



Unione Europea



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

Dottorato di ricerca in
Biochimica e patologia dell'azione dei farmaci
X ciclo nuova serie
2008-2012

Chimica e attività biologica di specie del genere *Hypericum*

Dottorando	Aurelio Marandino
Tutor	Ch.mo Prof. Vincenzo De Feo
Coordinatore	Ch.mo Prof. Antonietta Leone

Ai miei genitori

INDICE

RIASSUNTO	pag	1
ABSTRACT	pag	3
INTRODUZIONE	pag	5
SCOPO DELLA TESI	pag	6
<i>Hypericum perforatum</i> L.	pag	7
1.1 Descrizione botanica di <i>Hypericum perforatum</i>	pag	7
1.2 I principali componenti presenti nel genere <i>Hypericum</i>	pag	7
1.3 Proprietà medicinali ed utilizzi terapeutici	pag.	8
1.4 Precauzioni d'uso, effetti collaterali ed efficacia terapeutica	pag	9
1.5 Meccanismo d'azione proposto	pag	11
1.5.1 Ruolo dell'iperforina nell'attività antidepressiva	pag	11
1.5.2 Effetto dell'iperforina sulla conduttanza ionica	pag	12
1.5.3 Ruolo dei flavonoidi nell'attività farmacologica	pag	13
<i>Hypericum connatum</i> Lam.	pag	14
2.1 Descrizione botanica	pag	14
2.2 Usi popolari e stato dell'arte	pag	15
<i>Hypericum hircinum</i> L.	pag	17
3.1 Descrizione botanica	pag	17
3.2 Usi popolari e stato dell'arte	pag	17
<i>Hypericum perforatum</i> L.	pag	19
4.1 Descrizione botanica	pag	19
4.2 Usi popolari e stato dell'arte	pag	19
Risultati	pag	21
5.1 Studio fitochimico di <i>H. connatum</i>	pag	21
5.2 Composizione polifenolica e attività scavenging	pag	21
5.3 Composizione chimica degli oli essenziali e attività fitotossica	pag	23
5.4 Attività antidepressiva	pag	31
5.5 Attività antimicrobica	pag	35
5.6 Attività antiquorum sensing	pag	40

5.7 Ricerca dei cardenolidi e attività cardiotonica	pag 41
Conclusioni	pag 42
Materiali e metodi	pag 45
6.1 Materiale vegetale	pag 45
6.1.1 Estrazione	pag 45
6.1.2 Purificazione dell'estratto etanolic.....	pag 45
6.1.3 HPLC	pag 45
6.1.4 NMR	pag 46
6.1.5 Purificazione degli estratti cloroformici	pag 48
6.1.6 Cromatografia su strato sottile	pag 48
6.1.7 Purificazione degli estratti metanolici.....	pag 48
6.1.8 Estrazione olio essenziale	pag 48
6.1.9 GC	pag 48
6.1.10GC/MS	pag 49
6.1.11 Identificazione composti	pag 49
6.2 Test biologici	pag 49
6.2.1 Analisi colorimetrica e composizione polifenolica	pag 49
6.2.2 Attività antiossidante	pag 50
6.2.3 Attività fitotossica	pag 50
6.2.4 Analisi dei dati	pag 51
6.3 Saggi biologici <i>in vivo</i>	pag 51
6.3.1 Animali	pag 51
6.3.2 Preparazione delle sospensioni	pag 51
6.3.3 Procedura di stress acuto	pag 51
6.3.4 Procedura di stress cronico	pag 52
6.3.5 Effetto protettivo sulle conseguenze comportamentali da stress ..	pag 52
6.3.6 HPLC.....	pag 52
6.3.7 NMR	pag 52
6.3.8 Analisi dei dati	pag 54
6.4 Saggi biologici <i>in vitro</i>	pag 53
6.4.1 Attività antimicrobica	pag 53
6.4.2 Attività antiquorum sensing	pag 53
6.4.3 Analisi dei dati	pag 53
6.5 Ricerca cardenolidi e attività cardiotonica.....	pag 53
6.5.1 Saggi farmacognostici ..	pag 54
6.5.2 Animali	pag 54
6.5.3 Preparazione delle sospensioni	pag 54
6.5.4 ECG	pag 54

BIBLIOGRAFIA..... pag 55

RINGRAZIAMENTI

Lo scopo di questo progetto di ricerca è stato lo studio chimico e biologico di quattro specie del genere *Hypericum*: *H. perforatum* L., *H. connatum* Lam, *H. hircinum* L., *H. perforatum* L.

Nella prima fase, è stato identificato l'isoflavone genisteina, purificato dall'estratto etanolicco di *H. connatum* con tecniche cromatografiche e caratterizzato con spettroscopia NMR.

Inoltre, è stata analizzata la composizione polifenolica degli estratti etanolicco e in acetato di etile di *H. connatum*. Nonostante gli estratti abbiano esibito un profilo polifenolico simile, l'analisi UPLC ha rivelato la presenza selettiva di rutina e apigenina, nell'estratto etanolicco, e di acido caffeico, epicatechina e acido p-cumarico, nell'estratto in acetato di etile.

L'attività antiossidante degli estratti di *H. connatum* è stata valutata attraverso il metodo del radicale DPPH. I risultati hanno mostrato per l'estratto etanolicco un'attività antiossidante doppia rispetto a quella dell'estratto in acetato di etile, probabilmente per effetto del flavonoide rutina.

Mediante metodiche GC e GC/MS sono state studiate le composizioni chimiche degli oli essenziali di *H. perforatum*, *H. perforatum* e *H. hircinum*, spontanei nell'Italia meridionale. Nei tre oli sono stati identificati complessivamente 111 composti: 53 per l'olio essenziale di *H. hircinum* (93,7% dell'olio totale), 55 per *H. perforatum* (96,5% dell'olio totale) e 63 per *H. perforatum* (98,7% dell'olio totale). La frazione maggiormente rappresentata negli oli essenziali di *H. hircinum* e *H. perforatum* è stata quella sesquiterpenica, mentre, il monoterpene α -pinene e il fenolo timolo sono stati i composti più abbondanti nell'olio essenziale di *H. perforatum*.

Gli oli essenziali sono stati valutati *in vitro* anche per la loro potenziale attività fitotossica contro la germinazione e l'iniziale allungamento della radichetta di semi di *Raphanus sativus* e *Lepidium sativum*. Per quanto riguarda il crescione, la germinazione è stata significativamente inibita dall'olio essenziale di *H. hircinum*, ai dosaggi più alti testati, mentre l'allungamento iniziale della radichetta è stato significativamente inibito dagli oli essenziali di *H. perforatum* e *H. hircinum*. Per il ravanella, invece, nessuno degli oli testati ha mostrato attività significativa sulla germinazione, mentre, l'allungamento iniziale della radichetta è stato inibito dall'olio essenziale di *H. hircinum*, in misura maggiore, e dagli oli di *H. perforatum* e di *H. perforatum*, in misura minore.

Un altro studio, condotto con il test di fuga, è stato svolto in due diversi periodi: nel primo periodo è stato valutato l'effetto protettivo della somministrazione acuta e cronica delle piante in esame sulle conseguenze comportamentali indotte nei ratti dallo stress inevitabile; nel secondo periodo è stato valutato l'effetto protettivo di due frazioni cromatografiche ottenute dall'estratto etanolicco dell'*H. connatum*. I ratti sono stati pre-testati e testati dopo trattamento acuto o cronico. In particolare, dai dati elaborati dopo trattamento acuto, l'estratto etanolicco di *H. connatum* è risultato significativamente attivo ad entrambe le dosi testate (0,5 g/kg p.v. per os, 1 g/kg p.v. per os), rispetto ai controlli. Inoltre, l'estratto di *H. perforatum* è risultato attivo solo alla dose di 0,5 g/kg p.v. per os; mentre l'estratto di *H. perforatum* è risultato attivo solo alla dose di 1 g/kg p.v. per os. L'estratto di *H. hircinum* è risultato, invece, privo di effetti significativi. Dai dati ottenuti per trattamento ripetuto, alla dose di 1 g/kg p.v. somministrata per os due volte al giorno per 14 giorni, tutti gli estratti testati sono risultati significativamente attivi, rispetto ai controlli. Dai dati elaborati nel secondo periodo, dopo trattamento acuto, entrambe le frazioni cromatografiche B e C di *H. connatum* somministrate per os, alla dose di 0,250 g/kg p.v., sono risultate significativamente attive. Successivamente, dalla frazione cromatografica C sono stati

purificati con HPLC tre composti che sono stati identificati con analisi NMR come isoquercetina, rutina e quercetina.

Inoltre, è stata verificata l'attività antimicrobica di tre specie di *Hypericum* (*H. connatum*, *H. hircinum*, *H. perforiatum*) contro due microrganismi patogeni emergenti (*Chromobacterium violaceum* e *Cronobacter sakazakii*). In particolare, gli estratti etanoliche di *H. connatum* e in etere di petrolio di *H. hircinum* sono risultati significativamente attivi nei confronti di *C. violaceum*, mentre gli estratti in etere di petrolio, cloroformio e miscela di cloroformio: metanolo (9:1) di *H. perforiatum*, e gli estratti in etere di petrolio e cloroformico di *H. hircinum* sono risultati significativamente attivi contro *C. sakazakii*.

Per la prima volta, è stata studiata l'attività antiquorum sensing degli estratti di *H. connatum* nei confronti di ceppi di *C. violaceum*. In particolare, l'estratto etanoliche, alla dose di 25 µg, ha inibito la produzione di pigmenti violacei (violaceina) prodotti dal *C. violaceum* e responsabili dell'attività quorum sensing, senza interferire con la crescita batterica.

Infine, con saggi farmacognostici è stata confermata la presenza di cardenolidi nell'estratto etanoliche di *H. connatum*, e mediante uno studio *in vivo* è stata verificata l'attività cardiotonica dell'estratto etanoliche *H. connatum*.

The aim of this research project was to study the chemical composition and biological activities of four species of the genus *Hypericum*: *H. perforatum* L., *H. connatum* Lam, *H. hircinum* L., *H. perforatum* L.

The isoflavone genistein, identified by NMR spectroscopy, was purified by chromatographic methods from an ethanol extract of *Hypericum connatum*.

The polyphenolic composition of an ethanol and an ethyl acetate extracts of *H. connatum* was studied. Even if the two extracts exhibited a similar polyphenol amount, UPLC analyses revealed a different profile, with a presence of rutin and apigenin in the ethanol extract, and of caffeic acid, epicatechin, *p*-coumaric acid in the ethyl acetate extract.

The scavenging activity of the extracts of *H. connatum* was evaluated by DPPH radical method. The ethanol extract showed antioxidant activity twice that of ethyl acetate, probably due to the presence of the flavonoid rutin.

The chemical composition of the essential oils of *H. perforatum*, *H. perforatum* and *H. hircinum* was analyzed by GC and GC/MS. In the three oils a total of 111 compounds were identified: 53 for the essential oil of *H. hircinum* (93.7% total oil), 55 for *H. perforatum* (96.5% total oil) and 63 for *H. perforatum* (98.7% total oil). The major fraction of the essential oils of *H. hircinum* and *H. perforatum* was constituted by sesquiterpenes while, the monoterpene, α -pinene, and the phenol, thymol, were the most abundant components in the essential oil of *H. perforatum*.

The oils were also evaluated for their potential *in vitro* phytotoxic activity against germination and early radicle elongation of *Raphanus sativus* and *Lepidium sativum*. The germination of this latter was significantly inhibited by the essential oil of *H. hircinum*, at the highest doses tested, whereas radicle elongation of garden cress was significantly inhibited by the essential oils of *H. perforatum* and *H. hircinum*. The radicle elongation of radish was inhibited by the essential oil of *H. hircinum*, in major extent, and by *H. perforatum* and *H. perforatum*, in minor measure.

Another study, conducted by the escape test, was carried out in two different periods: firstly it was evaluated the protective effect of acute and chronic administration of the plants about the behavior consequences in rats induced by unavoidable stress; in the second period it was evaluated the protective effect of two chromatographic fractions obtained from the ethanol extract of *H. connatum*. The rats were pre-tested and tested after acute or chronic treatment. In particular, from the data obtained after the acute treatment, the ethanol extract of *H. connatum* was significantly active at both doses tested (0.5 g/kg pv os, 1 g/kg pv os), compared to controls. Furthermore, the extract of *H. perforatum* was active at a dose of 0.5 g/kg pv os; while the extract of *H. perforatum* was active at the dose of 1 g/kg pv os. However, the extract of *H. hircinum* was showed no significant effects. From the data obtained for repeated treatment, at the dose of 1 g/kg pv administered orally twice a day for 14 days, all the extracts tested were significantly active, compared to controls. From the data processed in the second period, after acute treatment, both chromatographic fractions of *H. connatum* administered a dose of 0.250 g/kg pv os were significantly active. Subsequently, from the chromatographic fraction C three compounds were purified by HPLC and identified by NMR methods: isoquercetin, rutin and quercetin.

Moreover, the antimicrobial activity of the three *Hypericum* species (*H. connatum*, *H. hircinum*, *H. perforatum*) against two pathogenic emerging microorganisms (*Chromobacterium violaceum* and *Cronobacter sakazakii*) was verified. Particularly, the ethanol extract of *H. connatum* and the extract petrol of *H. hircinum* were significantly active against *C. violaceum*, while, both petrol extracts,

Abstract

chloroform and chloroform: methanol (9:1) extracts of *H. perfoliatum*; petrol and chloroform extracts of *H. hircinum* were significantly active against *C. sakazakii*.

For the first time, the activity anti-quorum sensing of extracts of *H. connatum* against strains of *C. violaceum* was studied. In particular, the ethanol extract, at a dose of 25 µg, inhibited the quorum sensing-regulated violacein pigment production, in *C. violaceum* tester strain, without interfering with its growth.

Finally, the presence of cardenolide glycosides in the ethanol extract of *H. connatum* has been demonstrated by chemical test. It has been also verified the cardiotoxic activity of the ethanol extract of *H. connatum*.

Introduzione

Con circa 470 specie, *Hypericum* Linneo (Linnaeus, 1753) (Guttiferae) è uno dei 100 generi di angiosperme di grandi dimensioni che rappresentano circa il 22% delle biodiversità delle angiosperme (Scotland, 2000). Negli ultimi anni, Robson ha proposto la classificazione in sezione di questo genere, fornendo anche un'ipotesi evolutiva (Robson, 2010 a,b). In Europa, le specie di *Hypericum* sono tipiche sia delle comunità vegetali calcaree (Butaye *et al.*, 2010) e sia dei paesaggi di pietra arenaria (Härtel e Markova, 2005). La flora vascolare italiana comprende 27 specie del genere *Hypericum*, di cui 12 spontanee nell'Italia meridionale (Pignatti, 1982).

La specie più studiata e impiegata in terapia è *H. perforatum* L. Attualmente, questa pianta medicinale è usata in diversi paesi per il trattamento della depressione ed è talvolta indicata come "erba prozac". Sebbene diversi studi hanno indagato il possibile meccanismo di azione (Müller *et al.*, 1997) (Butterweck *et al.*, 1997) dell'attività antidepressiva degli estratti di *H. perforatum*, poco ancora si conosce sull'effetto antidepressivo di altre specie di *Hypericum*. In particolare, uno studio (Gnerre *et al.*, 2001) condotto su specie spontanee del sud del Brasile ha dimostrato che alcune specie testate, tra cui *H. connatum*, sono risultate prive di effetto antidepressivo.

Alcune specie di *Hypericum* sono utilizzate in medicina tradizionale per le loro proprietà antifungine, antibatteriche, antivirali, anticancro.

Di altre specie è riportata in letteratura la loro composizione fenolica (Couladis *et al.*, 2002). L'importanza delle piante come risorsa naturale di polifenoli è supportata da studi epidemiologici, secondo cui il consumo di polifenoli è associato a un ridotto rischio di cancro, di malattie cardiovascolari, di asma e diabete.

Inoltre, esse si distinguono per altre proprietà biologiche come quella antinfiammatoria, antiossidante, antivirale e antimicrobica contro diversi patogeni (Cowan, 1999). L'estratto etanolic di *H. perforatum* è stato testato su ceppi di *S. aureus* meticillino-resistenti con lo scopo di valutarne l'attività antiquorum sensing, effetto in grado di limitare la produzione da parte dei batteri di fattori di virulenza e la loro successiva colonizzazione (Quave *et al.*, 2010).

