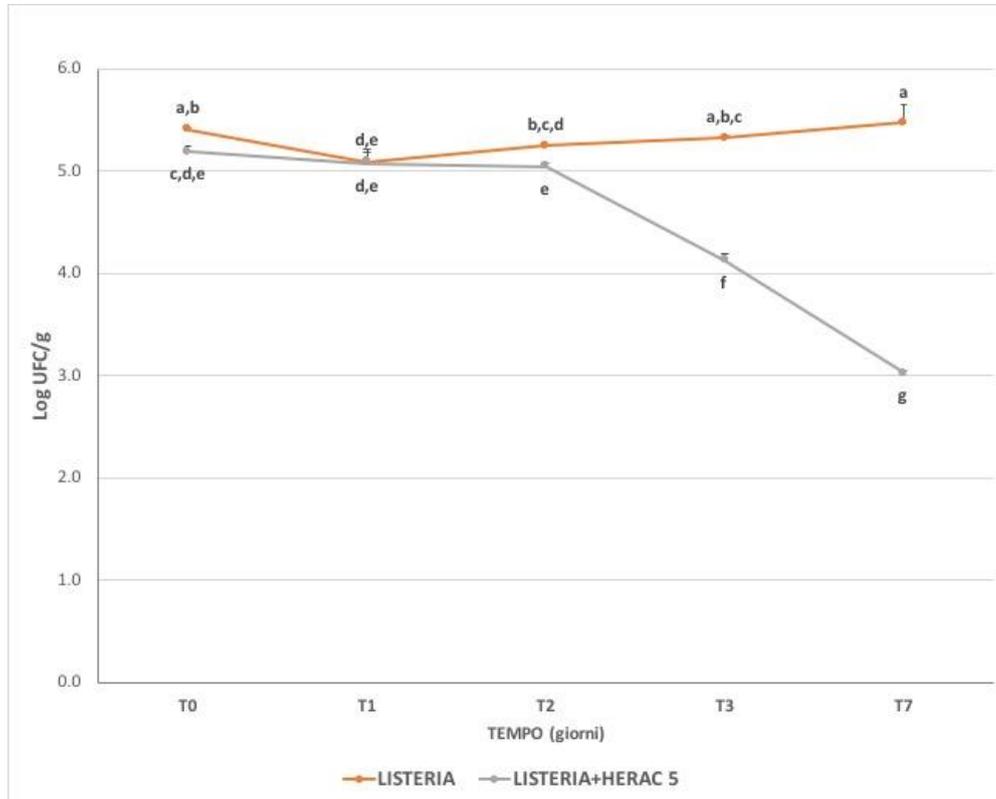


Figura 3. Challenge test per *Listeria monocytogenes* OH in carne macinata di manzo con 0,5% HERAC5 conservata a 4 °C per 7 giorni. La vitalità cellulare è espressa come media geometrica in UFC/g \pm deviazione standard. Le differenze con valori di $p < 0,05$ sono considerate significative, e sono indicate con lettere diverse.

I risultati del challenge test allestito con *Salmonella* Typhimurium (**Figura 4**), mostrano che l'effetto antimicrobico dell'olio essenziale di HERAC5 era apprezzabile già al tempo iniziale (T0) con una riduzione di circa 1 log UFC/g; un ulteriore decremento, pari a 1 log UFC/g si osservava nei tempi successivi (2, 3 e 7 giorni). Parallelamente, è stata valutata l'assenza di *S. Typhimurium* nella matrice alimentare nel campione non contaminato artificialmente (dati non mostrati).

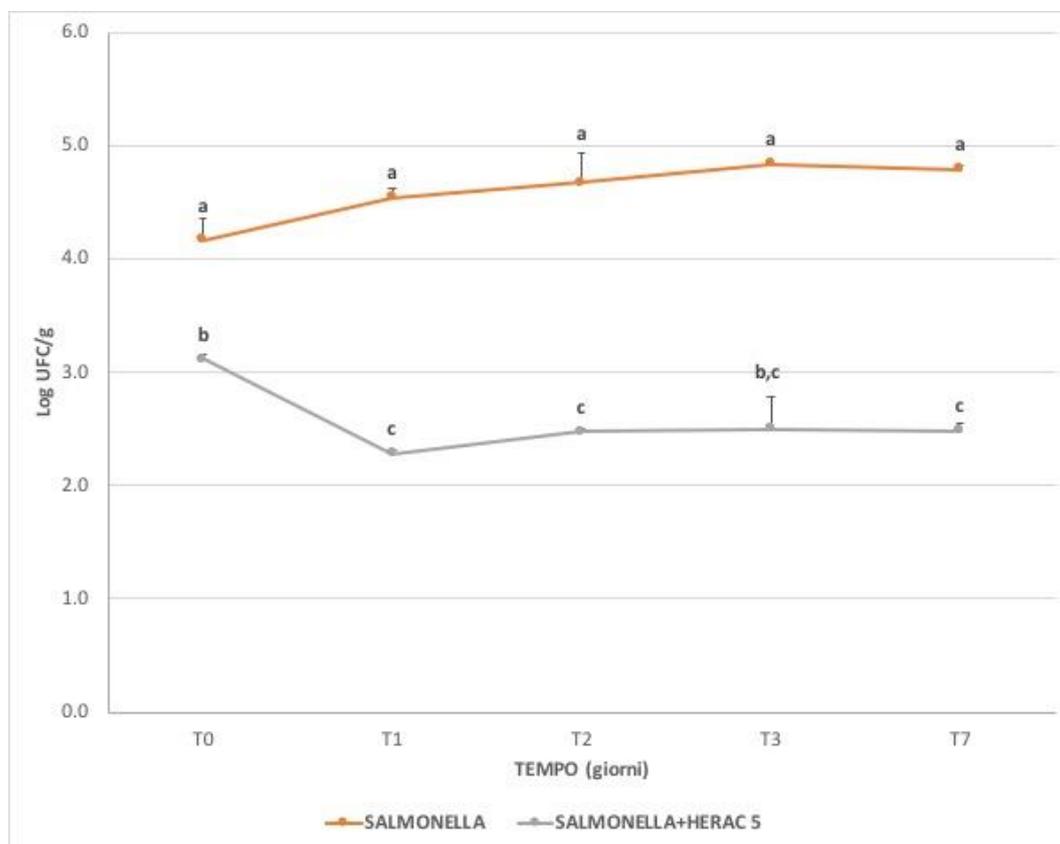


Figura 4. Challenge test per *Salmonella* Typhimurium in carne macinata di manzo con 0,5% HERAC5 conservata a 4 °C per 7 giorni. La vitalità cellulare è espressa come media geometrica in UFC/g \pm deviazione standard. Le differenze con valori di $p < 0,05$ sono considerate significative, e sono indicate con lettere diverse.

