

Attività antibatterica e antinfiammatoria di estratti di *Helichrysum litoreum* Guss. (Asteraceae)

M. GUIDA¹, G. MELLUSO², S. SCHERILLO¹, D. SANTAFEDE¹, P. CASORIA³, P. SANTORO⁴

¹Dipartimento delle Scienze Biologiche, Sezione di Fisiologia ed Igiene, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Mezzocannone 16, I-80134 Napoli, Italia; ²Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Cinthia, I-80141 Napoli, Italia;

³Dipartimento di Scienze per l'Ambiente, Università degli Studi di Napoli "Parthenope", Via De Gasperi 5, I-80133 Napoli, Italia; ⁴Dipartimento di Pediatria, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Pansini, I-80131 Napoli, Italia

marguida@unina.it paolo.casoria@libero.it

Riassunto. È stata confermata l'attività antibatterica e dimostrata l'attività antinfiammatoria di estratti di piante di *Helichrysum litoreum* (Asteraceae) raccolte sul Vesuvio (Campania, Italia). Gli estratti in etanolo:acqua (70:30) hanno determinato la massima attività antibatterica. Gli estratti in etanolo:acqua (70:30) o in solo etanolo hanno determinato la massima attività antinfiammatoria. Tali risultati appaiono di interesse farmacologico.

Abstract. Extracts of *Helichrysum litoreum* (Asteraceae) plants from Vesuvio (Campania, Italy) obtained by using different solvents were used to confirm antimicrobial activity and to test anti-inflammatory activity. Maximum antimicrobial activity by extracts in ethanol-water (70:30) and maximum anti-inflammatory activity by extracts in ethanol-water (70:30) or absolute ethanol were measured. Results appear to be of pharmacological interest.

Key words: Anti-inflammatory activity, Antimicrobial activity, *Helichrysum litoreum*

INTRODUZIONE

Helichrysum litoreum Guss. (Asteraceae) è stato descritto per la prima volta in Italia nelle Isole Eolie (GUSSONE 1843). È una specie erbacea perenne, con foglie rigorosamente lineari, ottuse, di 30-60 mm di lunghezza. Può svilupparsi nelle crepe delle rocce esposte al mare o in terreni poveri e soggetti ad erosione. È molto resistente ai venti marini e fiorisce a lungo. Oggi questa specie si sviluppa abbondantemente sul pendio di SW del Vesuvio (Napoli) (RICCIARDI *et al.* 1986).

È stato dimostrato che gli estratti di *H. litoreum* hanno proprietà antibatteriche (GUIDA *et al.* 1999). Il presente lavoro presenta i risultati ottenuti in una ricerca mirante a confermare l'attività antibatterica e a verificare l'attività antinfiammatoria di estratti di questa specie.

MATERIALI E METODI

Piante di *H. litoreum* sono state raccolte sui

pendii del Vesuvio (Napoli) nel Luglio del 2000. Gli estratti sono stati ottenuti dai fusti e da giovani foglie. Per la preparazione degli estratti, 100 g di foglie e fusti tagliati, dopo essere stati portati a secco in stufa a 40 °C per 24 h, sono state poste per 10 min nel solvente di estrazione in proporzione di 1:10 (p/v). Sono stati utilizzati tre diversi solventi: EtOH-H₂O (70:30), EtOH, H₂O distillata; sono stati ottenuti pertanto tre tipi di estratti, denominati Campione 1, Campione 2 e Campione 3 (Tab. 1). Il preparato ottenuto per ciascun Campione è stato filtrato attraverso vari strati di garza ed il liquido risultante centrifugato a 5000 rpm per 5 min. Il supernatante è stato successivamente portato a secco in un Rotavapor, a 40-50 °C, alla pressione di 0,2 atm.