Nonostante la distribuzione cosmopolita e l'ampio utilizzo in medicina tradizionale (Yazaki e Okuda, 1994), la composizione chimica del genere *Hypericum* è scarsamente conosciuta. Tuttavia, studi precedenti hanno dimostrato che le specie di *Hypericum* sono ricche di metaboliti secondari bioattivi (Avato, 2005). Alcuni studi pubblicati negli ultimi anni hanno investigato principalmente la composizione dell'olio essenziale di diversi *Hypericum*. Le frazioni volatili di *H. perforatum* L. provenienti da diversi paesi hanno evidenziato variazioni importanti nella loro composizione, probabilmente per effetto sia della loro diversa origine geografica che dallo stadio fenologico dei campioni (Schwob *et al.*, 2004; Radusiene *et al.*, 2005). Inoltre, l'olio essenziale è stato proposto come marcatore chimico sia per le sottospecie di *H. perforatum* (Maggi *et al.*, 2010) che per le diverse specie del genere (Nogueira *et al.*, 2008; Radulović *et al.*, 2010). Tuttavia, la chimica degli oli essenziali di altri *Hypericum* non è stata esaurientemente investigata, ed in particolare quella delle specie italiane. Recentemente, *H. perforatum* è stato segnalato per la sua attività fitotossica contro la germinazione di semi di *Amaranthus retroflexus* L. e di *Portulaca oleracea* L. (Azizi e Fuji, 2006). Un altro studio (Fritz *et al.*, 2007 a), ha riportato gli effetti di diversi estratti di *H. myrianthum* Cham. & Schldl. e *H. polyanthemum* Klotzch ex H. Reich. contro la germinazione di semi di lattuga.

Scopo della tesi

In questo lavoro sperimentale, sono state studiate quattro differenti specie di iperico (*H. perforatum*, *H. connatum*, *H. hircinum*, *H. perfoliatum*) con l'obiettivo di approfondire le conoscenze sulla composizione quali-quantitativa e sull'attività biologica dei metaboliti secondari, in esse contenuti. In particolare, gli obiettivi programmatici sono stati:

1. studio fitochimico di *H. connatum*;
2. identificare il profilo polifenolico degli estratti di *H. connatum* e verificarne l'attività antiossidante;
3. individuare la composizione chimica quali-quantitativa degli oli essenziali estratti dalle parti aeree di *H. perforatum*, *H. hircinum* e di *H. perfoliatum* e testarne l'attività fitotossica nei confronti di semi di *Raphanus sativus* e *Lepidium sativum*;
4. confrontare l'attività *in vivo* di quattro diverse specie di iperico: *H. connatum*, *H. hircinum*, *H. perfoliatum*, *H. perforatum*, rispetto ai controlli, con lo scopo di studiare l'effetto protettivo di *H. connatum* sulle conseguenze comportamentali indotte nel ratto dallo stress inevitabile e di fornire ulteriori dati circa il controverso effetto antidepressivo di *H. perfoliatum* e di *H. hircinum* descritto in letteratura;
5. ricercare una possibile attività antimicrobica *in vitro* degli estratti di *H. connatum*, *H. hircinum*, *H. perfoliatum* nei confronti di microrganismi selezionati, ed in particolare contro due microrganismi patogeni emergenti come *Chromobacterium violaceum* e *Cronobacter sakazakii*;
6. analizzare l'attività antiquorum sensing degli estratti di *H. connatum* verso ceppi di *C. violaceum*;
7. confermare la presenza di cardenolidi nella specie *H. connatum* con l'obiettivo di validare l'uso come cardiotonico in medicina tradizionale argentina e verificare *in vivo* l'attività cardiaca.

***Hypericum perforatum* L.**



Figura 1 - *Hypericum perforatum* L.

1.1 Descrizione botanica di *Hypericum perforatum*

Pianta perenne semisempreverde, originaria dell'Europa e dell'Asia; sviluppa lunghe ramificazioni striscianti o prostrate, che si allargano notevolmente, dando origine a larghi tappeti compatti, alti 25-35 cm; i fusti sottili, di colore marrone, sono coperti da lunghe foglie opposte, ovali, di colore verde scuro sulla pagina superiore, più chiare e biancastre sulla pagina inferiore; possono diventare rossastre in autunno. Dalla primavera inoltrata fino ai primi freddi autunnali produce grandi fiori di colore giallo oro, a stella, con vistosi stami gialli. L'iperico è una pianta che spesso si può trovare allo stato semiselvatico; nei giardini è possibile trovare anche *H. moserianum*, molto simile alla specie *H. perforatum*, e un ibrido diffusissimo, *H. hydrocotyle*, dal portamento arbustivo, che può raggiungere i 40-50 cm di altezza. Con il tempo tende a divenire infestante; si consiglia quindi di contenerne la crescita, anche con potature drastiche in autunno.

1.2 I principali componenti presenti nel genere *Hypericum*

Derivati naftodiantronici: ipericina, pseudoipericina e loro protoforme;

Derivati del floriglucinosolo: iperforina, adiperforina;

Flavonoidi: iperoside, rutina, quercitrina, quercitina, isoquercitina;

Biflavoni: biapigenina, amentoflavone;

Xantoni;

Acidi fenolici: acidi caffeico, clorogenico, ferulico;

Tannini;

Aminoacidi;

Vitamine A, C;

Terpeni.

Gli estratti di iperico contengono molti costituenti dotati di attività biologica, prime fra tutte l'attività antidepressiva. Non è ancora possibile attribuire la modalità d'azione antidepressiva ad alcuno di essi, per cui la caratterizzazione degli estratti è

stata definita sulla base delle tipiche sostanze prevalenti, in particolar modo delle ipericine. Contiene non meno dello 0,04% di naftodiantrone, appartenente al gruppo delle ipericine (la cosiddetta ipericina totale). Si pensa che le sostanze maggiormente implicate nell'azione antidepressiva siano proprio le ipericine e i flavonoidi. L'ipericina ha dimostrato, inoltre, di possedere promettenti proprietà antitumorali ed è stata provata *in vitro* la sua capacità di inibire la crescita dei gliomi, dei tumori polmonari e dei tumori cutanei. Le sue proprietà fotodinamiche possono favorire l'uso dell'iperico in combinazione con il laser nel trattamento fotodinamico del cancro.

1.3 Proprietà medicinali ed utilizzi terapeutici

Hypericum perforatum è una specie molto utilizzata nell'ambito della medicina tradizionale e dell'erboristeria per via delle sue interessanti applicazioni curative. Si tratta infatti di una pianta ad azione antibatterica ed antinfiammatoria, ma che soprattutto si fa apprezzare per le sue proprietà ansiolitiche ed antidepressive che permettono terapie alternative ai farmaci di sintesi.

Studi effettuati in Germania, in particolare, hanno dimostrato come l'utilizzo di iperico nell'ambito del trattamento della depressione presenti, a parità di efficacia, un elevato profilo di sicurezza e meno effetti collaterali rispetto a quelli originati dai farmaci di sintesi comunemente utilizzati (Gastpar *et al.*, 2006). Per questo, l'iperico viene utilizzato abbastanza comunemente per combattere casi di lieve depressione, come ad esempio quella dei bambini in età pediatrica e degli adolescenti. Altri studi hanno invece dimostrato che l'iperico non risulta essere efficace nel trattamento di pazienti che soffrono di distimia, una forma di depressione cronica (Randløv *et al.*, 2006).

Una recente ricerca pubblicata nel 2009, e svolta da un team di ricercatori spagnoli dell'Universidad Complutense de Madrid, ha suggerito che l'erba di San Giovanni, grazie agli antiossidanti contenuti, sia in grado di ridurre la progressiva degenerazione neuronale causata dal morbo di Parkinson (sitografia: http://www.ucm.es/info/otri/cult_cient/infocientifica/noti_feb_09_01.htm).

Un principio attivo contenuto nell'iperico, l'*iperforina*, è dotato di proprietà ansiolitiche ed antidepressive e può essere utile per il trattamento dell'alcolismo. L'estratto di iperico, analogamente agli antidepressivi tipo fluoxetina e imipramina, è risultato efficace nel ridurre il craving e l'intake di alcool nei pazienti. L'effetto è stato confermato sperimentalmente in ratti geneticamente alcool-preferenti (De Vry *et al.*, 1999).

La stessa molecola è nota per le sue proprietà antibatteriche nei confronti dei ceppi di batteri Gram negativi, anche se come nel caso precedente non sono ancora disponibili dati riguardanti la posologia e le soglie di tossicità. L'iperforina è anche dotata di azione antibiotica nei confronti di ceppi di *S. aureus* meticillino-resistenti (sitografia: <http://www.guidaconsumatore.com/erboristeria/iperico.html>).

L'iperico può essere considerato un valido aiuto per alleviare i sintomi fisici e psicologici dovuti alla sindrome premestruale, come evidenziato da una ricerca del 2010 effettuata dall'Istituto di Scienze Psicologiche dell'Università di Leeds, nel Regno Unito (Canning *et al.*, 2010).

L'erba di S. Giovanni è anche usata per il trattamento dell'ulcera gastrica (sitografia: <http://www.guidaconsumatore.com/erboristeria/iperico.html>).

L'olio essenziale ricavato dall'erba di San Giovanni è utilizzato comunemente per il trattamento topico di ustioni di primo grado, pruriti, scottature, abrasioni, ferite,

ulcerazioni, piaghe e tagli, grazie alle note proprietà antisettiche, astringenti ed antinfiammatorie.

1.4 Precauzioni d'uso, effetti collaterali ed efficacia terapeutica

Derivati di iperico sono in genere ben tollerati dall'organismo; gli effetti collaterali (Tabella 1), osservati in rari casi, consistono in affezioni gastrointestinali, senso di spossatezza, confusione e giramento di testa. Ancor più raramente sono stati segnalati casi di fotosensibilizzazione, causati dall'interazione dei principi attivi contenuti nell'iperico con la radiazione luminosa, sia visibile che ultravioletta. La luce associata con l'iperico causa la produzione di grandi quantità di radicali liberi, che possono danneggiare le cellule dell'epidermide e determinare la comparsa di scottature solari anche in condizioni di bassa luminosità. Gli stessi radicali liberi possono, inoltre, interagire con i tessuti dell'occhio e determinare la comparsa di cataratte (sitografia: <http://www.guidaconsumatore.com/erboristeria/iperico.html>).

Dal punto di vista delle interazioni farmacocinetiche, è stato dimostrato che l'iperforina e l'amentoflavone contenuti nell'erba di San Giovanni possono causare una maggiore metabolizzazione (e dunque un effetto simile al sovradosaggio) di diverse classi di farmaci. In altri casi, l'iperico interferisce con il metabolismo dei medicinali, diminuendone l'efficacia, mediante un effetto diretto sia sulla glicoproteina P, un trasportatore di farmaci intestinale (nel ratto e nell'uomo), aumentandone l'espressione, e sia sui citocromi epatici, CYP3A2 (nel ratto) e CYP3A4 (nell'uomo) (Dürr *et al.*, 2000).

L'erba di San Giovanni può anche causare la sindrome serotoninergica, una reazione avversa con (rare) conseguenze anche mortali causata dall'effetto additivo con medicinali (ad esempio inibitori MAO) che innalzano i livelli di serotonina del SNC (sitografia: <http://www.guidaconsumatore.com/erboristeria/iperico.html>).

In una rassegna di sei studi sull'iperico, riportata dal *British Medical Journal*, il 10,8% dei pazienti ha manifestato effetti collaterali con l'iperico (simili a quelli elencati sopra) contro il 35,9% di effetti collaterali nei pazienti trattati con farmaci antidepressivi tradizionali. Anche in base a questo valore, il *British Medical Journal* ha concluso che gli effetti collaterali dell'iperico sono "rari e di lieve entità" (sitografia: <http://oasiblu.com/old/iperico/hyp14.htm>).

Alcuni dei più preoccupanti effetti collaterali degli antidepressivi tradizionali, quali disfunzioni sessuali, interazioni negative con l'alcol o con altri farmaci, secchezza delle fauci, cefalea, non sono stati riscontrati nei pazienti trattati con l'iperico. Inoltre, gli effetti negativi dell'iperico si sono dissolti quando i pazienti ne hanno sospeso l'uso. Non sono dunque stati rilevati effetti collaterali "irreversibili": in altre parole, non si è verificato alcun danno permanente e tutti gli effetti nocivi sono scomparsi non appena i pazienti hanno smesso di assumere l'iperico. Per la bassa percentuale di effetti negativi, in particolare nelle dosi raccomandate per la cura della depressione, l'iperico è collocato nella categoria delle erbe, delle vitamine, dei minerali e dei farmaci "da banco".

Tabella 1 - Effetti collaterali riscontrati con l'uso di *H. perforatum*.

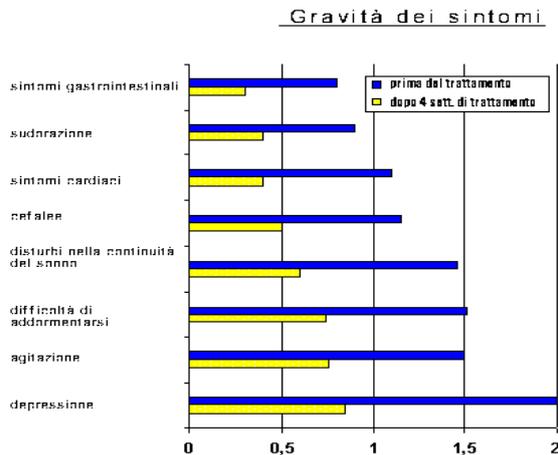
Effetti collaterali	N	%
Disturbi gastrointestinali	18	0,55
Reazioni allergiche	17	0,52
Stanchezza	13	0,40
Agitazione	8	0,26
Vertigini	15	0,15
Altre reazioni avverse	18	0,55
Totale	79	2,43

N = numero di persone trattate

Nella maggior parte degli studi, sia i sintomi depressivi (umore depresso, ansia, perdita di interesse, sensazione di inutilità, minore attività) che i sintomi secondari (disturbi del sonno, mancanza di concentrazione, disturbi fisici) sono migliorati significativamente con l'uso di iperico.

Le prove cliniche e le revisioni sistematiche indicano che l'erba di San Giovanni è efficace quanto gli antidepressivi convenzionali, per il trattamento di breve durata, contro i disordini depressivi (sitografia: <http://oasiblu.com/old/iperico/hyp14.htm>).

Tabella 2 - Efficacia dell'iperico su diversi sintomi patologici.



1.5 Meccanismo d'azione proposto

Il possibile meccanismo d'azione con cui l'estratto metanolico di iperico esercita i propri effetti biologici è rappresentato dall'inibizione sia degli enzimi MAO-A e MAO-B, ad alte concentrazioni (IC₅₀ 120 e 370 µg/ml, rispettivamente), e sia dell'uptake di numerosi neurotrasmettitori (5-HT, NA, DA) (Butterweck, 2003).

1.5.1 Ruolo dell'iperforina nell'attività antidepressiva

L'iperforina è un potente inibitore dell'uptake di 5-HT, DA, NA, GABA (IC₅₀ 50-100 ng/ml) e glutammato (IC₅₀ 500 ng/ml). Questo profilo non selettivo ha suggerito come meccanismo d'azione principale l'interferenza, tramite un aumento di Na⁺ intracellulare, dei trasportatori di membrana a cui si legano i neurotrasmettitori (Müller *et al.*, 2001).

Altri meccanismi ipotizzati riguarderebbero la deplezione delle vescicole contenenti 5-HT, la modulazione delle correnti di Ca²⁺ e l'influenza sui recettori sigma.

Gli esperimenti sugli animali e gli studi clinici condotti con estratti di iperico, a differenti concentrazioni in iperforina, hanno indicato che l'attività antidepressiva dipende dal contenuto di quest'ultima in modo dose-dipendente. Ne consegue che la standardizzazione corrente degli estratti di iperico, basata sul contenuto in ipericina, è ben poco correlata con l'efficacia clinica.

Un trattamento a lungo termine con estratto metanolico di iperico ha ridotto la densità dei recettori β-adrenergici (come i classici antidepressivi), mentre ha aumentato quella dei recettori serotoninergici nella corteccia frontale di ratto (Tabella 3).

Tabella 3 - Effetto dell'iperico a livello recettoriale (Müller *et al.*, 2001).