3.2 Studio della tossicità degli oli essenziali di origano sulle cellule intestinali Caco-2

Background. Un altro importante aspetto da considerare in relazione alla sicurezza d'uso degli oli essenziali è la loro eventuale tossicità per l'uomo, prima di utilizzarli per la conservazione degli alimenti. Infatti, è fondamentale che, alle concentrazioni da impiegare per garantirne l'efficacia antibatterica, non si rilevino effetti tossici. Solitamente queste valutazioni vengono fatte mediante passaggi graduali, in cui si parte da studi preclinici *in vitro* e modelli animali e infine test clinici sull'uomo. In questo studio abbiamo effettuato il primo step, valutando la tossicità degli oli essenziali sulla linea di cellule intestinali Caco-2, precedentemente descritte. Per tale studio di tossicità sono stati scelti CAR1 ed HERAC5 come rappresentativi dei relativi gruppi di appartenenza, ad alto contenuto di carvacrolo e di timolo, rispettivamente.

Metodi. Le cellule Caco-2 sono state coltivate per gli esperimenti su filtri semipermeabili Transwell, analogamente a quanto descritto per l'asparago. La tossicità degli oli è stata valutata mediante le due diverse misurazioni dell'integrità del monostrato cellulare: la resistenza elettrica transepiteliale (TEER) e il passaggio paracellulare del marcatore rosso fenolo (permeabilità apparente: Papp). Le cellule sono state trattate per 24 h nel compartimento apicale con diverse concentrazioni di oli essenziali CAR1 o HERAC5 (0,1%, 0,05%, 0,03%, 0,025%, 0,02%, 0,01%: diluizioni rispetto allo stock iniziale), per valutarne l'eventuale tossicità. Come controllo, essendo gli oli essenziali diluiti in etanolo, le cellule sono state trattate anche con etanolo allo 2%, corrispondente alla massima concentrazione di oli essenziali a cui sono state esposte, per verificare che l'etanolo a quella concentrazione non risultasse tossico per le cellule.

Risultati. I risultati relativi alle TEER sono mostrati nelle **Figure 5 e 7** per CAR1 e HERAC5, rispettivamente. Riguardo CAR1 si osservava un crollo dei valori di TEER già dalla prima ora di trattamento, per concentrazioni superiori allo 0,02%. Tale danno alle giunzioni non si è mostrato reversibile, in quanto il *recovery*, ottenuto rimettendo il terreno completo ai campioni con le concentrazioni più elevate di oli essenziali, non è stato efficace: le TEER si sono mantenute su valori dell'ordine dei 200 Ohm x cm², indicativi di un monostrato completamente danneggiato (**Figura 5**). Questo risultato è in accordo con dati presenti in letteratura, in cui concentrazioni simili di oli essenziali di origano inducevano morte cellulare e perdita dell'integrità del monostrato nelle Caco-2 già dopo un'ora di trattamento (Dusan et al. 2006). Per le concentrazioni inferiori testate

(0,02 e 0,01%) di CAR1, i valori di TEER si mantenevano invece abbondantemente sopra 1300 Ohm x cm², indicando che tali concentrazioni erano ben tollerate dalle cellule (**Figura 5**).

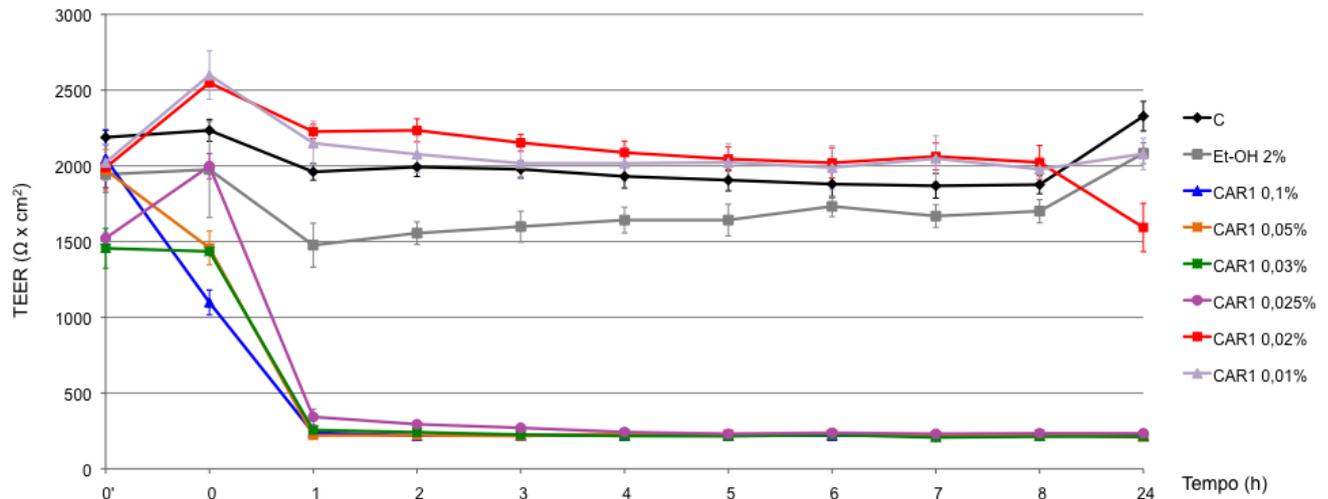


Figura 5. TEER di cellule Caco-2 trattate con diverse concentrazioni (0,1 - 0,01%) di CAR 1, saggiata fino a 24 h. C = controllo non trattato. Come ulteriore controllo, le cellule sono state trattate con il 2% di etanolo, pari alla massima concentrazione a cui vengono esposte per il trattamento più concentrato.