L'attività antibatterica è stata verificata usando solo l'estratto che ha precedentemente mostrato attività antibatterica (Campione 1) (GUIDA *et al.* 1999). Tale Campione è stato sottoposto a tre differenti procedure, come più avanti illustrato. L'attività antinfiammatoria è

Tab. 1 - Solventi usati per l'estrazione e loro resa

N. Campione	Solvente di estrazione	Resa (g)
1	EtOH-H ₂ O (70:30)	13,3
2	EtOH	9,16
3	H ₂ O distillata	1,45

stata verificata usando i tre tipi di estratti (Campioni 1, 2 e 3).

Attività Antibatterica

L'attività antibatterica è stata verificata su ceppi di batteri Gram+ con la prova della diffusione in agar, secondo il metodo di Kirby-Bauer (BAUER *et al.* 1966). La lista dei ceppi batterici utilizzati è riportata nella Tab. 2.

Il Campione 1 (Tab. 1) è stato sottoposto a tre differenti trattamenti, ottenendo tre soluzioni utilizzate per le prove. A tal riguardo, 0,15 g del Campione 1 sono stati risospesi in 15 ml di acqua distillata sterile; la soluzione ottenuta è stata centrifugata a 4000 rpm per 20 min e il supernatante è stato usato come Soluzione 1. La frazione insolubile in acqua è stata risospesa in 1 ml di etanolo ed è stata centrifugata a 4000 rpm per 10 min; il supernatante è stato diluito 1:100 in acqua distillata sterile ed usato come Soluzione 2. Infine, 0,15 g del Campione 1 sono stati risospesi in 10 ml della soluzione dell'estrazione (etanolo-acqua 70:30) ottenendo la Soluzione 3.

Attività Antinfiammatoria

Molti autori (DAVIES & ZAINI 1985; IHANTOLA-VORMISTO *et al.* 1997; VAZQUEZ *et al.* 1996) hanno studiato gli effetti di estratti di piante sulle funzioni dei leucociti polimorfonucleati (PMN) e in special modo sulla chemiotassi. I granulociti sono la prima difesa contro le infezioni causate dai funghi e batteri. Quando è presente una infiammazione i granulociti migrano verso il centro di infezione, in cui, attivati dagli agenti batterici, uccidono o inattivano i batteri. L'attività antinfiammatoria di una determinata sostanza può manifestarsi in modi differenti: per esempio, attraverso la chemiotassi, che fa diminuire il numero di cel-

lule in grado di arrivare al luogo di infezione (BOREL 1973; HUY *et al.* 1985; RHODES *et al.* 1981; ROCH-ARVEILLER *et al.* 1990; SPISANI *et al.* 1979).

Per la preparazione del neutrofilo, i PMN sono stati isolati da sangue venoso con eparina (20 U/ml) ottenuta da donatori sani. Il sangue è stato stratificato su Ficoll-Hypaque e centrifugato a 2000 rpm per 35 min, per rimuovere i mononucleociti. La fase più bassa, contenendo eritrociti e neutrofili, è stata aggiunta alla soluzione fisiologica fino a raggiungere il volume iniziale e in seguito mescolato a destrano 6% (p.m. 480000), nel rapporto 2:1 (sangue-destrano). Le cellule sono state lasciate alla temperatura ambiente per 45 min per separare i neutrofili dagli eritrociti che si erano depositati. Il supernatante, contenente i granulociti, è stato centrifugato, lavato una volta e gli eritrociti sono stati eliminati con lisi ipotonica con una soluzione di NaCl 0.2% per 30 sec. Ai granulociti restanti è stato poi aggiunto NaCl 1.6% nel rapporto 1:1 per portare la soluzione di nuovo all'isotonicità iniziale. Queste cellule sono state quindi lavate due volte e risospese alla concentrazione finale di 1×10^6 /ml in RPMI/FCS 10%. Le sospensioni di PMN ottenute usando questa tecnica sono risultate >95% pure e 98% vitali come determinati dal test del trypan-blu.