Trattamento	Recettori β-adrenergici	Recettori serotoninergici
Estr-MeOH di Iperico	↓ 16%	↑ 15%
Estr-CO₂ di Iperico	↓ 16%	↓ 11%
Imipramina	↓ 25%	↓ 15%

Nel 40-50% dei pazienti depressi è stata riscontrata una ipersecrezione di ACTH e di cortisolo plasmatico, valori che sono risultati normalizzati in seguito a terapia antidepressiva. L'estratto di iperico, influenzando negativamente la produzione di interleukina-6, può esercitare un'azione di normalizzazione sul sistema ipotalamo-ipofisi-surrene (Thiele *et al.*, 1994) (Figura 2).

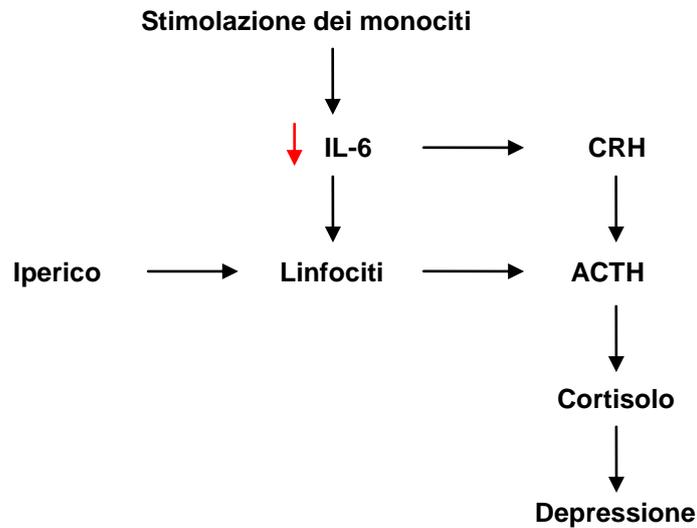


Figura 2 - Ipotetico meccanismo d'azione dell'iperico come modulatore dell'espressione delle citochine (sitografia: http://www.webalice.it/prati_50/IMNEGRI.PDF).

L'estratto di iperico ha mostrato attività ansiolitica in modelli sperimentali basati sulla valutazione del comportamento difensivo dell'animale, correlabile alla situazione di ansia generalizzata nell'uomo:

- test del labirinto sopraelevato;
- modello a due compartimenti luce/buio.

Non è risultato in grado, invece, di modificare la risposta del ratto nel test dell'odore del suo predatore (gatto): il comportamento in questa situazione è stato comparato alla fobia umana (Juárez *et al.*, 2002).

Gli studi clinici hanno confermato l'attività ansiolitica dell'iperico nei pazienti affetti da depressione moderata con componente ansiosa (Woelk, 2000).

1.5.2 Effetto dell'iperforina sulla conduttanza ionica

La "driving force" dei trasportatori dei neurotrasmettitori è il gradiente del Na^+ , una diminuzione di tale gradiente inibisce la funzione dei trasportatori.

L'iperforina non agisce tramite inibizione della pompa Na^+/K^+ ATPasi o attivazione dei canali al Na^+ voltaggio-dipendenti, ma sembra che questo composto possa attivare lo scambiatore Na^+/H^+ specificatamente inibito da amiloride e suoi analoghi (Müller *et al.*, 2001) (Figura 3).

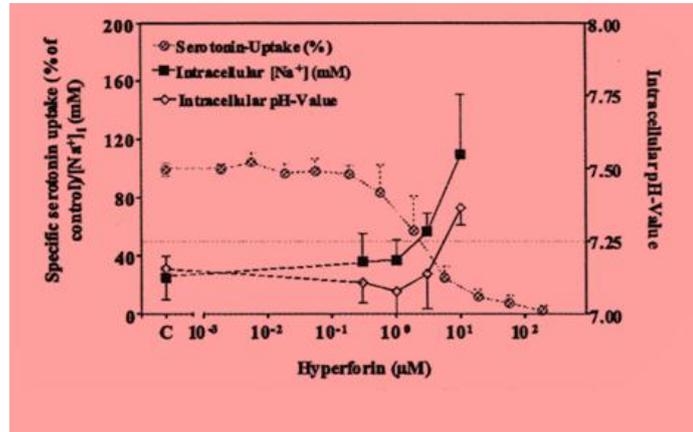


Figura 3 - Curva di concentrazione dipendente dagli effetti dell'iperforina sull'inibizione dell'uptake della serotonina. Aumento della concentrazione intracellulare di sodio [Na⁺]i e del pH intracellulare umano.

1.5.3 Ruolo dei flavonoidi nell'attività farmacologica

Le frazioni flavonoidiche di estratto di iperico hanno attività antidepressiva; gli estratti arricchiti in flavonoidi fino al 50% mostrano attività antidepressiva maggiore. Alcuni flavonoidi, come ad esempio l'amentoflavone, interagiscono con i recettori GABA-A, altri, come ad esempio la quercetina, inibiscono le attività delle MAO e delle COMT (Chimenti *et al.*, 2006).

Hypericum connatum Lam.

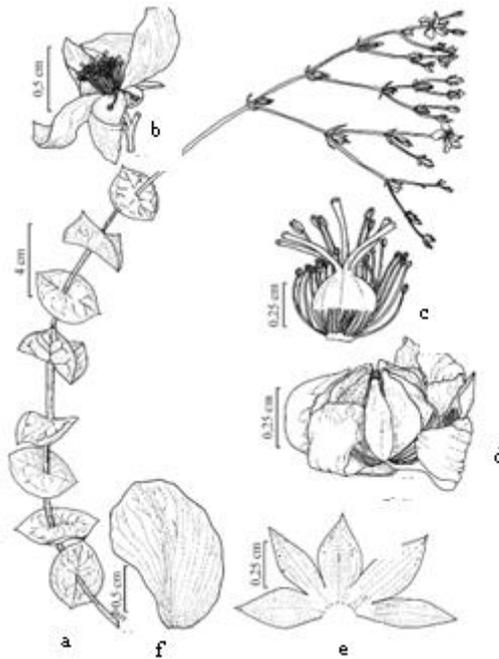


Figura 4 - *Hypericum connatum* Lam. Ramo fertile (a); Fiore (b); Androceo, stami (c); Capsula (d); Calice (e); Petalo (f) (Slusarski *et al.*, 2007).

2.1 Descrizione botanica

Hypericum connatum Lam. è una specie austroamericana molto diffusa nel nord e nel centro dell'Argentina, nel sud del Brasile, in Bolivia, in Paraguay e in Uruguay.

È alta dai 20 ai 90 cm, con fusto eretto, ramificato alla base, con steli glabri, provvisti di foglie all'infiorescenza (Figura 5 A). Le foglie coriacee sono disposte una di fronte all'altra, ovate con apice ottuso e base connata (da cui il nome della specie), intere, glabre, solitamente di piccole dimensioni (1,5-3 cm x 3-4) e provviste di punti traslucidi che anatomicamente corrispondono alle ghiandole secretorie.

Presenta fiori costituiti da peduncoli brevi, più o meno diviso in due parti, pentameri perfetti con peduncoli glabri 0,3-0,5 cm (Figura 5 B). Sepali ovato-lanceolati, acuminati, con punteggiature sul retro di circa 5 mm di lunghezza. Petali dal giallo al giallo-arancio, obovati, bilobati all'apice, fino a 7-8 mm di lunghezza. L'androceo è composto da numerosi stami, liberi o uniti alla loro base in gruppi da 3-8. Frutto costituito da capsula ovoidale, 0,4-0,6 cm di lunghezza, marrone (Figura 5 C) che contengono numerosi semi gialli di 0,7-0,9 mm a forma oblunga e semilunare.

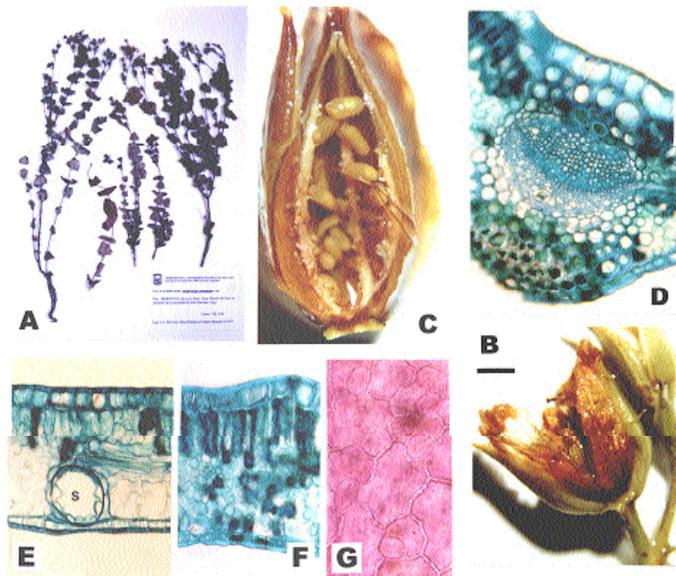


Figura 5 - A. Esemplare di *Hypericum connatum*; B. Sezione del fiore; C. Frutto in sezione longitudinale; D. Fascio vascolare mediale; E-F. Ghiandola secretoria (s) e fasci vascolari laterali; G. Epidermide (Fusco *et al.*, 2007).

2.2 Usi popolari e stato dell'arte

Conosciuta con il nome volgare di “cabotoril” o “cabo tori”, *H. connatum* è utilizzato in medicina popolare Argentina principalmente come cardiotonico.

Il decotto e l'infuso delle parti aeree di questa specie sono consigliate, per uso interno, per problemi di cuore che presentano dolore, senso di oppressione e palpitazioni, e per le malattie respiratorie. Il decotto è impiegato per la disintossicazione dal consumo di alcol. Le foglie schiacciate e polverizzate vengono utilizzate, per uso esterno, nel trattamento di contusioni, di dolori articolari e come astringente (Fusco *et al.*, 2007).

Hypericum connatum è utilizzata nel sud del Brasile, dove è nota con il nome di oreja de gato, per il trattamento delle lesioni in bocca, spesso legate a gravi gengivostomatiti erpetiche. L'indagine chimica della pianta ha rivelato la presenza di derivati del floroglucinolo e flavonoidi. Dall'estratto in *n*-esano delle parti aeree è stato isolato hyperbrasilolo B (un derivato del floroglucinolo), mentre dall'estratto metanolico sono stati isolati quattro flavonoidi: amentoflavone, hyperoside, guaijaverina e luteoforolo. L'estratto metanolico, le sue frazioni (*n*-esano, diclorometano e metanolo) ed i composti isolati sono stati testati per verificarne l'attività antivirale contro il virus herpes simplex (HSV). Tra i campioni analizzati, il luteoforolo si è dimostrato il più attivo inibendo l'effetto citopatico (CPE) e provocando la riduzione del titolo virale di HSV-1 DNA virale KOS ceppi e VR733 (ATCC) (Fritz *et al.*, 2007 b).

L'attività cardiotonica dell'estratto di *H. connatum* è stata sperimentata mediante preparazione di un infuso al 10% di parti aeree, contenente una miscela di glicosidi cardiotonici. L'infuso è stato testato su ratti ceppo Wistar di entrambi i sessi, del peso di 250 g, e su rospi *Bufo arenarum* adulti, del peso di 120 g. Gli animali sono stati anestetizzati con una soluzione al 25% di uretano (0,6 ml/100 g di animale, 0,3

ml via intraperitoneale e 0,3 ml per via sottocutanea), trattati per infusione con 0,1 ml di frazione polare. Subito dopo, sono stati eseguiti gli elettrocardiogrammi (Fusco *et al.*, 2007).

Gli estratti metanolici della pianta sono stati analizzati per la loro attività antifungina *in vitro* con il metodo delle diluizioni su agar (antibiogramma) contro un gruppo di lieviti e funghi opportunisti (dermatofiti). Gli estratti hanno mostrato attività contro *Staphylococcus aureus*. Non hanno però mostrato attività nei confronti di *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae* (Fenner *et al.*, 2005).

Inoltre, *Hypericum connatum* è stato studiato per verificarne l'attività antivirale contro il virus dell'immunodeficienza felina (FIV). L'analisi chimica ha rivelato la presenza di composti polifenolici come tannini e flavonoidi. Non è stata riscontrata la presenza di ipericina. Sebbene non siano emerse differenze sull'effetto citopatico, è stato osservato un minor numero di particelle virali nel surnatante quando le cellule infettate da FIV sono state trattate con estratto metanolico. Questi risultati suggeriscono una potenziale attività antivirale contro i lentivirus (Schmitt *et al.*, 2001).

Gli estratti metanolici di sei specie di *Hypericum*, spontanee nel sud del Brasile, sono stati sottoposti a screening per la loro attività antiproliferativa nei confronti di due linee cellulari: HT-29, cellule umane di carcinoma del colon, e H-460, cellule di carcinoma del polmone. Gli estratti grezzi più attivi sono stati quelli di *H. caprifoliatum*, *H. myrianthum* e, in misura minore, di *H. connatum*. Le piante sono state sottoposte a frazionamento con solventi a polarità crescente e gli estratti ritestati contro le due linee cellulari utilizzate in precedenza e verso le U-373, cellule umane di glioma maligno. Le più attive sono risultate le frazioni esaniche ottenute da *H. caprifoliatum*, *H. myrianthum* e *H. ternum* (Ferraz *et al.*, 2005).

In uno studio successivo, sono stati valutati l'attività antiossidante e i profili fenolico e flavonoidico degli estratti di 21 piante sudamericane. L'attività scavenging è stata analizzata con diversi metodi: 1) l'abilità di catturare i radicali liberi ABTS e DPPH stabili; 2) la riduzione di capacità di Fe⁺³ dal saggio FRAP (ferric reducing/antioxidant power); 3) la capacità di inibire la perossidazione dei lipidi nel plasma umano indotta da rame. La massima potenza è stata trovata nella specie *H. connatum* (1,48 e 1,77 mol eq Trolox / mg di estratto secco DPPH e 3,20 mol Tx e 4,48 eq. / ABTS mg di estratto secco) (Dadé *et al.*, 2009).

L'estratto metanolico grezzo della pianta è stato valutato in ratti Wistar (270 mg/kg i.p.), sottoposti al test di nuoto forzato (Porsolt), con lo scopo di verificarne una possibile attività antidepressiva, attraverso l'inibizione delle monoamino-ossidasi (MAO A e MAO B) nel cervello di ratto. I risultati emersi non hanno mostrato attività (Gnerre *et al.*, 2001).

Hypericum hircinum L.



Figura 6 - *Hypericum hircinum* L.

3.1 Descrizione botanica

Hypericum hircinum L. è una specie distribuita nella regione mediterranea, in luoghi umidi ed ombrosi (Robson *et al.*, 1968), spesso trapiantata dal suo ambiente selvaggio nei giardini domestici, dove viene coltivata e facilmente naturalizzata, come ad esempio accade nelle Marche (Italia centrale) con la sottospecie *H. hircinum* ssp. *majus* (Aiton) N. Robson (Conti *et al.*, 2005). E' un arbusto semi-sempreverde noto con il nome di erba di San Giovanni caprina o ruta caprina, per l'odore singolare e intenso delle sue foglie. E' caratterizzato da rami percorsi da 2-4 linee longitudinali, da foglie sessili, lanceolate o ovato-lanceolate (1-2,5 x 2-7 cm), assottigliate all'apice, con sottili ghiandole traslucide, da fiori in cime apicali corimbose, da sepalini ineguali, caduchi, lanceolati (6 mm), da petali 10-18 mm, da stami in 5 gruppi, da stilo lungo 3-5 volte l'ovario, da una capsula coriacea 8-12 mm.

3.2 Usi popolari e stato dell'arte

Nella medicina popolare questa pianta viene usata per curare il mal di gola, il raffreddore, la tosse (Pieroni *et al.*, 2004).

L'indagine chimica della pianta ha rivelato la presenza nelle foglie di acido clorogenico, quercetina, quercetrina, mangiferina e biapigenina, ma non di floroglucinolo o composti come iperforina o ipericina (Pistelli *et al.*, 2000).

In un recente studio (Chimenti *et al.*, 2006), è stato dimostrato che la quercetina agisce come inibitore selettivo delle MAO-A e delle COMT. Lo studio conformazionale e il docking molecolare sono stati condotti con modelli cristallografici. La statistica termodinamica e l'analisi di distanza hanno permesso di stimare il processo di complessazione e di identificare i residui chimici coinvolti nell'interazione selettiva della quercetina con gli enzimi MAO-A e COMT. Inoltre, è stato condotto uno studio *in vivo* con lo scopo di verificare gli effetti protettivi della

quercetina sulle conseguenze comportamentali indotte in topi sottoposti alla prova di nuoto forzato (FST), test in cui l'immobilità osservata coincide con una condizione simil-depressiva (Porsolt *et al.*, 1978).