I dati di TEER relativi al trattamento con CAR1 sono state confermate dai risultati del passaggio paracellulare di rosso fenolo, mostrati in **Figura 6**. Tutti i valori di Papp erano infatti superiori al valore soglia ($1 \times 10^{-6} \text{ cm} \times \text{s}^{-1}$), indicativo di un passaggio paracellulare elevato a causa di un'alterata permeabilità, tranne quelli relativi al trattamento con 0,02 e 0,01% di CAR1, che erano paragonabili a quelli del controllo e dell'etanolo da solo, ossia dell'ordine di $10^{-7} \text{ cm} \times \text{s}^{-1}$.

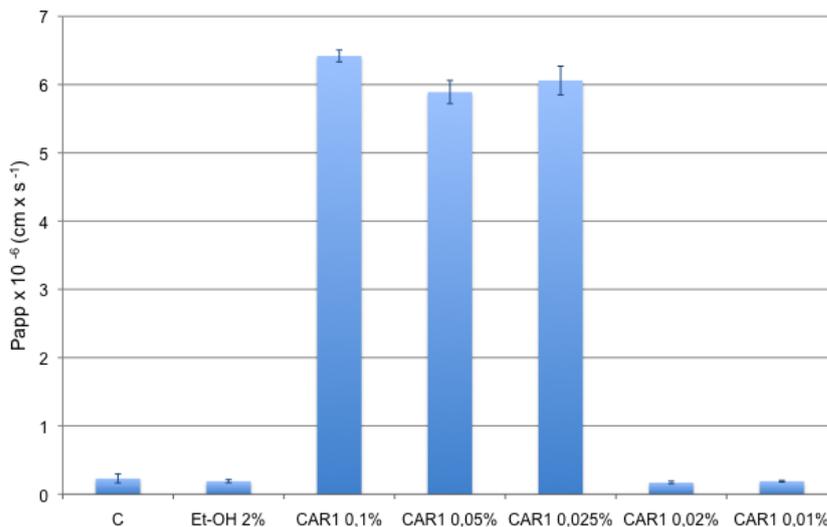


Figura 6. Permeabilità apparente (Papp) del rosso fenolo in cellule Caco-2 trattate con diverse concentrazioni (0,1 – 0,01%) di CAR1. C = Controllo non trattato. Come ulteriore controllo, le cellule sono state trattate con il 2% di etanolo, pari alla massima concentrazione a cui vengono esposte per il trattamento più concentrato.

Per quanto riguarda HERAC5, per concentrazioni superiori allo 0,02% si osservava un crollo dei valori di TEER già dopo la prima ora di trattamento. Differentemente da quanto osservato con CAR1, per la concentrazione 0,025% di HERAC5 l'andamento discendente delle TEER risultava meno rapido, ma comunque indicativo di un danno importante e irreversibile al monostrato, in quanto già dalla quarta ora di trattamento, le TEER risultavano inferiori ai 1000 Ohm x cm², e continuavano a diminuire. Alle concentrazioni inferiori testate (0,02 e 0,01%), i dati di TEER si mantenevano abbondantemente sopra il valore soglia di 1300 Ohm x cm², indicando l'integrità del monostrato (**Figura 7**). I dati di TEER sono stati confermati dai risultati del passaggio paracellulare di rosso fenolo, mostrati in **Figura 8**. I valori di Papp erano infatti superiori al valore soglia (1 x 10⁻⁶ cm x s⁻¹) per concentrazioni comprese tra 0,1 e 0,025% di HERAC5, mentre quelli relativi al trattamento con 0,02 e 0,01% erano dell'ordine di 10⁻⁷ cm x s⁻¹, indicando che le giunzioni strette tra cellule erano chiuse e correttamente funzionanti.

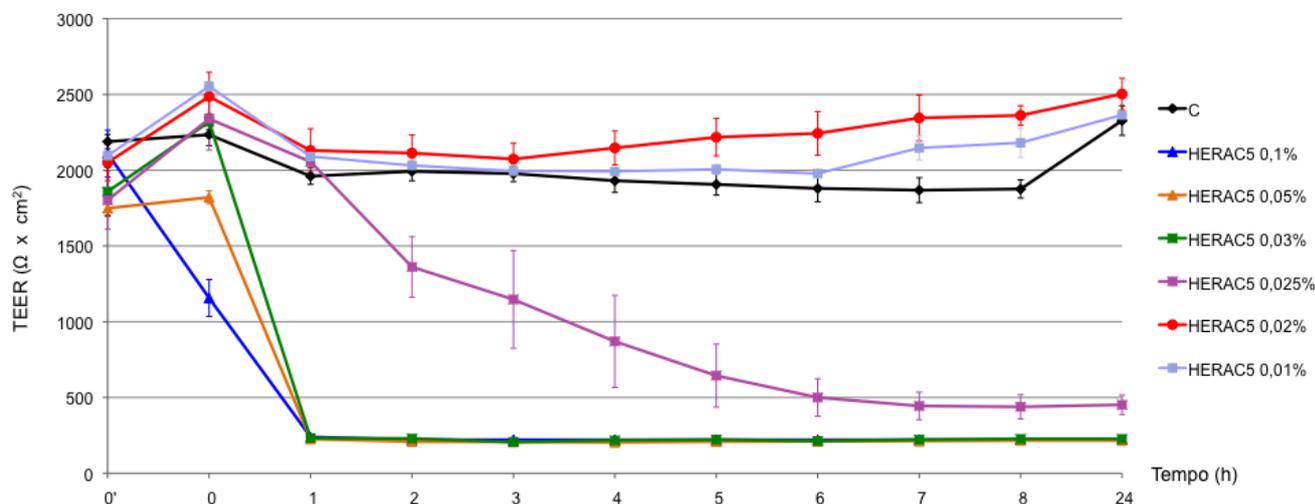


Figura 7. TEER di cellule Caco-2 trattate con diverse concentrazioni (0,1 - 0,01%) di HERAC5, saggiata fino a 24 h. C = controllo non trattato.