Le prove relative all'attività antinfiammatoria sono state effettuate sui 3 Campioni di *H. litoreum* (Tab. 1). A tale scopo, 23 mg sono stati prelevati da ogni estratto secco e risospesi in 230 ml di terreno di coltura (RPMI). Le soluzioni ottenute sono state centrifugate a 13000 rpm, per 30 sec. Il supernatante è stato usato per le prove di chemiotassi. La frazione insolubile nel terreno è stata risospesa in 100 ml di etanolo puro e centrifugata per 5 min a 20000 rpm e il nuovo supernatante, diluito con il terreno di coltura, è stato ugualmente usato per le prove di chemiotassi.

I test di chemiotassi sono stati effettuati in camere di Boyden, nel compartimento inferiore, in cui è stato introdotto il chemioattraente fMLP (SCHIFFMANN *et al.* 1975) alla concentrazione di 10^{-7} M, e nel compartimento superiore, dove i neutrofili sono stati introdotti con diluizioni differenti dell'estratto di *H. litoreum*. I due compartimenti della camera di

Boyden sono separati da una membrana di policarbonato di 3 µm (MILLIPORE). Le camere di Boyden sono state incubate per 45 min, a 37 °C, in atmosfera umidificata contenente CO₂ 5%. Dopo il periodo di incubazione si può stabilire in base al numero di cellule migrate nel compartimento inferiore, attraverso la membrana, se l'estratto ha inibito o meno la chemiotassi dei PMN. Alla fine dell'incubazione le membrane sono state lavate e colorate con MayGrunwald/Giemsa. Le cellule fissate alla parte inferiore della membrana sono state contate ad un ingrandimento 1000X, scegliendo 5 zone a caso. Le cellule cadute nello scompartimento inferiore sono state raccolte ed addizionate al numero totale dei PMN migrati. I risultati sono stati normalizzati considerando che la chemiotassi è stimolata dal fMLP (= 100%) e dal controllo (= 0%).

Le prove di tossicità sono state eseguite usando il trypan blu, un colorante in grado di attraversare la membrana delle cellule non

vitali, per verificare gli effetti specifici non tossici dell'estratto ed escludere che l'inibizione della chemiotassi fosse dovuta alla tossicità dell'estratto stesso. In queste prove i tre campioni a diluizioni differenti, sia in acqua sia in alcool, sono stati mescolati con i PMN e incubati a 37 °C per 1 h. Dopo di ciò, parte della sospensione, contenente PMN e l'estratto, è stato colorato con trypan blu 0,2% e le cellule sono state contate in una camera di Burker usando un microscopio a 40X. La percentuale di cellule morte si calcola dividendo il numero totale di cellule morte per il numero totale di cellule sia vive sia morte.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Attività Antibatterica

I risultati di queste prove sono presentati nella Tab. 2. Il Campione 1 ha presentato attività antibatterica, con un'inibizione massima

Tab. 2 – Risultati della verifica dell'attività antibatterica di estratti di *H. litoreum*.

Vengono indicati i ceppi batterici, le concentrazioni delle colture utilizzate (indicate come CFU/ml) e il diametro degli aloni di inibizione per ciascuna delle tre Soluzioni (v. testo) del Campione 1 (Tab. 1). I dati rappresentano la media di 3 prove.