Di contro, un altro lavoro (Diana *et al.*, 2007), condotto su tre specie differenti di *Hypericum* tra cui *H. hircinum* L. e *H. perforatum* L., ha dimostrato che gli estratti metanolici delle piante in esame hanno ridotto, in modo dose dipendente, l'attività motoria degli animali trattati; tali risultati sarebbero in contraddizione con gli effetti antidepressivi ampiamente descritti in letteratura.

Infine, in un altro studio (Pistelli *et al.*, 2000) è stata investigata l'attività antimicrobica di differenti estratti (*n*-esano, CHCl₃, MeOH, EtOAc), di frazioni BuOH e di sei composti puri isolati dalle parti aeree di *H. hircinum*, con un metodo di diffusione su piastre di agar. I risultati hanno mostrato una significativa attività antibatterica dell'estratto MeOH di *H. hircinum* con un massimo di efficacia nei confronti di *Staphylococcus aureus*.

***Hypericum perforatum* L.**



Figura 7 - *Hypericum perforatum* L.

4.1 Descrizione botanica

Hypericum perforatum L. è una specie spontanea nella regione mediterranea, dove di solito cresce in luoghi ombrosi fra le rocce (Avato *et al.*, 2004). E' una pianta erbacea perenne nota con il nome di erba di San Giovanni a foglie cordate, per la particolare forma a cuore delle sue foglie. E' caratterizzata da foglie maggiormente allargate alla base ed amplessicauli, da nervature deboli, non prominenti, da internodi lunghi quanto le foglie o più, da sepali con ghiandole e da petali con ghiandole nere solo sul bordo.

4.2 Usi popolari e stato dell'arte

In medicina tradizionale questa pianta viene usata come cicatrizzante delle ferite e come antibatterico (Benkiki *et al.*, 2003).

In letteratura è riportato uno studio clinico (Sarrel *et al.*, 2003) randomizzato condotto su 171 bambini, affetti da otite media, distinti in quattro gruppi di cui il primo (gruppo A) è stato trattato con NHED (naturopathic herbal extract ear drops), un complesso fitoterapico per uso topico composto da *Allium sativum*, *Verbascum thapsus*, *Calendula flores*, *Hypericum perforatum*, *Lavandula angustifolia* e vitamina E, il secondo gruppo (gruppo B) è stato trattato con NHED + amoxicillina (80 mg/kg/dose tre volte *die*) per os, il terzo gruppo (gruppo C) è stato trattato con un anestetico e un antinfiammatorio per uso topico (ametocaina e fenazone) alla dose di 5 gocce tre volte *die*, il quarto gruppo (gruppo D) è stato trattato con anestetico associato ad amoxicillina per os. Si è dimostrata l'efficacia e la tollerabilità del trattamento fitoterapico nella cura dell'otite media infantile, senza mostrare significative differenze in termini di successo terapeutico e profilo di sicurezza con gli altri gruppi trattati.

Un altro studio (do Rego *et al.*, 2007) ha investigato, in topi, l'effetto antidepressivo di iperfoliatina, floroglucinolo poliisoprenilato isolato dalle parti aeree di

***Hypericum perforatum* L.**

H. perforatum, associato all'inibizione del reuptake delle ammine biogene con un meccanismo diverso, non ancora chiarito, rispetto ai classici antidepressivi. Nella prova di nuoto forzato l'iperfoliatina, in modo dose dipendente, ha ridotto il tempo di immobilità dei topi trattati. L'immobilità viene considerata come espressione di un comportamento disperato, tipico di uno stato depressivo.

Risultati

5.1 Studio fitochimico di *H. connatum*

Il composto purificato ed identificato dalla frazione XI dell'estratto etanolo di *H. connatum* con tecniche cromatografiche e spettroscopiche è risultato la genisteina (Figura 8), un isoflavone scarsamente rappresentato in piante diverse dalle leguminose (Lapčík, 2007).

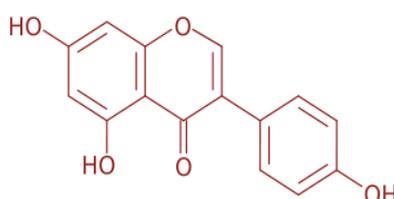


Figura 8 – Genisteina.

Si tratta di un fitoestrogeno che trova impiego in fitoterapia come trattamento sostitutivo in menopausa con un meccanismo di azione che consiste nella modulazione dei recettori ER β , stimolati fisiologicamente dal 17- β -estradiolo. Inoltre, la genisteina è utilizzata nel trattamento dell'osteoporosi, dell'ipertensione arteriosa attraverso la modulazione dell'espressione di eNOS, della profilassi del K mammario, ovarico, prostatico mediante la modulazione dell'enzima 5- α -reduttasi. Quest'ultimo meccanismo d'azione, condiviso dalla finasteride, ne suggerisce un possibile impiego anche nel trattamento dall'alopecia androgenetica e nell'ipertrofia prostatica benigna.

5.2 Composizione polifenolica e attività scavenging

Negli esperimenti effettuati, è stata analizzata la composizione dei polifenoli negli estratti etanolo e in acetato di etile di *H. connatum* (Tabella 4). Il profilo polifenolico ottenuto mediante UPLC ha rivelato la presenza in entrambi gli estratti di alcuni metaboliti comuni come acido gallico, acido clorogenico e acido ferulico, oltre a luteolina e iperoside. I composti più abbondanti nei due estratti sono stati iperoside e acido clorogenico. L'estratto etanolo ha mostrato selettivamente rutina e apigenina e un maggior contenuto in acido gallico e acido clorogenico, rispetto all'estratto in acetato di etile. Questo estratto, invece, ha rivelato la presenza di alcuni metaboliti come acido caffeico, epicatechina, acido cumarico e naringenina, assenti nell'estratto etanolo (Marandino *et al.*, 2010).

Tabella 4 - Profilo polifenolico, qualitativo e quantitativo, degli estratti etanolic e in acetato di etile di *H. connatum* Lam. I dati sono espressi come milligrammi di acido gallico equivalenti per grammo di estratto. Le molecole sono state identificate in base ai tempi di ritenzione dei relativi standards, alle stesse condizioni sperimentali. I risultati rappresentano la media±deviazione standard di tre esperimenti indipendenti.

Polifenoli	EtOH extract mg GAE/g ext	EtOAc extract mg GAE/g ext
Acido gallico	8.88 (± 0.62)	4.40 (± 0.31)
Acido clorogenico	18.92 (± 2.53)	14.52 (± 1.76)
Acido caffeico	-	11.07 (± 1.54)
Epicatechina	-	5.88 (± 1.53)
Acido cumarico	-	5.98 (± 1.56)
Rutina	5.73 (± 1.34)	-
Acido ferulico	1.88 (± 0.13)	2.10 (± 0.17)
Luteolina	2.58 (± 0.31)	2.51 (± 0.21)
Quercetina	7.72 (± 0.98)	8.21 (± 1.03)
Apigenina	2.73 (± 0.45)	-
Naringenina	-	3.70 (± 0.85)
Iperoside	82.28 (± 9.56)	76.17 (± 7.81)

Gli estratti studiati hanno anche mostrato una forte attività antiossidante (Figura 9); nonostante il profilo polifenolico simile, la frazione etanolica ha esibito un'attività antiossidante doppia rispetto a quella dell'acetato di etile (EC₅₀ di valore 3,2 µg rispetto a 6,6 µg), probabilmente grazie all'effetto prodotto dal flavonoide rutina (Figura 10).

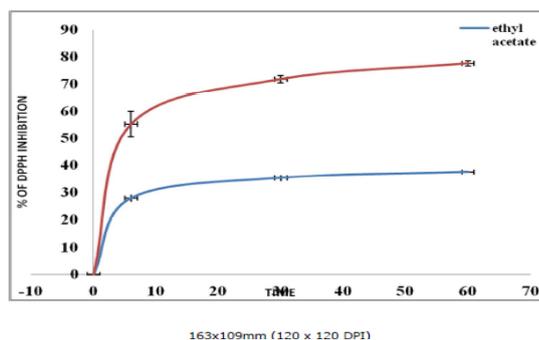


Figura 9 – Percentuale di inibizione di DPPH esibita dopo 60 minuti di incubazione dagli estratti etanolic e acetato di etile di *H. connatum*.

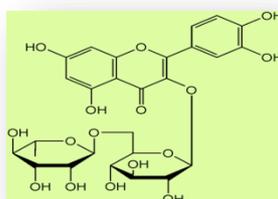


Figura 10 – Rutina.

5.3 Composizione chimica degli oli essenziali e attività fitotossica

Gli studi sulla composizione chimica e sull'attività fitotossica degli oli essenziali di *H. perforatum*, *H. hircinum* e *H. perforiatum* sono stati condotti dal nostro gruppo di ricerca e recentemente pubblicati (Marandino *et al.*, 2011 a). In particolare, la composizione chimica degli oli essenziali delle piante in esame è rappresentata nella Tabella 5. Nei tre oli, sono stati individuati complessivamente 111 composti: 53 per l'olio di *H. hircinum* (93,7% dell'olio totale), 55 per *H. perforatum* (96,5% dell'olio totale) e 63 per *H. perforiatum* (98,7% dell'olio totale). I composti principali degli oli essenziali di *H. perforatum* e *H. hircinum* sono sesquiterpeni, mentre l' α -pinene (monoterpene) e il timolo (fenolo) sono i componenti più abbondanti nell'olio essenziale di *H. perforiatum*. I dati ottenuti potranno servire a chiarire i rapporti chemotassonomici all'interno del genere *Hypericum*.

Inoltre, i tre oli essenziali sono stati valutati per un possibile effetto fitotossico (Tabelle 6 e 7) sulla germinazione e sull'allungamento della radichetta dei semi di ravanello e crescita. Secondo i dati ottenuti, sembrerebbe che gli oli influenzino la germinazione e l'allungamento della radichetta dei semi in modo distinto: in generale, per i tre oli essenziali, l'effetto fitotossico sulla germinazione è meno sensibile rispetto a quello sull'allungamento della radichetta. Solo l'olio essenziale di *H. hircinum*, alla dose più alta, inibisce la germinazione dei semi di crescita. Gli oli essenziali di *H. hircinum* e *H. perforatum*, alla dose più alta, inibiscono l'allungamento della radichetta di ravanello, mentre gli oli essenziali di *H. perforiatum* e *H. hircinum*, alla dose più

alta, inibiscono significativamente l'allungamento della radichetta dei semi di crescita.

Tabella 5 - Composizione chimica degli oli essenziali di *H. perforatum*, *H. hircinum*, *H. perforiatum*. I composti sono elencati in base ai tempi di ritenzione su colonna HP-5.

Ri ^a	Ri ^b	Composto	<i>H. perforatum</i> % ^c	<i>H. hircinum</i> % ^c	<i>H. perforiatum</i> % ^c
801	804	<i>n</i> -Ottano	-	0.2	0.8
860		2-Metilottano	5.2	-	0.2
903	908	<i>n</i> -Nonano	1.0	10.2	9.4
938	1032	α -Pinene	0.3	2.2	25.3
951	1753	Verbenene	-	-	T
953	1076	Camfene	-	0.4	0.1
971	965	3-Metil-nonano	-	0.4	0.5
980	1118	β -Pinene	2.8	4.3	2.0
984	1319	6-Metil-5-epten-2-one	-	-	T
993	1174	β -Mircene	0.3	0.2	0.8
1000	1051	<i>n</i> -Decano	0.2	-	0.3
1012	1188	α -Terpinene	-	-	0.1
1025	1280	<i>p</i> -Cimene	0.7	0.3	0.2
1030	1203	Limonene	0.4	5.1	0.5
1034	1213	1,8-Cineolo	-	-	3.9
1039	1246	Z-(β)-Ocimene	-	-	T
1049	1280	(E)- β -Ocimene	0.3	0.1	T
1052		Benzenacetaldide	-	0.1	-
1057	1255	γ -Terpinene	-	0.1	0.2
1086	1265	Terpinolene		0.2	0.1
1092		<i>p</i> -Cimenene	0.2	-	-
1094	1428	2-Nonanone	-	0.1	-

Risultati

1097	1553	Linalolo	0.6	0.1	0.1
1098	1120	β -Fencolo	-	0.1	T
1100	1100	<i>n</i> -Undecano	6.3	2.0	3.8
1105		<i>n</i> -Nonanale	-	0.3	0.1
1126		α -Camfolene aldeide	-	0.1	-
1128	1497	Camfolenale	0.5	-	-
1138	1654	<i>trans</i> -Pinocarveolo	0.2	1.5	0.2
1139	1442	<i>trans</i> -Limonene ossido	-	T	-
1145	1532	Camfora	-	0.2	0.1
1165	1587	Pinocarvone	0.1	0.3	-
1167	1719	Borneolo	-	0.1	T
1171		<i>iso</i> -Nonanolo	0.3	-	-
1176	1611	Terpinen-4-olo	0.4	0.2	-
1185	1864	<i>p</i> -Cimen-8-olo	0.2	-	-
1189	1706	α -Terpineolo	0.3	1.2	0.4
1193	1648	Mirtenale		1.7-	-
1196	1804	Mirtenolo	0.1	0.7	-
1210		<i>n</i> -Decanale	-	0.2	0.1
1217	1845	<i>trans</i> -Carveolo	-	0.6	-
1218	1717	Verbenone	-	0.5	-
1226	1878	<i>cis</i> -Carveolo	0.5	0.3	-
1241	1752	Carvone	0.1	0.4	-
1255	1857	Geraniolo	T	0.5	-
1262	1780	(E)-Anetolo	0.1	-	-
1266		2-Metildodecano	0.1	-	
1293	2198	Timolo		-	15.8
1300	1312	<i>n</i> -Tridecano	1.1	-	-

Risultati

1352	1466	α -Cubebene	0.1	-	-
1355		α -Longipinene	0.2	-	0.7
1363	1492	Ciclosativene	-	-	T
1372	1493	α -Ylangene	-	-	T
1377	1488	β -Patchoulene	-	-	T
1377	1497	α -Copaene	0.3	0.5	1.0
1382	1367	Isoledene		0.2	-
1385	1535	β -Bourbonene	0.1	0.5	0.1
1387	1600	β -Elemene	0.1	-	0.2
1392	2161	β -Maaliene	-	0.2	
1408	1529	α -Gurjunene	-	4.0	0.2
1444	1680	α -Cariofillene	0.3	-	
1418	1612	β -Cariofillene	12.3	3.0	1.1
1426	1430	β -Copaene	0.3	-	
1432	1612	β -Gurjunene	0.2	1.9	T
1437	1628	Aromadendrene	0.8	0.1	0.6
1440		α -Himacalene	0.9	-	-
1452	1673	(E)- β -Farnesene	7.0	1.3	-
1455	1689	α -Humulene	1.0	0.3	1.1
1463	1661	<i>allo</i> -Aromadendrene	-	0.8	0.5
1472		<i>trans</i> -Cadina-1(6),4-diene	-	1.7	-
1473	1687	γ -Gurjunene	-	0.2	-
1474	1973	Dodecanolo	1.8	-	-
1475	1715	β -Selinene	0.2	0.4	-
1477	1726	Germacrene D	17.1	-	2.1
1478	1704	γ -Muurolene	11.1	1.0	1.0
1482	1957	E-(β)-Ionone	-	-	1.0

Risultati

1486		δ -Selinene	-	11.4	-
1490	1694	cis- β -Guajene	-	27.5	-
1491	1695	Viridiflorene	-	-	1.0
1492	1756	Biciclogermacrene	4.9	-	T
1498	1744	α -Selinene	1.0	0.4	-
1503	1740	α -Muurolene	0.6	-	0.5
1508	1758	(E,E)- α -Farnesene	0.2	0.7	0.2
1515	1776	γ -Cadinene	0.6	-	0.9
1526	1773	δ -Cadinene	0.4	0.2	2.1
1532	1745	α -Cadinene	-	-	T
1533		(Z)-3-Esenil-benzoato	0.4	-	-
1538	1799	Cadina-1,4-diene	-	-	T
1541	1941	α -Calacorene	-	-	0.4
1565	2057	Ledolo	-	-	0.4
1566	1942	β -Calacorene	-	0.1	
1566	2050	<i>trans</i> -Nerolidolo	0.7	-	0.2
1578	2150	Spatulenolo	3.8	-	1.4
1580	2008	Cariofillene ossido	0.4	3.2	2.1
1590		<i>iso</i> -Aromadendrene epossido	-	-	0.4
1591	2104	Viridiflorolo	-	0.9	-
1595	2054	<i>allo</i> -Aromadendrene ossido	-	-	0.9
1605	2011	Humulene epossido	1.7	-	-
1618	2233	δ -Cadinolo	-	-	0.1
1625	2088	1- <i>epi</i> -Cubenolo	0.6	-	
1640	2187	τ -Cadinolo	-	-	11.5
1643	2233	α -Muurololo	-	-	T

Risultati

1644	2080	Cubenolo	-	-	0.4
1649	2255	α -Cadinolo	-	-	0.9
1668	2219	α -Bisabololo	-	-	0.2
1676	2179	<i>n</i> -Tetradecanolo	3.5	-	
1687	2359	8-Cedren-13-olo	-	-	0.2
1767	2563	Benzil benzoato	0.1	-	-
1879	2342	<i>n</i> -Hesadecanolo	0.3	-	-
1900	1900	<i>n</i> -Nonadecano	0.2	-	-
1900	1914	<i>epi</i> -Cubebolo	-	-	0.3

^a: indice di ritenzione di Kovats su colonna HP-5; ^b: indice di ritenzione di Kovats su HP Innowax; ^c: t = tracce <0.05.