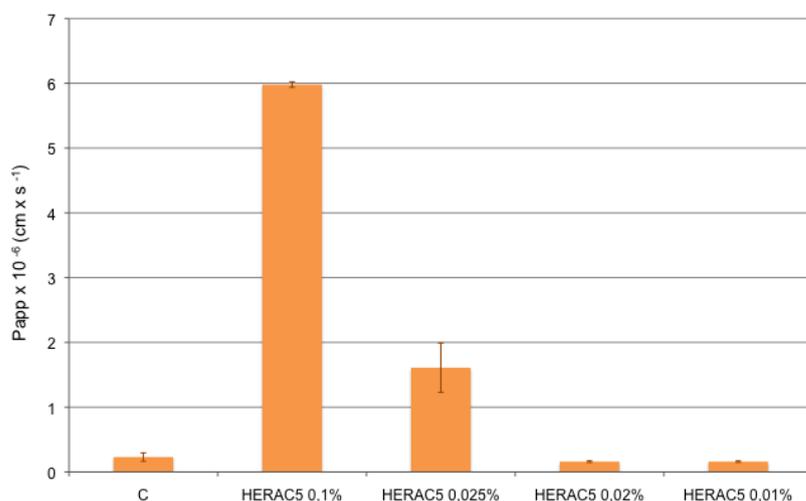


Figura 8. Permeabilità apparente (Papp) del rosso fenolo in cellule Caco-2 trattate con diverse concentrazioni (0,1 - 0,01%) di HERAC5. C = Controllo non trattato.

Da questi dati emerge che, tra le concentrazioni testate, la massima concentrazione che non danneggiava il monostrato di cellule Caco-2 era lo 0,02%, per entrambi gli oli essenziali. Questa

concentrazione è stata perciò utilizzata per lo studio della riduzione dell'adesione dei patogeni e per la valutazione dell'attività anti-infiammatoria.

Sebbene non sia noto il meccanismo con cui gli oli essenziali esplicano la loro tossicità sulle cellule, uno studio condotto nelle Caco-2 ha osservato dei cambiamenti morfologici indotti da carvacrolo e timolo, i principali componenti degli oli essenziali di origano, e ha evidenziato alterazioni nell'ultrastruttura cellulare, quali vacuolizzazione del citoplasma, alterazioni morfologiche degli organelli, danno mitocondriale, degenerazione lipidica, segregazione del nucleolo e infine apoptosi (Llana-Ruiz-Cabello et al. 2014).

Tuttavia, è bene sottolineare come l'attività dei composti puri (singolarmente o in miscela tra loro) possa essere molto diversa da quella degli oli essenziali completi che, pur essendo ad alta concentrazione di carvacrolo (gruppo CAR) o di timolo (gruppo HERAC) contengono anche composti secondari che, pur essendo presenti a concentrazioni molto inferiori, possono avere attività proprie o agire in sinergia con altri metaboliti (Llana-Ruiz-Cabello et al. 2014).

3.3 Studio della riduzione dell'adesione di patogeni da parte degli oli essenziali di origano sulle cellule intestinali Caco-2

Per valutare la riduzione dell'adesione di patogeni a cellule Caco-2 ad opera degli oli essenziali di origano, sono stati selezionati come ceppi indicatori *Listeria monocytogenes* OH, *E. coli* enterotossico ETEC K88 e *Salmonella enterica* Typhimurium LT2 e sono stati saggiati CAR1 ed HERAC5 allo 0,02%, concentrazione individuata in base ai test di tossicità sulle Caco-2.

Metodi. Cellule differenziate della linea intestinale Caco-2 sono stati trattate nel seguente modo: controllo non trattato, cellule incubate con il solo patogeno oppure simultaneamente con il patogeno e l'olio essenziale. I ceppi batterici utilizzati sono stati aggiunti alle cellule ad una concentrazione di 10^8 UFC/pozzetto (batteri:Caco-2 in rapporto 100:1), e incubati per 1 h e 30 minuti a 37 °C. Dopo 5 lavaggi per rimuovere le cellule batteriche non adese al monostrato, le Caco-2 sono state lisate con Triton 1%. I lisati sono stati diluiti serialmente 1:10 in fisiologica e piastrati su opportuni terreni per l'enumerazione delle colonie del ceppo patogeno tramite conta vitale. I risultati delle conte vitali, ottenute dopo 24 h di incubazione, sono espressi in log UFC/ml delle medie geometriche \pm deviazione standard. L'analisi statistica applicata è quella precedentemente descritta.

Risultati. La **Figura 9** mostra i risultati relativi al test di riduzione dell'adesione dei patogeni indicatori ad opera di CAR1 ed HERAC5. Partendo da un inoculo iniziale (T0) di circa 10^8 UFC/ml per ciascun ceppo patogeno, la presenza di CAR1 0,02% riduceva significativamente l'adesione di *L. monocytogenes* OH e di *E. coli* K88 rispetto ai controlli senza olio (Tf), con un decremento pari a circa 1 log UFC/ml (**Figura 9A** e **B**, rispettivamente). Tale riduzione non era ascrivibile alla presenza di etanolo 1%, in quanto esperimenti preliminari non hanno mostrato alcun effetto dell'etanolo sul numero di cellule batteriche vitali adese al monostrato cellulare (dati non mostrati). La presenza di HERAC5 induceva una riduzione significativa dell'adesione del solo ceppo *L. monocytogenes* OH, rispetto al Tf di circa 0,5 Log UFC/ml (**Figura 9A**). Per *S. enterica* Typhimurium LT2 non è stata osservata alcuna riduzione del numero di cellule batteriche vitali adese ad opera di entrambi gli oli essenziali (**Figura 9C**).