Ceppo batterico	CFU/ml	Alone di inibizione (mm)		
		Soluzione 1	Soluzione 2	Soluzione 3
<i>Bacillus cereus</i>	4.5 x 10 ⁶	0	17.0	16.5
<i>B. cereus</i>	4.5 x 10 ⁵	0	19.0	17.0
<i>B. cereus</i>	4.5 x 10 ⁴	0	19.5	19.0
<i>B. cereus</i>	4.5 x 10 ³	Effetto batteriostatico	20.0	19.0
<i>Bacillus subtilis</i>	3.8 x 10 ⁶	0	20.0	17.0
<i>B. subtilis</i>	3.8 x 10 ⁵	0	21.5	17.5
<i>B. subtilis</i>	3.8 x 10 ⁴	Effetto batteriostatico	23.5	19.0
<i>B. subtilis</i>	3.8 x 10 ³	Effetto batteriostatico	26.0	22.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.4 x 10 ⁶	0	15.0	17.5
<i>S. aureus</i>	2.4 x 10 ⁵	0	15.5	18.0
<i>S. aureus</i>	2.4 x 10 ⁴	0	16.5	23.5
<i>S. aureus</i>	2.4 x 10 ³	0	16.5	24.0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1 x 10 ⁶	0	Effetto batteriostatico	15.4
<i>S. epidermidis</i>	1 x 10 ⁵	0	Effetto batteriostatico	16.0
<i>S. epidermidis</i>	1 x 10 ⁴	0	13.0	16.5
<i>S. epidermidis</i>	1 x 10 ³	0	14.5	17.3
<i>Sarcina lutea</i>	2 x 10 ⁶	0	14.0	16.6
<i>S. lutea</i>	2 x 10 ⁵	0	14.0	16.7
<i>S. lutea</i>	2 x 10 ⁴	0	14.3	16.7
<i>S. lutea</i>	2 x 10 ³	0	15.7	19.7
<i>Sarcina subflava</i>	7.5 x 10 ⁶	0	15.0	19.0
<i>S. subflava</i>	7.5 x 10 ⁵	0	16.0	22.5
<i>S. subflava</i>	7.5 x 10 ⁴	0	16.0	23.0
<i>S. subflava</i>	7.5 x 10 ³	0	16.5	28.5

dello sviluppo di Gram+ dopo essere risospeso nello stesso solvente dell'estrazione (Soluzione 3); ha presentato un'inibizione significativa quando risospeso nel solo etanolo (Soluzione 2); non ha mostrato alcuna attività antibatterica quando è stato risospeso in acqua distillata (Soluzione 1); in quest'ultimo caso è rilevabile solo un effetto batteriostatico su *Bacillus cereus* e *B. subtilis*.

Quanto risultato nel presente lavoro relativamente alla Soluzione 3 del Campione 1 (Tab. 1) conferma i risultati ottenuti da GUIDA *et al.* (1999), che hanno verificato l'attività antibatterica di estratti in EtOH-H₂O (70:30) di *H. litoreum*. I valori in generale inferiori risultati nel presente lavoro rispetto a quelli ottenuti da GUIDA *et al.* possono essere attribuiti al diverso periodo di raccolta delle piante, allo stato fisiologico delle piante o anche alle piccole differenze nelle procedure di preparazione, estrazione ed analisi.

Appare comunque chiaro che gli estratti di *H. litoreum* mostrano sempre in maniera evidente la loro attività antibatterica. Tale proprietà, finora nota a livello di medicina popolare o per esperimenti *in vitro* per varie specie di *Helichrysum* (MEYER & AFOLAYAN 1995; MEYER & DILIKA 1996), spinge a considerare in maniera sempre più attenta questo genere per le sue interessanti applicazioni nel campo farmacologico.

Attività Antinfiammatoria

L'estratto in acqua (Campione 3) non ha

mostrato alcuna inibizione significativa della chemiotassi, mentre l'estratto in etanolo (Campione 2) è risultato capace di inibire la chemiotassi ad una diluizione 1:10 (una volta risospeso nel terreno di coltura) e ad una diluizione di 1:100 (quando il residuo insolubile è stato risospeso in etanolo puro). L'estratto acquoso del Campione 1 è risultato tossico per i PMN quando è più concentrato (diluizione 1:2), come si può osservare dai valori ottenuti dal test con il trypan blue. Per questo motivo l'inibizione della chemiotassi verificatasi alle diluizioni 1:4 e 1:6 appare dovuta effettivamente all'interazione di qualche principio attivo, contenuto nell'estratto, con i PMN. Aumentando ulteriormente la diluizione (1:20) l'estratto risulta così poco concentrato da perdere i suoi effetti. Anche l'estratto alcolico del Campione 1 non risulta tossico per i PMN; però, in questo caso, si può osservare, alla diluizione 1:100, l'inibizione della chemiotassi.