Tabella 6 - Attività biologica degli oli essenziali di *H. perforatum*, *H. perforatum* e *H. hircinum*, sulla germinazione di semi di ravanello e crescita, 120 ore dopo il trattamento. I risultati rappresentano la media±deviazione standard di tre esperimenti indipendenti.

<i>Raphanus sativus</i>			
	<i>H. perforatum</i>	<i>H. perforatum</i>	<i>H. hircinum</i>
	Germinazione semi±DS	Germinazione semi±DS	Germinazione semi±DS
Controllo	9.3±1.0	9.3±1.0	9.3±1.0
2.5 µg/mL	8.7±0.6	9.3±1.5	7.5±1.0
1.25 µg/mL	9.3±0.6	9.7±0.6	7.9±3.0
0.625 µg/mL	9.7±0.6	9.0±1.0	9.0±2.0
0.25 µg/mL	9.0±1.0	9.3±1.2	7.9±1.5
0.125 µg/mL	9.7±0.6	8.0±1.0	7.0±2.0
0.06 µg/mL	10.0±0.0	8.7±0.6	7.0±1.5
<i>Lepidium sativum</i>			
	<i>H. perforatum</i>	<i>H. perforatum</i>	<i>H. hircinum</i>
	Germinazione semi±DS	Germinazione semi±DS	Germinazione semi±DS
Controllo	8.7±1.2	8.7±1.2	8.7±1.2
2.5 µg/mL	10.0±0.0	9.7±0.6	7.7±0.6*
1.25 µg/mL	10.0±0.0	10.0±0.0	8.0±1.0
0.625 µg/mL	10.0±0.0	8.9±0.6	8.0±2.0
0.25 µg/mL	10.0±0.0	9.3±0.6	10.0±0.0
0.125 µg/mL	9.7±0.6	9.7±0.6	9.0±1.0
0.06 µg/mL	10.0±0.0	9.0±1.0	8.7±2.3

* p<0.05

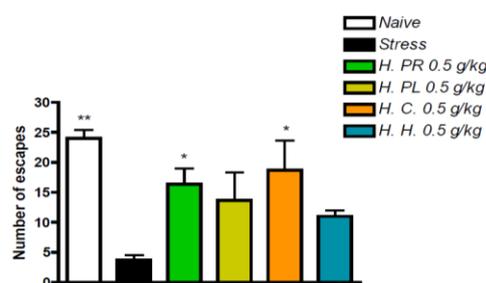
Tabella 7 - Attività biologica degli oli essenziali di iperico sull'allungamento della radichetta di semi di ravanello e crescita, 120 ore dopo il trattamento. I risultati rappresentano la media±deviazione standard di tre esperimenti indipendenti.

<i>Raphanus sativus</i>			
	<i>H. perforatum</i>	<i>H. perforatum</i>	<i>H. hircinum</i>
	Allungamento radichetta ±SD	Allungamento radichetta ±SD	Allungamento radichetta ±SD
Controllo	9.0±4.6	9.0±4.6	9.0±4.6
2.5 µg/mL	6.3±3.9*	7.2±3.9	5.4±0.2*
1.25 µg/mL	8.2±3.8	8.5±4.9	5.4±0.2*
0.625 µg/mL	6.8±3.6*	5.3±3.3***	5.4±0.2*
0.25 µg/mL	7.9±4.5	9.2±4.0	7.2±0.2
0.125 µg/mL	9.4±4.7	10.4±4.7	7.2±0.2
0.06 µg/mL	8.4±4.7	8.3±4.0	5.4±0.2*
<i>Lepidium sativum</i>			
	<i>H. perforatum</i>	<i>H. perforatum</i>	<i>H. hircinum</i>
	Allungamento radichetta ±SD	Allungamento radichetta ±SD	Allungamento radichetta ±SD
Controllo	7.5±2.8	7.5±2.8	7.5±2.8
2.5 µg/mL	7.3±3.1	5.8±3.2*	5.8±1.0*
1.25 µg/mL	7.4±2.7	7.5±2.8	8.2±1.0
0.625 µg/mL	7.6±2.3	7.2±2.9	7.8±1.2
0.25 µg/mL	6.2±3.0	7.3±2.6	7.8±1.1
0.125 µg/mL	7.1±3.2	7.1±3.0	7.8±0.9
0.06 µg/mL	8.3±3.2	7.2±3.1	8.1±1.1

* p<0.05; ***p<0.001

5.4 Attività antidepressiva

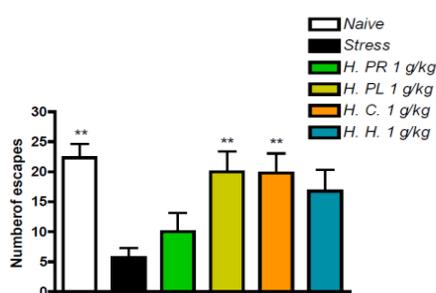
Gli esperimenti sono stati condotti in due differenti periodi (novembre 2010 e agosto 2011) in collaborazione con la sezione di Farmacologia del Dipartimento di Neuroscienze della facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università di Siena. Nel corso del primo periodo (novembre 2010), è stata confrontata l'attività di quattro specie di iperico (*H. connatum*, *H. hircinum*, *H. perforatum*, *H. perforatum*), rispetto ai controlli. In particolare, dai dati elaborati dopo trattamento acuto (Figure 11 e 12), l'estratto EtOH di *H. connatum* è risultato significativamente attivo ad entrambi le dosi testate (0,5 g/kg p.v. per os, 1 g/kg p.v. per os), rispetto ai controlli. Inoltre, l'estratto di *H. perforatum* è risultato attivo solo alla dose di 0,5 g/kg p.v. per os; mentre l'estratto di *H. perforatum* è risultato attivo solo alla dose di 1 g/kg p.v. per os. L'estratto di *H. hircinum* è risultato, invece, privo di effetto significativo (Marandino et al., 2012).



* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (test di Dunnett)

Legenda: H.PR= *H. perforatum*, H.PL= *H. perforatum*, H.C.= *H. connatum*, H.H.= *H. hircinum*.

Figura 11 – Effetto degli estratti di iperico in ratti dopo trattamento acuto, a dosi di 0,5g/kg p.v., valutato con test di fuga. I risultati sono espressi come media del numero di fughe \pm S.E.M. in 30 prove consecutive.

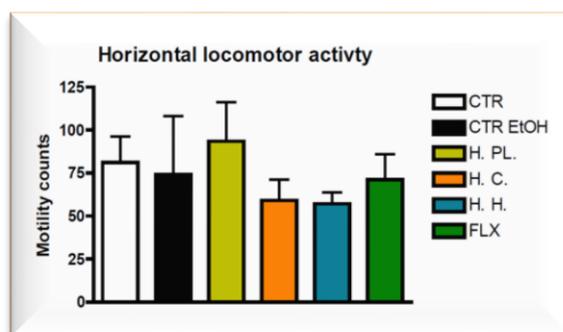


** $p < 0.01$ (test di Dunnett)

Legenda: H.PR= *H. perforatum*, H.PL= *H. perforatum*, H.C.= *H. connatum*, H.H.= *H. hircinum*.

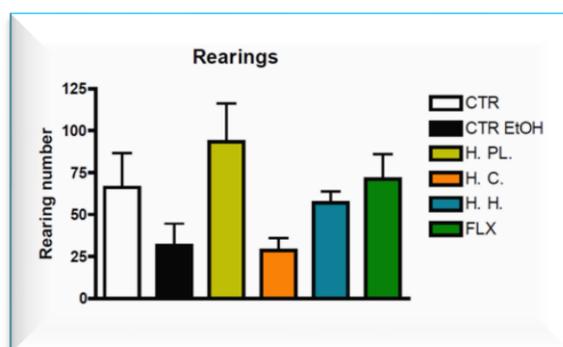
Figura 12 - Effetto degli estratti di iperico in ratti dopo trattamento acuto, a dosi di 1 g/kg p.v., valutato con test di fuga. I risultati sono espressi come media del numero di fughe \pm S.E.M. in 30 prove consecutive.

Prima della sessione di test di fuga, e dopo il trattamento ripetuto, è stata valutata l'attività motoria (rearings e attività locomotoria orizzontale) dei ratti con lo scopo di arruolare per le prove di fuga solo gli animali dotati di comportamento locomotorio simile, e cioè solo i gruppi omogenei. I risultati relativi alle attività locomotoria orizzontale e rearings sono riportati nelle Figure 13 e 14, rispettivamente.



Legenda: H.PL= *H. perfoliatum*, H.C.= *H. connatum*, H.H.= *H. hircinum*, FLX= fluoxetina.

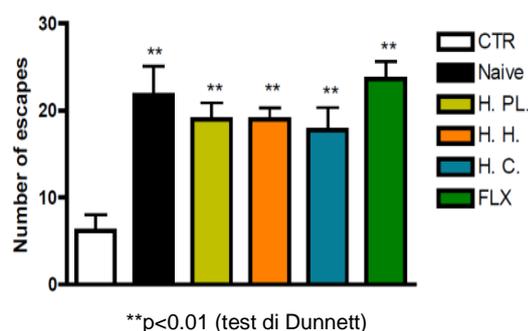
Figura 13 - Attività locomotoria orizzontale esibita dai ratti in 30 minuti di osservazione.



Legenda: H.PL= *H. perfoliatum*, H.C.= *H. connatum*, H.H.= *H. hircinum*, FLX= fluoxetina.

Figura 14 - Numero di impennate (rearings) effettuate dai ratti in 30 minuti di osservazione.

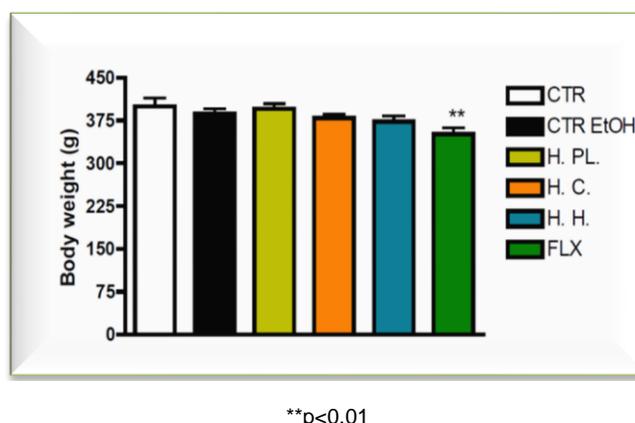
Dai dati calcolati dopo trattamento ripetuto (Figura 15), alla dose di 1g/kg p.v. somministrata per os due volte al giorno per 14 giorni, tutti gli estratti testati sono risultati significativamente attivi, rispetto ai controlli (Marandino et al., 2012).



Legenda: H.PL= *H. perforatum*, H.H.= *H. hircinum*, H.C.= *H. connatum*, FLX= fluoxetina.

Figura 15 - Effetto degli estratti di iperico in ratti dopo trattamento cronico, a dosi di 1 g/kg p.v., valutato con test di fuga. I risultati sono espressi come media del numero di fughe \pm S.E.M. in 30 prove consecutive.

A fine trattamento ripetuto, è stato calcolato il peso di tutti i ratti utilizzati, con lo scopo di verificare un possibile effetto degli estratti e della fluoxetina sulle variazioni ponderali. I risultati, rappresentati nella Figura 16, non hanno mostrato variazioni di peso significative eccetto per il gruppo trattato con fluoxetina che ha evidenziato una significativa riduzione ponderale probabilmente perché la fluoxetina, inibendo selettivamente il reuptake di serotonina, faciliterebbe la stimolazione del centro della sazietà localizzato nell'ipotalamo.



Legenda: H.PL= *H. perforatum*, H.C.= *H. connatum*, H.H.= *H. hircinum*, FLX= fluoxetina.

Figura 16 – Effetto della somministrazione cronica degli estratti, a dosi di 1 g/kg p.v., e di fluoxetina sul peso corporeo dei ratti.

Nel secondo periodo (agosto 2011), e incoraggiati dai risultati precedentemente ottenuti, sono state testate due frazioni cromatografiche di *H. connatum* con l'obiettivo di individuare le frazioni dell'estratto EtOH dotate di attività. Dai dati elaborati dopo trattamento acuto (Figura 17), entrambe le frazioni cromatografiche (B e C) di *H.*

connatum somministrate per os, alla dose di 0,250 g/kg p.v., sono risultate significativamente attive, rispetto ai controlli (Marandino et al., 2012). Successivamente, dalla frazione cromatografica C sono stati purificati con HPLC tre composti flavonoidici 1, 2, 3 (Figure 18, 19 e 20) identificati con spettroscopia NMR come isoquercetina (Figura 21), rutina e quercetina (Figura 22). Di quest'ultimo composto sono ben note le proprietà antidepressive (Chimenti et al., 2006).

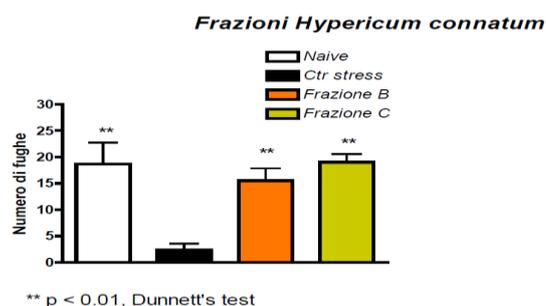


Figura 17 - Effetto delle frazioni cromatografiche B e C dell'estratto etanoloico di *H. connatum* in ratti dopo trattamento acuto, alla dose di 0,250g/kg p.v., valutato con test di fuga. I risultati sono espressi come media del numero di fughe \pm S.E.M. in 30 prove consecutive.

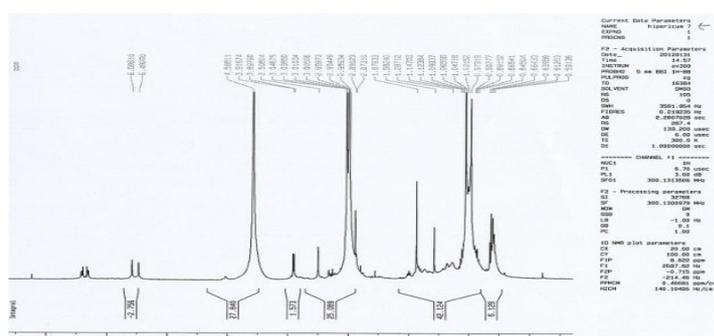


Figura 18 - *Hypericum connatum*, frazione cromatografica C, composto 1. Spettro protonico.

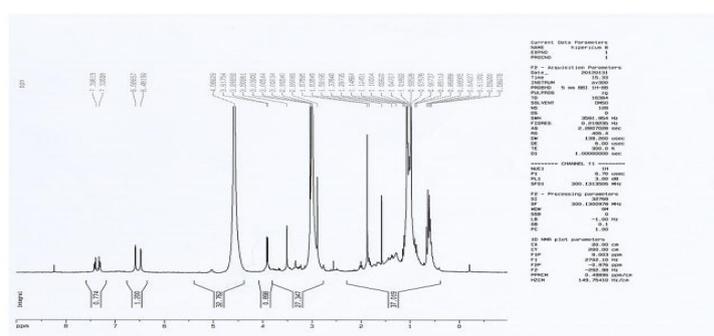


Figura 19 - *Hypericum connatum*, frazione cromatografica C, composto 2. Spettro protonico.