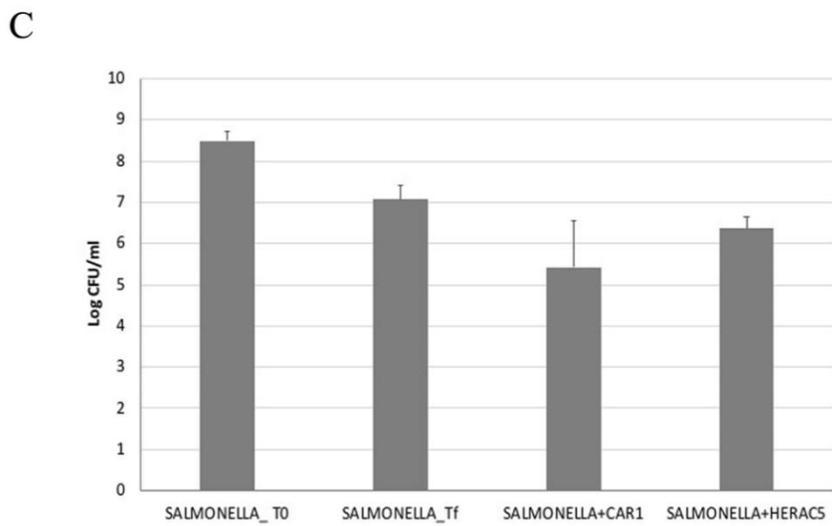
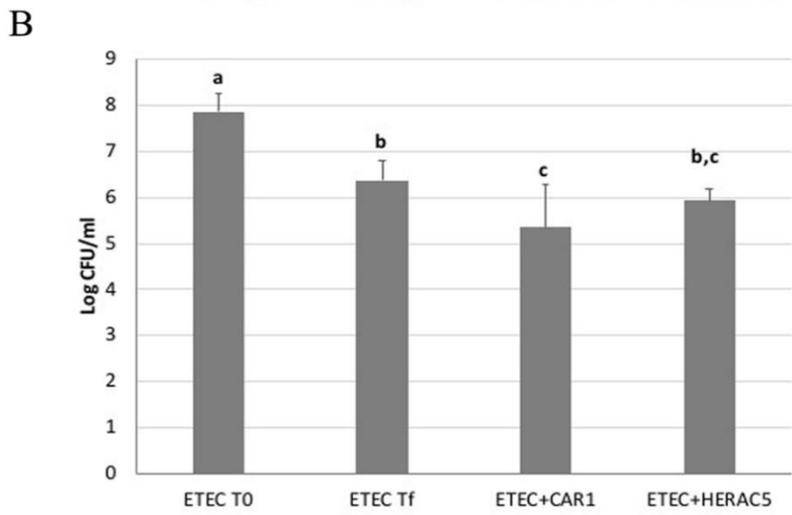
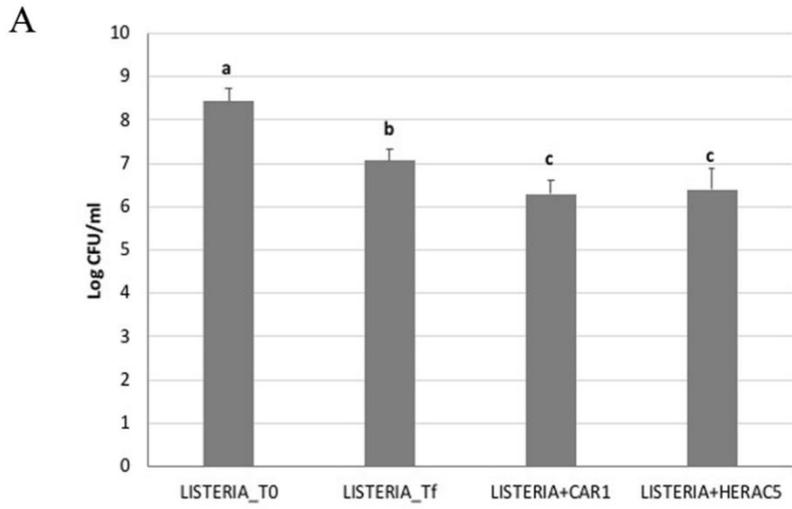


Figura 9. Test di riduzione dell'adesione di *Listeria monocytogenes* OH (A), ETEC K88 (B) e *Salmonella enterica* Typhimurium LT2 (C) in presenza di CAR1 o HERAC5 0,02% (T0 = inoculo iniziale, Tf = cellule adese in assenza di olio). La vitalità cellulare è espressa come media geometrica in UFC/ml \pm deviazione standard. Le differenze con valori di $p < 0,05$ sono considerate significative, e sono indicate con lettere diverse.

La ricerca di nuovi inibitori dell'adesione batterica ai tessuti dell'ospite risulta essere molto importante nella lotta alle malattie infettive, in quanto tali sostanze sarebbero in grado di influenzare le prime fasi delle infezioni (Sharon and Ofek 2002). I risultati ottenuti in questo progetto sono comparabili a quelli di altri lavori svolti su oli essenziali di timo, in cui sono presenti sia il timolo (circa il 12%) che il carvacrolo (circa il 68%); in particolare, è stato osservato che sia l'olio essenziale di *Thymus capitatus* che il timolo ed il carvacrolo da soli, erano in grado di ridurre l'adesione di *E. coli* e *L. monocytogenes* alle cellule intestinali HT-29 (Dzamic et al. 2015). Studi precedenti avevano dimostrato che il carvacrolo era in grado di ridurre l'infezione da *Campylobacter jejuni* in cellule epiteliali (Alphen et al. 2012), mentre il timolo diminuiva l'adesività di *E. coli* e *S. aureus* su cellule di epitelio vaginale umano (Dal Sasso et al. 2006). Infine, entrambi i composti erano in grado di ridurre l'adesione di *L. monocytogenes* a cellule Caco-2 (Upadhyay et al. 2012). Inoltre, in un recente lavoro svolto su olio essenziale di *Origanum vulgare* è stata osservata una riduzione dell'adesione di diverse specie di *Salmonella* a cellule Caco-2 ad opera di un mix commerciale di OE contenente sia timolo che carvacrolo (Di Vito et al. 2020). I meccanismi alla base di tale effetto possono essere molteplici e riconducibili all'attività antimicrobica degli oli essenziali nei confronti di patogeni Gram + e -, alla loro capacità di alterare le proprietà chimico-fisiche della superficie batterica o la motilità microbica, nonché alla riduzione dell'espressione genica di alcuni fattori di virulenza (Dal Sasso et al. 2006, Upadhyay et al. 2012). Ulteriori studi si rendono necessari per comprendere in modo approfondito i meccanismi alla base degli effetti protettivi da parte degli oli essenziali di origano.