Come commentato per l'attività antibatterica di *H. litoreum*, appare chiaro che estratti di questa specie risultano interessanti anche per una loro applicazione nel campo farmacologico come antinfiammatori. Tale attività, non riportata in letteratura, rende *H. litoreum* particolarmente interessante se associata a quella antibatterica.

Sperimentazioni miranti alla verifica *in vivo* di tale doppia attività sono auspicabili e gli autori si prefiggono di proporre verifiche a tal riguardo.

LETTERATURA CITATA

- BAUER A.W., KIRBY W.M., SHERRIS J.C., TURCK M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45 (4): 493-496.
- BOREL J.F. 1973. Effect of some drugs on the chemotaxis of rabbit neutrophils *in vitro*. *Experientia* 29 (6): 676-678.
- DAVIES R.R., ZAINI F. 1985. Antifungal drugs affecting the chemotaxis of polymorphonuclear neutrophils. *Sabourau-dia* 23 (2): 119-123.
- GUIDA M., CASORIA P., GUARINO C., MELLUSO G. 1999. Preliminary report on antimicrobial activity of *Helichrysum litoreum* Guss. *Bollettino Chimico Farmac.* 138 (7): 369-373.
- GUSSONE G. 1843. *Florae Siculae Synopsis*. Vol. II, Pars I. Biblioteca dell'Orto Botanico di Napoli.
- HUY D.P., ROCH-ARVEILLER M., MUNTANER O., GIROUD J.P. 1985. Effect of some anti-

- inflammatory drugs on FMLP-induced chemotaxis and random migration of rat polymorphonuclear leukocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 111 (2): 251-256.
- IHANTOLA-VORMISTO A., SUMMANEN J., KANKAANRATA H. 1997. Anti-inflammatory activity of extracts from leaves of *Phyllanthus emblica*. *Planta Medica* 63: 518-24.
- MEYER J.J.M., AFOLAYAN A.J. 1995. Antibacterial activity of *Helichrysum aureonitens* (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol.* 47: 109-111.
- MEYER J.J.M., DILIKA F. 1996. Antibacterial activity of *Helichrysum pedunculatum* used in circumcision rites. *J. Ethnopharmacol.* 53: 51-54.
- RHODES J.M., BARTHOLOMEW T.C., JEWELL D.P. 1981. Inhibition of leucocyte motility by drugs used in ulcerative colitis. *Gut.* 22 (8): 642-647.
- RICCIARDI M., APRILE G.G., LA VALVA V., CAPUTO G. 1986. La flora del Somma-Vesuvio. *Boll. Soc. Natur. Napoli* 96: 3-121.
- ROCH-ARVEILLER M., HUY D.P., MAMAN L., GIROUND J.P., SORENSON J.R. 1990. Non-steroidal anti-inflammatory drug-copper complex modulation of polymorphonuclear leukocyte migration. *Biochem. Pharmacol.* 39 (3): 569-574.
- SCHIFFMANN E., CORCORAN B.A., WOHL S.M. 1975. N-formyl-methionyl peptides as chemoattractants for leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (3): 1059-1062.
- SPISANI S., VANZINI G., TRANIELLO S. 1979. Inhibition of human leucocytes locomotion by anti-inflammatory drugs. *Experientia* 35 (6): 803-804.
- VAZQUEZ B., AVILE G., SEGURA D., ESCALANTE B. 1996. Anti-inflammatory activity of extracts from *Aloe vera* gel. *J. Ethnopharmacol.* 55 (1): 66-75.

Finito di stampare nel mese di ottobre 2007