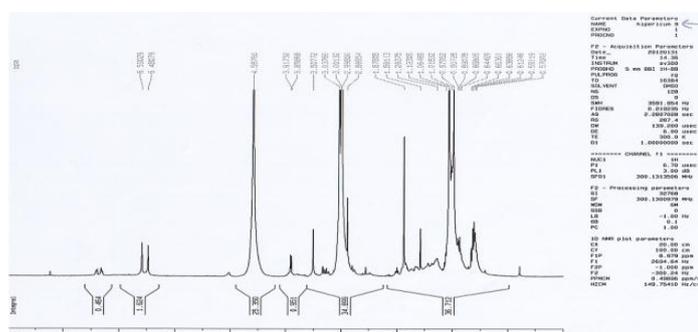


Figura 20 – *Hypericum connatum*, frazione cromatografica C, composto 3. Spettro protonico.

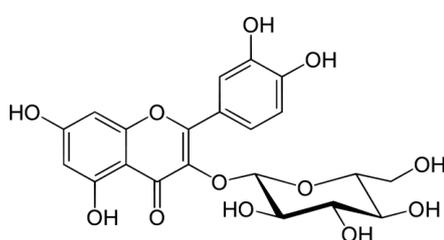


Figura 21 – Isoquercetina.

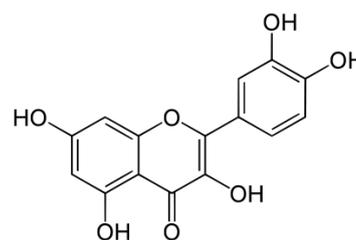


Figura 22 – Quercetina.

5.5 Attività antimicrobica

I risultati relativi all'attività antimicrobica degli estratti etanolo ed in acetato di etile di *H. connatum* sono riportati nella Tabella 8. In particolare, l'estratto etanolo è risultato significativamente attivo, in modo dose-dipendente, contro *Chromobacterium violaceum*, *Bacillus cereus* DSM 4384 e *Escherichia coli*. Inoltre, l'estratto è risultato attivo, alla dose più alta testata (100 µg), contro *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* DSM 4313; mentre l'estratto non ha mostrato attività nei confronti sia di *Pseudomonas Aeruginosa* che di *Cronobacter sakazakii*. Infine, l'estratto in acetato di etile è risultato significativamente attivo, in modo dose-dipendente, nei confronti di tutti i microrganismi usati nel test, tranne che per *Chromobacterium violaceum* e *Cronobacter sakazakii* (Marandino *et al.*, 2010).

Risultati

Tabella 8 - Attività antimicrobica di estratti di *H. connatum*. I dati sono espressi in mm. La tetraciclina (7 µg) e il DMSO sono stati usati come controlli positivo e negativo, rispettivamente. I risultati rappresentano la media±deviazione standard in tre esperimenti indipendenti.

<i>H. connatum</i> ext µg/disco	1	2	3	4	5	6	7
EtOH 10 µg	0	3,3±0,6	0	0	0	0	0
EtOH 25 µg	0	4,7±0,3	5,0±0,0	0	0	0	5,2±0,3
EtOH 50 µg	0	7,2±0,3	7,3±0,6	0	0	0	7,0±2,0
EtOH100 µg	0	8,2±0,3	9,3±0,6	0	9,3±1,2	8,7±0,6	7,7±0,6
EtOAc 10 µg	4,7±0,6		0	0	3,3±0,6	2,3±0,6	2,0±0,0
EtOAc 25 µg	5,0±0,0	4,7±0,6	0	0	5,3±0,3	6,7±1,5	5,7±1,2
EtOAc 50 µg	8,3±2,9	7,7±1,5	0	0	10,3±0,6	9,0±1,7	7,5±0,0
EtOAc 100 µg	10,3±5,8	10,0±0,0	0	0	11,3±0,6	9,7±0,3	10,3±1,5
Tetraciclina 7 µg	9,8 ±1,6	12,7±1,2	11,2±0,9	11,2±0,9	11,3±0,6	9,7±1,3	8,4±1,4
DMSO	0 (±0)	0 (±0)	0 (±0)	0 (±0)	0 (±0)	0 (±0)	0 (±0)

*p<0.05; **p<0.01; *** p<0.001 vs DMSO

Legenda: 1) *Pseudomonas aeruginosa*, 2) *Escherichia coli* 8579, 3) *Chromobacterium violaceum*, 4) *Cronobacter sakazakii*, 5) *Staphylococcus aureus*, 6) *Bacillus cereus* 4313, 7) *Bacillus cereus* 4384.

I risultati relativi all'attività antimicrobica degli estratti in etere di petrolio, cloroformico, cloroformio-metanolo (9:1), metanolico di *H. hircinum* sono riportati nella Tabella 9. In particolare, l'estratto in etere di petrolio è risultato significativamente attivo, in modo dose-dipendente e a tutte le dosi testate, contro *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Cronobacter sakazakii*. Inoltre, l'estratto è risultato attivo in modo dose-dipendente, alle dosi medio-alte testate contro *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* DSM 4313, e alle dosi alte verso *Bacillus cereus* DSM 4384. Infine, l'estratto è risultato privo di attività contro *Chromobacterium violaceum*.

Per quanto riguarda l'estratto cloroformico, invece, è stata riscontrata attività significativa, in modo dose-dipendente e a tutte le dosi testate, verso tutti i microorganismi considerati eccetto che per *Chromobacterium violaceum*.

Infine, gli estratti cloroformio-metanolo (9:1) e metanolico sono risultati inattivi, a tutte le dosi testate, contro tutti i microorganismi tranne che per *Bacillus cereus* DSM 4313 e *Escherichia coli*, e solo alle dosi più alte saggiate.

Risultati

Tabella 9 – Attività antimicrobica di estratti di *H. hircinum*. I dati sono espressi in mm. La tetraciclina (7 µg) e il DMSO sono stati usati come controlli positivo e negativo, rispettivamente. I risultati rappresentano la media±deviazione standard in tre esperimenti indipendenti.

<i>H. hircinum</i> ext µg/disco	1	2	3	4	5	6	7
Etere 10 µg	3,5±0,9	3,8±0,3	0	4,5±0,9	0	0	0
Etere 25 µg	5,2±0,3	5,8±0,3	0	5,7±1,2	5,7±0,6	5,7±0,3	0
Etere 50 µg	6,3±0,3	7,0±0,0	0	9,7±1,2	7,0±0,0	9,3±1,2	6,3±1,2
Etere 100 µg	10,3±0,3	10,3±0,6	0	11,7±0,6	12,3±2,3	14,3±1,2	9,7±0,8
CHCl ₃ 10 µg	4,7±0,6	5,7±1,2	0	6,3±0,6	5,0±0,0	7,3±1,4	5,0±0,0
CHCl ₃ 25 µg	5,8±1,0	7,3±0,6	0	8,7±0,6	6,3±1,2	7,2±0,3	7,2±0,3
CHCl ₃ 50 µg	8,7±1,5	8,0±1,7	0	13,3±2,9	10,0±0,0	9,3±0,3	9,7±0,6
CHCl ₃ 100 µg	9,3±1,2	9,3±0,6	0	16,7±2,9	11,3±1,2	15,0±0,0	10,2±0,3
CHCl ₃ /MeOH 10 µg	0	0	0	0	0	0	0
CHCl ₃ /MeOH 25 µg	0	0	0	0	0	0	0
CHCl ₃ /MeOH 50 µg	0	0	0	0	0	0	0
CHCl ₃ /MeOH 100 µg	0	6,7±0,6	0	0	0	5,7±1,2	0
MeOH 10 µg	0	0	0	0	0	0	0
MeOH 25 µg	0	0	0	0	0	0	0
MeOH 50 µg	0	0	0	0	0	0	0
MeOH 100 µg	0	8,8±1,0	0	0	0	8,7±1,2	0
Tetraciclina 7 µg	9,8 ±1,6	12,7±1,2	11,2±0,9	11,2±0,9	11,3±0,6	9,7±1,3	8,4±1,4
DMSO	0 (±0)	0 (±0)	0 (±0)	0 (±0)	0 (±0)	0 (±0)	0 (±0)

*p<0.05; **p<0.01; *** p<0.001 vs DMSO

Legenda: 1) *Pseudomonas aeruginosa*, 2) *Escherichia coli* 8579, 3) *Chromobacterium violaceum*, 4) *Cronobacter sakazakii*, 5) *Staphylococcus aureus*, 6) *Bacillus cereus* 4313, 7) *Bacillus cereus* 4384.

I risultati relativi all'attività antimicrobica degli estratti in etere di petrolio, cloroformico, cloroformio-metanolo (9:1), metanolico di *H. perfoliatum* sono riportati nella Tabella 10. In particolare, l'estratto in etere di petrolio è risultato

significativamente attivo, in modo dose-dipendente e a tutte le dosi testate, contro *Chromobacterium violaceum*, *Cronobacter sakazakii*, *Staphylococcus aureus*. Inoltre, l'estratto è risultato significativamente attivo, in modo dose-dipendente alle dosi medio-alte testate, nei confronti di *Bacillus cereus* DSM 4313 e *Escherichia coli*; mentre, non ha mostrato attività sia nei confronti di *Pseudomonas aeruginosa* che di *Bacillus cereus* DSM 4384.

Per quanto riguarda gli estratti cloroformico e cloroformio-metanolo (9:1), invece, è stata riscontrata attività significativa, in modo dose-dipendente e a tutte le dosi testate, verso tutti i microorganismi considerati eccetto che per *Chromobacterium violaceum*. Infine, l'estratto metanolico è risultato inattivo, a tutte le dosi, contro tutti i microorganismi utilizzati nel test (Marandino *et al.*, 2011 b).

Risultati

Tabella 10 - Attività antimicrobica di estratti di *H. perfoliatum*. I dati sono espressi in mm. La tetraciclina (7 µg) e il DMSO sono stati usati come controlli positivo e negativo, rispettivamente. I risultati rappresentano la media±deviazione standard in tre esperimenti indipendenti.

<i>H. perfoliatum</i> ext µg/disco	1	2	3	4	5	6	7
Etere 10 µg	0	0	9,8±0,3	5,7±0,6	5,0±0,0	0	0
Etere 25 µg	0	0	10,3±0,6	9,3±1,2	6,0±0,0	7,0±1,5	0
Etere 50 µg	0	6,3±1,2	10,7±0,6	9,7±0,6	7,0±1,2	6,3±0,3	0
Etere 100 µg	0	7,7±1,2	14,7±1,5	12,2±2,6	12,0±0,0	11,3±0,6	0
CHCl ₃ 10 µg	4,3±0,6	4,7±0,3	0	5,7±0,6	4,7±0,6	5,0±0,0	4,2±0,3
CHCl ₃ 25 µg	6,7±0,6	6,5±0,5	0	7,3±0,6	6,0±0,0	5,5±0,5	6,7±0,3
CHCl ₃ 50 µg	7,5±1,3	8,0±1,7	0	10,2±0,3	8,8±1,3	8,2±0,6	7,8±0,3
CHCl ₃ 100 µg	9,3±0,6	10,0±0,0	0	12,3±2,3	9,7±0,6	8,8±1,0	9,8±0,6
CHCl ₃ /MeOH 10 µg	4,3±0,6	5,0±0,0	0	7,3±0,6	4,7±0,8	5,3±0,3	5,2±0,3
CHCl ₃ /MeOH 25 µg	7,2±0,3	6,8±0,3	0	9,7±0,6	6,7±0,6	5,7±0,6	8,7±1,3
CHCl ₃ /MeOH 50 µg	8,3±1,2	7,0±0,0	0	9,0±1,7	8,0±2,0	10,0±0,0	8,7±1,2
CHCl ₃ /MeOH 100 µg	10,2±0,3	10,3±0,6	0	9,3±0,6	11,0±1,0	10,0±0,0	10,2±0,3
MeOH 10 µg	0	0	0	0	0	0	0
MeOH 25 µg	0	0	0	0	0	0	0
MeOH 50 µg	0	0	0	0	0	0	0
MeOH 100 µg	0	0	0	0	0	0	0
Tetraciclina 7 µg	9,8 ±1,6	12,7±1,2	11,2±0,9	11,2±0,9	11,3±0,6	9,7±1,3	8,4±1,4
DMSO	0 (±0)	0 (±0)	0 (±0)	0 (±0)	0 (±0)	0 (±0)	0 (±0)

*p<0.05; **p<0.01; *** p<0.001 vs DMSO

Legenda: 1) *Pseudomonas aeruginosa*, 2) *Escherichia coli* 8579, 3) *Chromobacterium violaceum*, 4) *Cronobacter sakazakii*, 5) *Staphylococcus aureus*, 6) *Bacillus cereus* 4313, 7) *Bacillus cereus* 4384.

Sono in corso studi per identificare i metaboliti secondari, contenuti nelle tre specie di iperico analizzate, responsabili di tale attività biologica.

5.6 Attività anti-quorum sensing

I risultati relativi all'attività anti-quorum sensing sono riportati nella Tabella 11. Molti studi hanno sottolineato che i polifenoli sono in grado di interferire con i sistemi batterici QS. In questo lavoro, condotto con il test di diffusione su disco, è stato valutato l'effetto degli estratti etanolic e in acetato di etile di *H. connatum* sul sistema QS del ceppo *Chromobacterium violaceum* DSM 30191. In particolare, l'estratto etanolic, alla dose di 25 µg, ha inibito la produzione di pigmenti violacei prodotti dal *Chromobacterium violaceum* e responsabili dell'attività QS, senza interferire con la crescita batterica, mentre alle dosi più alte testate (50 µg e 100 µg) l'estratto ha mostrato anche attività antimicrobica (Marandino *et al.*, 2010). Invece, l'estratto in acetato di etile, alle dosi impiegate, è risultato privo di qualunque attività.

Tabella 11 – Attività anti-quorum sensing degli estratti etanolic e acetato di etile di *H. connatum* contro ceppi di *C. violaceum*. La tetraciclina (7 µg) e il DMSO sono stati usati come controlli positivo e negativo, rispettivamente. I risultati rappresentano la media±deviazione standard in tre esperimenti indipendenti.

<i>EtOH estratto</i>	<i>Chromobacterium violaceum</i>
10 µg	No AQS: Growth with production of violacein
25 µg	AQS: Growth without production of violacein
50 µg	7.3±0.6***
100 µg	9.3±0.6***
<i>EtOAc estratto</i>	
10 µg	No AQS: Growth with production of violacein
25 µg	No AQS: Growth with production of violacein
50 µg	No AQS: Growth with production of violacein
100 µg	No AQS: Growth with production of violacein
Tetraciclina (7 µg)	11.2±0.9
DMSO	No AQS: Growth with production of violacein

*** p<0.001 vs DMSO

Le attività anti QS e antimicrobica esibite dall'estratto etanolic potrebbero essere dovute all'effetto sinergico di rutina (Figura 23) e apigenina (Figura 24), flavonoidi assenti nell'estratto in acetato di etile.

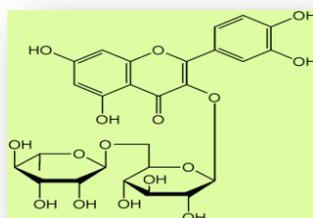


Figura 23 – Rutina.

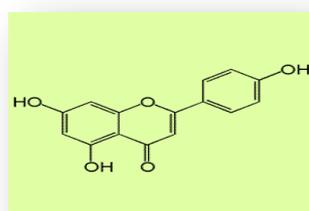


Figura 24 – Apigenina.

5.7 Ricerca dei cardenolidi e attività cardiotonica

Con saggi farmacognostici è stata confermata la presenza dei cardenolidi nell'estratto etanolic di *H. connatum*, dimostrata per la prima volta in uno studio (Fusco *et al.*, 2007) teso a validare l'uso in medicina tradizionale argentina. Inoltre, in uno studio *in vivo* è stata verificata l'attività cardiotonica degli estratti etanolic e in acetato di etile di *H. connatum*, rispetto ai controlli. Dai dati elaborati, l'estratto etanolic è risultato attivo, mentre l'estratto in acetato di etile è risultato privo di effetto (Tabella 12).