3.4 Valutazione dell'attività anti-infiammatoria degli oli essenziali di origano in seguito a stimolo con la citochina pro-infiammatoria tumor necrosis factor (TNF)- α

Background. Per valutare i potenziali effetti benefici degli oli essenziali di origano utilizzati nel presente progetto è stata valutata la loro capacità anti-infiammatorie sulle cellule Caco-2. Le malattie infiammatorie intestinali, quali Colite ulcerosa e Morbo di Chron, sono malattie con eziologia multifattoriale, le cui cause non sono ancora state completamente comprese. Numerose evidenze sembrano però indicare che una dieta ricca di carboidrati, acidi grassi saturi e povera di fibre e verdure possa rappresentare un fattore di rischio per l'insorgenza di queste patologia (Rizzello et al, 2019), mentre l'aderenza alla dieta mediterranea e l'elevato consumo di verdure possono rappresentare una caratteristica protettiva (Grosse et al, 2020). Il modello di mucosa intestinale rappresentato dalle cellule Caco-2 cresciute su filtro può rappresentare un valido strumento per identificare e caratterizzare potenziali matrici alimentari protettive nei confronti dello stress infiammatorio intestinale.

Nel presente studio abbiamo quindi sottoposto le cellule intestinali Caco-2 ad uno stimolo infiammatorio rappresentato dalla citochina pro-infiammatoria Tumor Necrosis Factor (TNF)- α . Questa citochina svolge un ruolo importante nelle malattie infiammatorie intestinali, come evidenziato dai suoi alti livelli in presenza di queste patologie e dall'efficacia di terapie basate sul trattamento con anticorpi anti-TNF- α . Per valutare la potenziale capacità degli oli di mitigare la risposta infiammatoria intestinale è stata considerata l'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B, che è un marker di infiammazione. In seguito a stimolazione con TNF- α , infatti, si attiva una cascata chinasi, che culmina con la fosforilazione del fattore di trascrizione NF- κ B, il quale trasloca nel nucleo delle cellule ed attiva una serie di geni target coinvolti nelle risposta infiammatoria.

Metodi. Le cellule Caco-2 differenziate su filtro sono state incubate per 16 h in presenza degli oli CAR1 ed HERAC5 diluiti ad una concentrazione pari a 0,02%, aggiunti al compartimento apicale. Dopo l'incubazione, sono stati controllati i valori delle TEER nelle cellule di controllo e nei trattamenti. Una volta accertata l'integrità del monostrato epiteliale e l'assenza di effetti tossici le cellule sono state incubate in presenza di TNF- α umano nel compartimento basolaterale ad una concentrazione di 15 ng/ml. Per valutare l'avvenuta fosforilazione del fattore di trascrizione NF- κ B mediante esperimenti di espressione proteica (Western blot), dopo 1 h di incubazione le cellule sono

state raccolte in 300 μ l di buffer di lisi RIPA e conservate a -20°C per la successiva analisi. I livelli di proteina fosforilata sono stati normalizzati rispetto alla forma non fosforilata. L'espressione del gene target inibitore cellulare dell'apoptosi (cIAP)-2, la cui trascrizione è regolata da NF-kB, è stata invece analizzata dopo 2 ore di incubazione con TNF- α mediante tecniche di real-time PCR. Il gene GAPDH è stato utilizzato come controllo interno. In questi esperimenti le cellule sono state raccolte in 350 μ l di buffer di lisi Qiazol (Qiagen) e conservate a -80°C . Per verificare la significatività statistica dei dati mediante l'analisi della varianza, sono state controllate la normalità e l'omogeneità della varianza di tutte le variabili utilizzando il test di Shapiro-Wilk ed il test di Levene, rispettivamente. Nei casi in cui entrambe le condizioni erano verificate, è stata effettuato il one-way ANOVA seguito dal post hoc test di Tukey. Le differenze con valori di $p < 0,05$ sono state considerate significative, e sono indicate nelle figure con lettere diverse. L'analisi statistica è stata effettuata con il software XLSTAT di Excel (Office 2010).

Risultati. La **Figura 10** mostra i dati relativi alla fosforilazione della subunità p65 della proteina NF-kB analizzata mediante Western blot dopo trattamento con CAR1 (**Figura 10A**) e HERAC5 (**Figura 10B**) alla concentrazione di 0,02%. I risultati indicano che il TNF- α induceva l'attivazione di NF-kB, come mostrato dall'incremento della fosforilazione di p65 di circa due volte rispetto al controllo non trattato (C) (**Figura 10A e 10B**). Il trattamento con CAR1 non induceva un incremento significativo della fosforilazione della proteina p65, suggerendo che tale olio non causava infiammazione (**Figura 10A**). Inoltre, nelle cellule pretrattate con CAR1 e successivamente con TNF- α si osservava una tendenza alla riduzione della fosforilazione di p65 ($p= 0.084$) rispetto alle cellule trattate solamente con TNF- α , ipotizzando un ruolo protettivo di CAR1 in seguito ad uno stress infiammatorio. Ulteriori esperimenti saranno necessari per valutare meglio l'effetto di CAR1 sull'induzione della cascata infiammatoria NF-kB dipendente.