Tabella 12 - Attività cardiotonica degli estratti di *H. connatum*, rispetto ai controlli, valutata registrando l'attività cardiaca con ecg a intervalli di 15 minuti in un tempo sperimentale complessivo di circa 60 minuti.

Tempo	HC-EtOAc Gruppo I Fc	HC-EtOH Gruppo II Fc	Ctrl Gruppo III Fc	Note
0				Anestesia
5'	304	314	315	Ecg 1 (basale)
20'	247	255	260	Ecg 2
35'	233	240	238	Ecg 3
40'	231	243	238	Ecg 4 (trattamento)
55'	228	251	232	Ecg 5 (stop)
60'				Risveglio

Legenda: HC-EtOAc= *H. connatum*–estratto in acetate di etile, HC-EtOH= *H. connatum*–estratto etanolic, Ctrl= controllo, Fc= frequenza cardiaca.

Conclusioni

Dalla frazione cromatografica XI dell'estratto etanolico di *H. connatum* è stato purificato tramite HPLC un composto flavonoidico, identificato come genisteina mediante analisi ^1H e ^{13}C NMR. La presenza di questo isoflavonoide è inusuale nella famiglia delle Guttiferae e questa sembra la prima segnalazione della presenza di un composto isoflavonoidico in questa famiglia (Lapčík, 2007).

La composizione dei polifenoli degli estratti etanolic e in acetato di etile di *H. connatum*, ottenuta mediante UPLC, ha evidenziato la presenza nei due estratti di alcuni composti comuni: acido gallico, acido clorogenico, acido ferulico, luteolina e iperoside. I polifenoli più abbondanti nei due estratti sono risultati iperoside e acido clorogenico. L'etanolo ha estratto in via esclusiva rutina e apigenina, e in modo più efficace acido gallico e acido clorogenico, rispetto all'estratto in acetato di etile, mentre, quest'ultimo, ha estratto acido caffeico, epicatechina, acido cumarico e naringenina, non presenti nell'estratto etanolic (Marandino *et al.*, 2010). I flavonoidi come l'epicatechina, che costituiscono una parte importante della dieta umana, posseggono diverse attività biologiche come quelle antiossidante e antinfiammatoria. Derivati dell'acido cinnamico, come gli acidi clorogenico, caffeico e cumarico hanno dimostrato attività antiossidante e antilipidemia.

Inoltre, gli stessi estratti, e in particolare l'estratto etanolic, hanno esibito una forte attività scavenging. La maggiore attività antiossidante dell'estratto etanolic, rispetto all'estratto in acetato di etile, potrebbe essere attribuita all'effetto della rutina. La presenza del flavonoide rutina nell'estratto etanolic, concorda con la letteratura che ha segnalato questo flavonoide in *H. brasiliense* (Abreu *et al.*, 2004) e nei fiori di *H. perforatum* (Mártonfi *et al.*, 1996). Tuttavia, questo composto non è stato rilevato nell'estratto metanolic di *H. connatum* dal sud del Brasile (Nunes *et al.*, 2010). Come dimostrato in un recente studio (Parker *et al.*, 2008), la rutina, essendo facilmente assorbita, può raggiungere diversi tessuti, il plasma e l'intestino dove può influenzare la crescita di alcuni patogeni. Inoltre, la rutina agisce come chelante e come potente scavenger di radicali liberi. In questo modo, questo composto condiziona significativamente la funzione dei vari sistemi cellulari di mammiferi. Simile alla maggior parte dei polifenoli, la rutina ha una forte attività antiossidante e svolge un ruolo di modulazione della crescita cellulare in alcuni tipi di cancro. È in grado di controllare l'entità del danno mitocondriale e di ridurre lo stress ossidativo nei leucociti in pazienti con artrite reumatoide.

La composizione degli oli essenziali di *H. hircinum*, *H. perfoliatum* e *H. perforatum* è stata analizzata con GC e GC/MS. Il profilo chimico dell'olio essenziale di *H. perforatum* emerso è in parte diverso da quello più comune descritto in letteratura. Infatti, l'olio essenziale esaminato è risultato ricco in idrocarburi sesquiterpenici, mentre nella maggior parte dei lavori scientifici è riportato un contenuto prevalente in monoterpenoidi. Comunque, l'olio essenziale studiato è risultato simile nella composizione a oli di *H. perforatum* provenienti dalla Francia mediterranea (Schwob *et al.*, 2002). Gli oli essenziali di *H. perfoliatum* e di *H. hircinum*, invece, sono risultati simili a quelli riferiti in letteratura. Il primo olio, infatti, ha mostrato una prevalenza di idrocarburi monoterpenici, come descritto per oli di provenienza greca (Couladis *et al.*, 2001), mentre l'olio di *H. hircinum* è risultato simile a quelli di provenienza italiana (Maggi *et al.*, 2010). I dati ottenuti, infine, potrebbero essere utili nel chiarire i rapporti chemotassonomici all'interno del genere *Hypericum*. La frazione volatile, infatti, è stata proposta in questo genere come utile

marker tassonomico a supporto della classificazione basata su criteri morfologici (Nogueira *et al.*, 2008).

E' stato dimostrato che estratti di alcune specie appartenenti al genere *Hypericum* hanno effetto fitotossico (Fritz *et al.*, 2007 a). Per questa ragione è stato valutato il possibile effetto fitotossico degli oli essenziali sulla germinazione e sulla iniziale crescita della radichetta di ravanello e crescione. Nessuno degli oli saggiati ha influenzato la germinazione del ravanello in modo significativo; la germinazione del crescione, invece, è stata inibita dall'olio essenziale di *H. hircinum*, solo alla dose più alta testata. L'allungamento iniziale della radichetta di ravanello è risultata più sensibile all'azione degli oli rispetto a quello del crescione. Infatti, *H. hircinum* ha inibito in modo significativo l'iniziale allungamento radicale, alle dosi più alte utilizzate nei biosaggi, mentre *H. perforatum* e *H. hircinum* hanno inibito in modo significativo l'iniziale allungamento radicale del crescione, solo alle dosi maggiori saggiate.

Lo studio degli effetti protettivi delle specie in esame sulle conseguenze comportamentali indotte nel ratto dallo stress inevitabile è stato condotto *in vivo*, con il test di fuga, con lo scopo di ricercare una possibile attività antidepressiva di *H. connatum* e di ottenere ulteriori dati circa il controverso effetto antidepressivo descritto in letteratura per *H. hircinum* e *H. perforatum*. In particolare, dopo singola somministrazione, l'estratto di *H. connatum* si è dimostrato in grado di prevenire le conseguenze dell'esposizione allo stress inevitabile ad entrambe le dosi testate; l'estratto di *H. perforatum* è risultato attivo solo alla dose di 1 g/kg, mentre l'estratto di *H. hircinum* è risultato privo di effetti significativi. Inoltre, l'estratto di *H. perforatum* è risultato attivo solo alla dose di 0,5 g/kg. Dopo somministrazione ripetuta, alla dose di 1 g/kg due volte al giorno per 14 giorni, tutti gli estratti testati si sono dimostrati in grado di prevenire le conseguenze dell'esposizione allo stress inevitabile, con un effetto simile a quello della fluoxetina.

Infine, entrambe le frazioni cromatografiche B e C di *H. connatum* si sono rivelate attive dopo singola somministrazione, alla dose di 0,25 g/kg, nel prevenire il deficit di fuga. Il successivo frazionamento della frazione C, mediante HPLC, ha permesso la purificazione di tre composti che sono stati identificati con spettroscopia NMR come isoquercetina, rutina e quercetina. Di quest'ultimo composto è descritto in letteratura l'effetto antidepressivo (Chimenti *et al.*, 2006).

L'attività antidepressiva osservata dopo trattamento ripetuto con gli estratti in esame con il modello ED è in accordo con i risultati ottenuti da altri ricercatori con il test Porsolt (Butterweck *et al.*, 1997).

H. perforatum e *H. connatum* sembrerebbero i primi farmaci a mostrare l'effetto protettivo sullo sviluppo ED (escape deficit) in acuto, effetto che è mantenuto anche dopo somministrazioni ripetute. Infatti, gli estratti di *H. perforatum* e *H. connatum* hanno mostrato attività protettiva anche dopo singola somministrazione, mentre gli antidepressivi classici, come imipramina e fluoxetina, hanno mostrato effetti significativi nel paradigma ED solo 15 giorni dopo le somministrazioni per os (Gambarana *et al.*, 1995).

I meccanismi coinvolti in tale effetto sembrerebbero implicare l'attivazione simultanea dei sistemi dopaminergico e serotoninergico. In particolare, la quercetina agirebbe aumentando la disponibilità di catecolamine attraverso un meccanismo di inibizione degli enzimi MAO e COMT (Chimenti *et al.*, 2006).

E', infine, probabile che la potente attività antidepressiva mostrata dall'estratto etanolicco di *H. connatum*, correlata alla capacità di prevenire le conseguenze comportamentali indotte dallo stress inevitabile dopo somministrazione singola o

ripetuta, possa essere dovuta all'effetto sinergico della quercetina con altri principi attivi in esso contenuti.

Lo studio antimicrobico *in vitro* è stato condotto con l'obiettivo di ricercare una possibile attività antibatterica dei diversi estratti delle specie in esame nei confronti di ceppi microbici selezionati, e soprattutto contro due microorganismi patogeni emergenti come *Chromobacterium violaceum* e *Cronobacter sakazakii*.

In particolare, nei confronti di *C. violaceum* sono risultati significativamente attivi, in modo dose-dipendente, solo l'estratto etanologico di *H. connatum* e l'estratto in etere di petrolio di *H. hircinum*, mentre, contro *C. sakazakii* sono risultati significativamente attivi, in modo dose-dipendente e a tutte le dosi testate, sia gli estratti in etere di petrolio, in *cloroformio* e in *miscela* di cloroformio:metanolo (9:1) di *H. perforatum* che gli estratti in etere petrolio e cloroformio di *H. hircinum*. L'estratto etanologico è risultato significativamente attivo, in modo dose-dipendente, contro *Bacillus cereus* DSM 4384 e *Escherichia coli*. Inoltre, l'estratto è risultato attivo, alla dose più alta testata (100 µg), contro *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* DSM 4313; mentre non ha mostrato attività nei confronti sia di *Pseudomonas Aeruginosa* che di *Cronobacter sakazakii*. Infine, l'estratto in acetato di etile è risultato significativamente attivo, in modo dose-dipendente, nei confronti di tutti i microorganismi usati nel test.

Questi risultati confermano precedenti studi (Meral e Karabay, 2002) che avevano dimostrato l'attività antibatterica di un estratto alcolico di *H. perforatum* contro batteri Gram-negativi e Gram-positivi. Inoltre, in diverse specie di *Hypericum* l'attività antimicrobica è stata correlata anche alla quantità di flavonoidi presenti nella pianta (Rocha *et al.*, 1995). Questo studio potrebbe suggerire lo sviluppo di preparati a base di estratti di specie di iperico da utilizzare, in particolare, per il trattamento delle infezioni causate da microorganismi patogeni emergenti come *Chromobacterium violaceum*, bacillo Gram-negativo anaerobio facoltativo, responsabile di lesioni della pelle, sepsi e ascessi epatici che possono essere fatali, e *Cronobacter sakazakii*, enterobatterio Gram-negativo anaerobio-facoltativo, asporigeno, responsabile di gravi infezioni nei bambini (meningite, enterocolite necrotizzante), con elevati tassi di mortalità (40% - 80%), associate con il consumo di latte artificiale in polvere.

Gli estratti etanologico e in acetato di etile di *H. connatum* sono stati analizzati per una possibile attività anti-quorum sensing contro ceppi di *Chromobacterium violaceum* DSM 30191. I risultati hanno rivelato che l'estratto etanologico, alla dose di 25 µg, ha inibito il sistema quorum sensing regolato dalla violaceina, un pigmento viola prodotto in risposta a molecole segnale, senza interferire con la crescita batterica. Tale attività potrebbe essere dovuta all'effetto sinergico di rutina e apigenanina, presenti selettivamente nell'estratto etanologico. Tali risultati confermano l'uso di *H. connatum* in medicina tradizionale. Infine, questo studio potrà rivelarsi utile per la scoperta di nuove sostanze bioattive per fini clinici e nel comparto agroalimentare.

Infine, con saggi farmacognostici è stata confermata la presenza dei glicosidi cardioattivi nell'estratto etanologico di *H. connatum*, dimostrata per la prima volta in uno studio (Fusco *et al.*, 2007) teso a validare l'uso in medicina tradizionale argentina. Inoltre, in uno studio condotto *in vivo* è stata verificata l'attività cardiotonica dell'estratto etanologico di *H. connatum*, rispetto ai controlli. L'attività cardiotonica riscontrata nei ratti trattati con l'estratto etanologico di *H. connatum*, e manifestata tramite l'aumento della frequenza cardiaca, non è correlabile con l'effetto dei glicosidi cardioattivi, che si caratterizzano di un meccanismo d'azione di tipo cronotropo negativo e inotropo positivo. Pertanto, è probabile che tale attività possa essere dovuta ad altri composti.

Materiali e metodi

6.1 Materiale vegetale

H. connatum è stato raccolto a San Luis (Argentina), nell'ottobre del 2010, ed è stato identificato dalla Dr.ssa M. R. Fusco. Un buon esemplare di pianta è conservato nell'Erbario dell'Università Nazionale di San Luis.

H. hircinum e di *H. perfoliatum* sono stati raccolti in Agerola, a 20 Km a nord di Salerno in giugno 2009, nel periodo di piena fioritura; mentre, *H. perforatum* è stato raccolto nel Campus dell'Università di Salerno, nel mese di giugno 2009, nel periodo di piena fioritura.

6.1.1 Estrazione

Le parti aeree (5 kg) *H. connatum* sono state essiccate ed estratte con metanolo per 2 giorni a temperatura controllata. L'estratto residuo ottenuto (840 g) è stato diviso in una frazione solubile in acetato di etile (235 g) ed in una frazione solubile in etanolo (350 g). Successivamente, 500 mg di estratto etanolicco sono stati risospesi in 5ml di H₂O e 1 ml di EtOH, e 500 mg di estratto in acetato di etile sono stati risospesi in 5ml di H₂O, 1 ml di EtOH e 2 ml di acetato di etile. Entrambi gli estratti sono stati concentrati fino 100 mg/ml e poi sono stati sottoposti ad analisi biochimiche e biologiche.

Le parti aeree appena raccolte di *H. hircinum*, *H. perfoliatum* e *H. perforatum* sono state utilizzate per estrarne l'olio essenziale, mentre il materiale vegetale rimanente di *H. hircinum* e di *H. perfoliatum* è stato essiccato e polverizzato e da esso sono stati estratti i metaboliti secondari con solventi a polarità crescente (etere di petrolio, CHCl₃, CHCl₃:MeOH 9:1, MeOH).

6.1.2 Purificazione dell'estratto etanolicco

L'estratto etanolicco di *H. connatum* è stato frazionato in un sistema di H₂O-BuOH. L'estratto BuOH (2,66 g) è stato solubilizzato in metanolo e successivamente frazionato con cromatografia ad esclusione dimensionale su colonna di Sephadex LH-20, eluente MeOH. È stata usata la TLC per raggruppare le 168 frazioni ottenute in XIV frazioni principali; i sistemi eluenti usati sono stati: BAW (butanolo - acido acetico - acqua) e una miscela di cloroformio - metanolo - acqua. Per la presenza di flavonoidi, rivelati con TLC, è stata ulteriormente frazionata la riunione RXI (195 mg) e i relativi composti in essa contenuti sono stati successivamente purificati attraverso HPLC.

6.1.3 HPLC

La purificazione dei composti è stata ottenuta con HPLC a fase inversa, utilizzando una colonna μ -Bondapack C₁₈ semipreparativa (30 cm x 7,8 mm). La frazione XI è stata eluita con una miscela a gradiente di acqua:metanolo (20%:80%

55', 0%:100% 65') ad un flusso di 2,00 ml/min. Sono state recuperate cinque frazioni 1, 2, 3, 4, 5 (Figura 25).