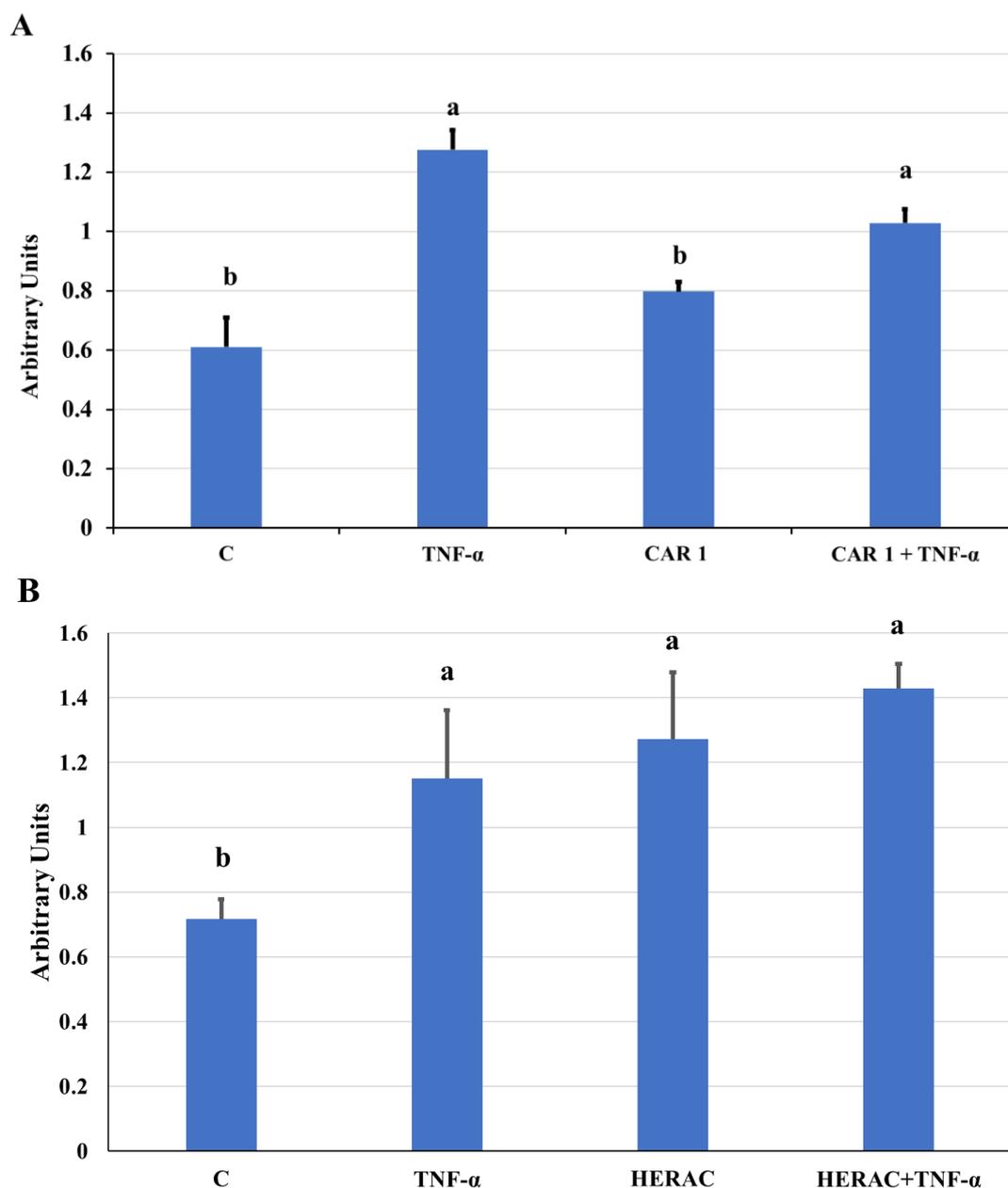


Figura 10. Attivazione di NF- κ B attraverso valutazione dello stato di fosforilazione della subunità p65 analizzata mediante Western blot in cellule Caco-2 incubate per 16 h con CAR1 (A) o HERAC5 (B) allo 0,02% per 16 ore, in presenza o meno di TNF- α . C= controllo non trattato. I dati sono espressi come unità arbitrarie date dal rapporto delle densità delle bande ottenute dall'analisi della proteina p65 fosforilata rispetto alla sua forma non fosforilata \pm deviazione standard. Le differenze con valori di $p < 0,05$ sono considerate significative, e sono indicate con lettere diverse.

Diversamente da CAR1, il trattamento con HERAC5 (**Figura 10B**) induceva un aumento statisticamente significativo della fosforilazione di p65 rispetto al controllo; tale incremento risultava paragonabile a quello indotto da TNF- α , indicando che la presenza di HERAC5 induceva l'attivazione della cascata NF-kB e non era in grado di offrire protezione in seguito allo stimolo infiammatorio, come confermato dall'aumento dello stato di fosforilazione di p65 nelle cellule pretrattate con HERAC5 e successivamente con TNF- α .

Per valutare, ulteriormente, l'effetto degli oli essenziali CAR1 ed HERAC5 in seguito a stimolo infiammatorio con TNF- α , è stata analizzata l'espressione genica di cIAP2 mediante real time PCR. Come mostrato in **Figura 11**, il TNF- α induceva l'espressione del gene target di 3 volte rispetto al controllo non trattato. Nonostante gli oli essenziali da soli non abbiano indotto l'aumento di espressione di cIAP2, non è stato osservato alcun effetto di CAR1 ed HERAC5 nel ridurre la sua trascrizione in seguito a stimolo infiammatorio, infatti i livelli del gene target risultavano paragonabili o addirittura superiori (vedi CAR1+TNF- α) rispetto a quelli di TNF α . Dunque i due oli essenziali CAR1 e HERAC5 non hanno mostrato effetti nel regolare l'espressione del gene target analizzato, tuttavia è necessario approfondire con ulteriori esperimenti sia per valutare la loro azione su altri geni coinvolti nel pathway di NF-kB, sia per spiegare l'apparente discrepanza rilevata nei dati relativi allo stato di fosforilazione della subunità p65 di NF-kB.

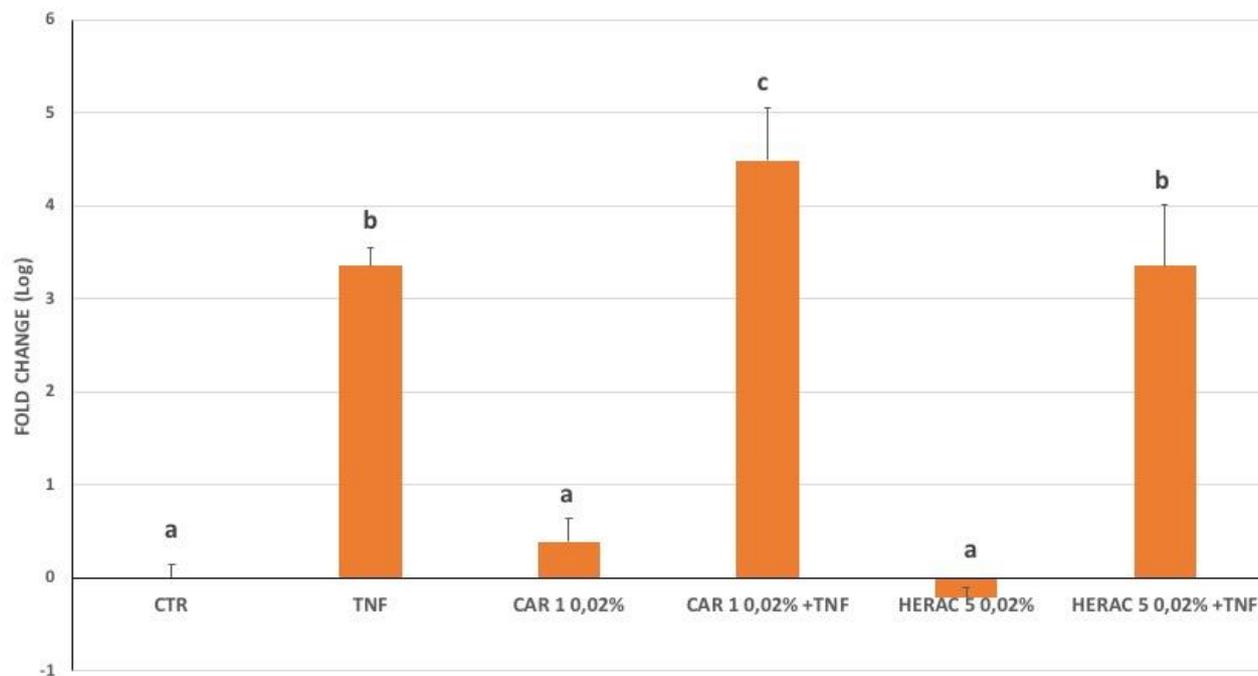


Figura 11. Studio dell'espressione di cIAP2 mediante real-time PCR. Le cellule intestinali Caco-2 sono state trattate 2 h con $\text{TNF}\alpha$ 15 ng/ μl (TNF) da solo o in presenza di CAR1 o HERAC5 allo 0,02%. I dati sono espressi come Fold Change (Log) \pm deviazione standard. Le differenze con valori di $p < 0,05$ sono considerate significative, e sono indicate con lettere diverse.

REFERENZE

Alphen L.B., Burt S.A., Veenendaal A.K.J., Bleumink-Pluym N.M.C., van Putten J.P.M. The Natural Antimicrobial Carvacrol Inhibits *Campylobacter jejuni* Motility and Infection of Epithelial Cells, PLoS ONE 2012, 7(9): e45343. doi: 10.1371/journal.pone.0045343

Dal Sasso M., Maria Culici M., Pier C. Braga P.C., Guffanti E.E., Mucci M. Thymol: Inhibitory Activity on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Adhesion to Human Vaginal Cells. J Essential Oil Research 2006, 18(4): 455-461. doi: 10.1080/10412905.2006.9699140

Di Vito M., Cacaci M., Barbanti L., et al. *Origanum vulgare* Essential Oil vs. a Commercial Mixture of Essential Oils: In Vitro Effectiveness on *Salmonella* spp. from Poultry and Swine Intensive Livestock. Antibiotics (Basel) 2020, 9(11):763. doi: 10.3390/antibiotics9110763

Dusan F., Sabol M., Domarack K. Essential oils: their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. Toxicology in Vitro 2006, 20(8): 1435-1445. doi: 10.1016/j.tiv.2006.06.012

Džamić A., Nikolić B., Giweli A., Mitić-Ćulafić D., Soković M., Ristić M., Knežević-Vukčević J., Marin, P. Libyan *Thymus capitatus* essential oil: antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and colon pathogen adhesion-inhibition properties. J Appl Microbiol 2015, 119: 389-399. doi: 10.1111/jam.12864

Grosse CSJ, Christophersen CT, Devine A, Lawrance IC. The role of a plant-based diet in the pathogenesis, etiology and management of the inflammatory bowel diseases. Expert Rev Gastroenterol Hepatol. 2020, 14(3):137-145. doi: 10.1080/17474124.2020.1733413

Llana-Ruiz-Cabello M., Gutierrez-Praena D., Pichardo S., Javier Moreno F., J.M. Bermandez, Aucejo S., Camean A.M. Cytotoxicity and morphological effects induced by carvacrol and thymol on the human cell line Caco-2. Food Chem Toxicol 2014, 64: 281-290. doi: 10.1016/j.fct.2013.12.005

Rizzello F, Spisni E, Giovanardi E, et al. Implications of the Westernized Diet in the Onset and Progression of IBD. Nutrients. 2019;11(5):1033. doi:10.3390/nu11051033

Sharon N., Ofek I. Fighting Infectious Diseases with Inhibitors of Microbial Adhesion to Host Tissues. Critical Rev, Food Sci Nutr 2002, 42: S3, 267-272. doi: 10.1080/10408390209351914

Upadhyay A., Johny A.K., Amalaradjou A.M.R., Baskaran S.A., Kim K.S., Venkitanarayanan K. Plant-derived antimicrobials reduce *Listeria monocytogenes* virulence factors in vitro, and down-regulate expression of virulence genes. *International J Food Microbiol* 2012, 157(1): 88-94. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.018