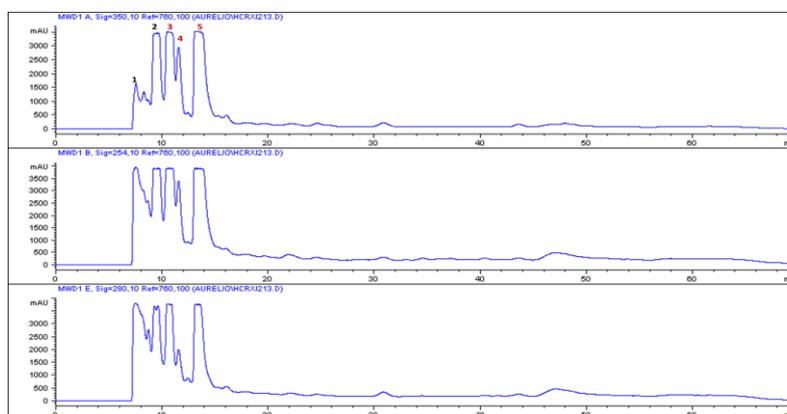


Figura 25 - *Hypericum connatum*, cromatogramma riunione XI Sephadex.

Di queste, solo la frazione indicata dal picco n. 5 (7,9 mg) è stata caratterizzata, mentre le altre frazioni sono in corso di caratterizzazione.

6.1.4 NMR

Il composto purificato è stato solubilizzato in MeOD, identificato con ^1H NMR (Figure 26 e 27) e ^{13}C NMR (Figure 28 e 29), e i dati sono stati comparati con quelli disponibili in letteratura. L'analisi spettroscopica è stata eseguita con un apparecchio Bruker Spectrospin 600 MHz.

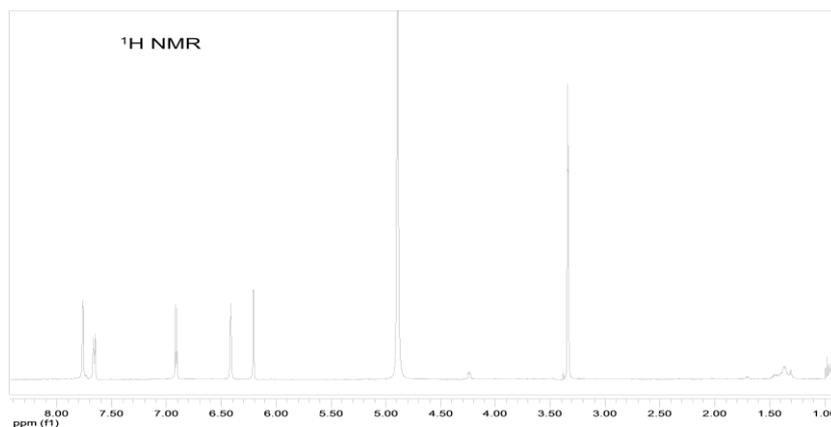


Figura 26 - *Hypericum connatum*, riunione XI Sephadex, frazione 5. Spettro protonico.

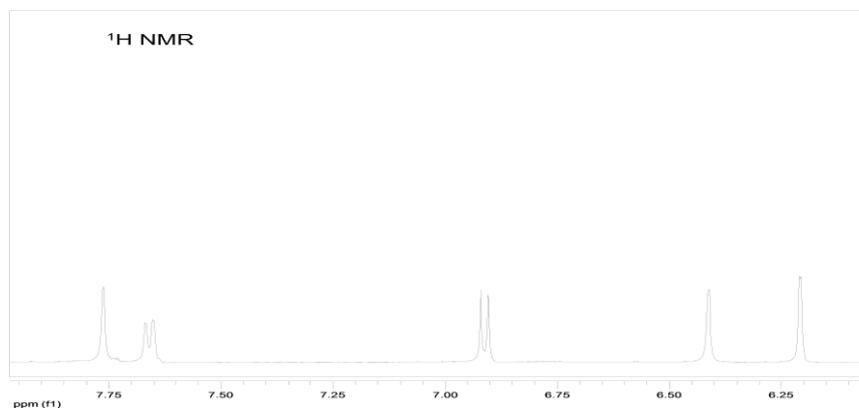


Figura 27 - *Hypericum connatum*, riunione XI Sephadex, frazione 5. Spettro protonico.

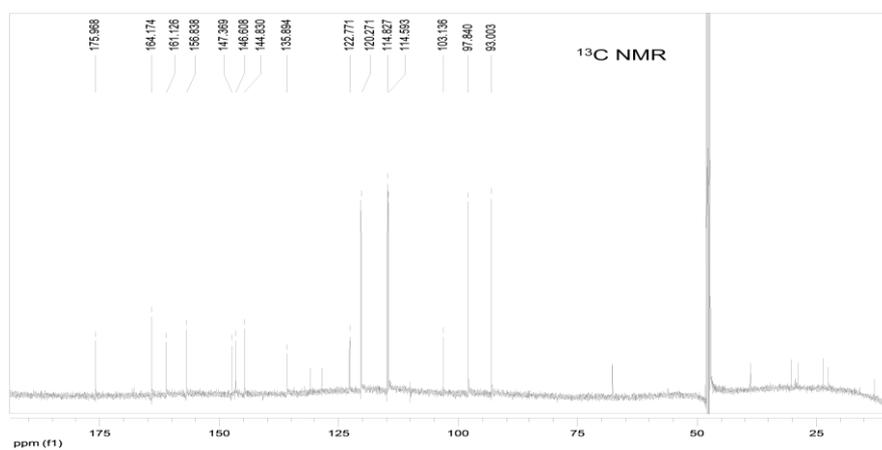


Figura 28 - *Hypericum connatum*, riunione XI Sephadex, frazione 5. Spettro ¹³C NMR.

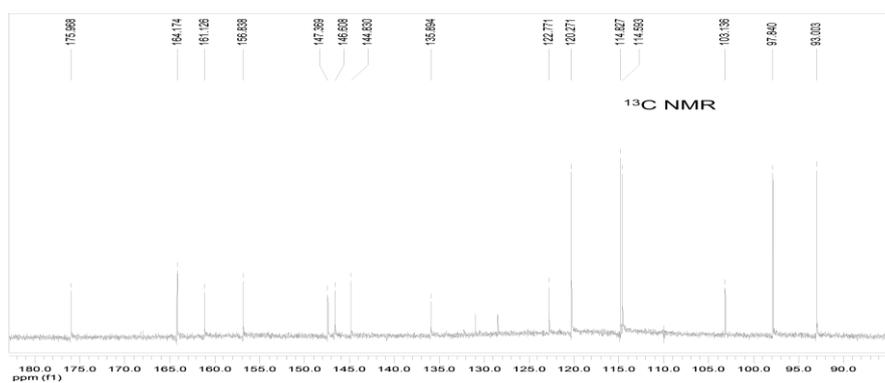


Figura 29 - *Hypericum connatum*, riunione XI Sephadex, frazione 5. Spettro ¹³C NMR.

6.1.5 Purificazione degli estratti cloroformici

Gli estratti cloroformici di *H. hircinum* e di *H. perfoliatum* sono stati frazionati con cromatografia di adsorbimento su colonna di silice, eluendo con cloroformio e miscele di cloroformio-metanolo di polarità crescente. Le 737 frazioni di *H. hircinum* e le 1021 di *H. perfoliatum*, così ottenute, sono state analizzate con cromatografia su strato sottile (TLC), con lastre di gel di silice, utilizzando sistemi eluenti con polarità diverse. Tali frazioni sono state poi raggruppate, rispettivamente, in XXV e XLIV frazioni maggiori in base alla loro similarità cromatografica.

6.1.6 Cromatografia su strato sottile

La cromatografia su strato sottile analitica in fase diretta è stata effettuata con lastre di vetro coperte da gel di silice. La rivelazione è stata effettuata sia con la luce UV, di 254 e 366 nm, che con un reattivo spray composto da 4 g di solfato di cerio, 200 ml di acqua e 70 ml di acido solforico.

6.1.7 Purificazione degli estratti metanolici

Gli estratti metanolici di *H. hircinum* e di *H. perfoliatum* sono stati frazionati con cromatografia ad esclusione dimensionale su colonna di Sephadex LH-20. L'eluente utilizzato è stato il MeOH. E' stata usata la TLC per raggruppare le 101 frazioni di *H. hircinum* e le 190 frazioni di *H. perfoliatum*, così ottenute, in XII e in XV frazioni principali, rispettivamente; i sistemi eluenti usati sono stati: BAW e una miscela di cloroformio – metanolo - acqua.

6.1.8 Estrazione olio essenziale

Cinquecento grammi di parti aeree appena raccolte di *H. hircinum*, *H. perfoliatum* e *H. perforatum* sono stati tagliati in piccoli pezzi e poi sottoposti a distillazione in corrente di vapore per 3 ore, secondo la procedura descritta nella Farmacopea Europea (*European Pharmacopoeia* Council of Europe, 2004). La procedura di estrazione è stata ripetuta 3 volte, su 3 campioni dello stesso materiale vegetale.

6.1.9 GC

L'analisi Gas cromatografica è stata eseguita con un gascromatografo Perkin-Elmer Sigma-115 equipaggiato con FID e un processore di gestione dati. Il frazionamento è stato ottenuto utilizzando una colonna capillare di silice fusa HP-5 MS (30 m × 0,25 mm, d.i. 0,25 µ). Temperatura della colonna: 40 °C per 5 min e, quindi, a 270 °C a 2 °C / min e, infine, a 270 °C in isoterma per 20 min; iniezione in modalità splitless. Le temperature dell'iniettore e del rivelatore sono state 250 °C e 290 °C, rispettivamente. L'analisi è stata eseguita anche utilizzando una colonna capillare HP INNOWax di polietilenglicole (50 m × 0,20 mm d.i. 0,25 µ). In entrambi i casi, è stato utilizzato l'elio come carrier (1,0 mL / min).

6.1.10 GC/MS

L'analisi è stata eseguita con uno strumento Agilent 6850 Ser. II, equipaggiato con una colonna capillare di silice fusa DB-5 (30 m × 0,25 mm, d.i. 0,33 μ), accoppiato ad un Mass Agilent Selective Detector MSD 5973; l'energia di ionizzazione 70 eV. Gli spettri di massa sono stati acquisiti nel range 40-500 amu, in numero di 5 scansioni per secondo. Le condizioni gascromatografica sono state le stesse di quelle riportate nel precedente paragrafo; transfer line 295 °C.

6.1.11 Identificazione composti

La maggior parte dei componenti sono stati identificati mediante confronto dei loro indici di ritenzione sia con quelli della letteratura (Jennings e Shibamoto, 1980; Davies, 1990) e sia con quelli di composti standards disponibili nel nostro laboratorio. Gli indici di Kovats sono stati determinati in relazione a una serie omologa di *n*-alcanti (C10-C35), nelle stesse condizioni operative. L'identificazione è stata ottenuta attraverso il confronto tra gli spettri di massa con quelli contenuti nelle librerie NIST02 e Wiley275 o con spettri di massa riportati in letteratura (Jennings e Shibamoto, 1980; Adams, 2007) e con una biblioteca costruita in laboratorio.

6.2 Test biologici

6.2.1 Analisi colorimetrica e composizione polifenolica

I fenoli totali sono stati determinati seguendo i metodi di Singleton e Rossi (1965) con il reagente di Folin-Ciocalteu. L'assorbanza è stata calcolata con uno spettrofotometro Cary Uv/Vis (Varian Cary 50 MPR, USA) a lunghezza d'onda di 760 nm. L'analisi quantitativa è stata ottenuta usando come standard l'acido gallico. I risultati sono stati espressi come mg di acido gallico (GAE)/g per grammo di estratto.

Le analisi UPLC (Figura 30) sono state effettuate utilizzando un sistema ACQUITY Ultra Performance LCTM (Water, Milford, MA, USA) connesso al rivelatore fotodiode a serie PDA 2996 (Water, Milford, MA, USA). Il rivelatore di lunghezza d'onda UV è stato regolato a 280 nm. E' stato usato il software Empower per l'acquisizione e l'elaborazione dati. Le analisi sono state eseguite a 30°C usando una colonna a fase inversa (BEH C18, 1.7 micron, 2.1 x 100 mm, Waters, Milford, MA, USA). La fase mobile è stata rappresentata da un solvente A (7.5 mM acido acetico) e da un solvente B (acetonitrile), ad un flusso di 250 μL min⁻¹ (Gruz *et al.*, 2008). L'eluizione in gradiente è stata impostata partendo con 5% B per 0.8 min, 5-20% B per 5.2 min, isocratica 20% B per 0.5 min, 20-30% B per 1 min, isocratica 100% B per 1 min, e infine 100-5% B per 0.5 min. A fine corsa, la colonna è stata riequilibrata alle condizioni iniziali di 2.5 min. Durante la corsa cromatografica, i valori di pressione sono oscillati da 6,000 a 8,000 psi. L'effluente è stato introdotto ad un rivelatore LC (portata di scansione 210-400 nm, risoluzione 1.2 nm). Il volume di iniezione impiegato è stato di 5 o 10 μL.

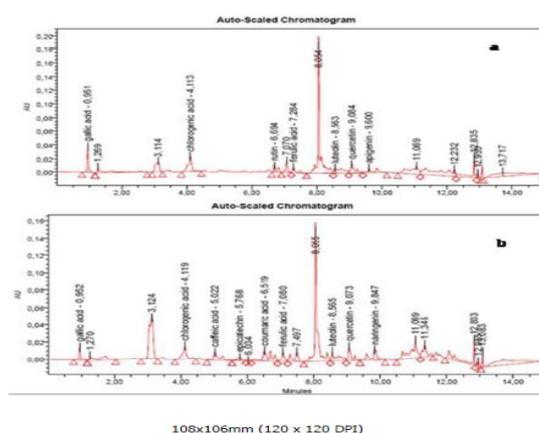


Figura 30 – Analisi qualitativa mediante UPLC dei composti polifenolici degli estratti etanolo e acetato di etile di *H. connatum*.

6.2.2 Attività antiossidante

L'attività scavenging è stata misurata con il radicale stabile 2,2-difenil-1-picrilidrazile (DPPH) (Brand-Williams *et al.*, 1995). L'analisi è stata effettuata in microplates aggiungendo 7.5 μ L di estratto a 303 μ L di una soluzione di DPPH e metanolo (153 mM). L'assorbanza è stata calcolata con uno spettrofotometro (Varian) regolato ad una lunghezza d'onda di 517 nm. L'assorbanza del DPPH senza antiossidante (controllo campione) è stata considerata come riferimento. L'attività scavenging è stata espressa come il 50% della concentrazione effettiva (EC_{50}) del campione, in termini di μ g/mL, necessaria ad inibire l'attività radicalica del DPPH del 50% dopo 60 minuti di incubazione. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato e i risultati sono stati espressi come la media \pm deviazione standard (figura 22).

6.2.3 Attività fitotossica

Per studiare gli effetti fitotossici degli oli essenziali sui semi di *Raphanus sativus* L. cv. "Saxa" (ravanello) e *Lepidium sativum* L. (crescione), è stato utilizzato un biotest basato sulla germinazione e sulla conseguente crescita della radichetta. I semi di *Raphanus sativus* e *Lepidium sativum* sono stati acquistati dalla ditta Blumen srl di Piacenza. I semi sono stati sterilizzati in superficie con etanolo al 95% per 15 sec e seminati in capsule di Petri (\varnothing = 90 mm), contenenti 5 strati di carta da filtro Whatman impregnati di acqua distillata (7 ml, controllo) o di soluzione di prova dell'olio essenziale (7 ml). Gli oli essenziali in acqua:acetone (95.5:0.5) sono stati testati a diversi dosaggi: 2,5; 1,25; 0,625; 0,25; 0,125; 0,06 mg/ml. Le condizioni di germinazione sono state di 20 ± 1 °C, con fotoperiodo naturale. Il processo di germinazione è stato osservato direttamente nelle capsule di Petri, dopo 24 h. Un seme è stato considerato germinato quando è risultata evidente la sporgenza della radice (Bewley e Black, 1985). Dopo 120 h (quinto giorno), gli effetti sull'allungamento della radichetta sono stati misurati in cm. Ogni determinazione è stata ripetuta 3 volte, utilizzando piastre di Petri contenenti ciascuna 10 semi.

6.2.4 Analisi dei dati

I dati sono stati espressi come $media \pm DS$ sia per la germinazione che per l'allungamento della radichetta. I dati, ordinati in set omogenei, sono stati elaborati con il test t di Student (Sokal e Rohlf, 1981).

6.3 Saggi biologici *in vivo*

6.3.1 Animali

Gli esperimenti sono stati effettuati su ratti maschi Sprague-Dawley (Charles River, Calco, Italia) di peso iniziale di 125-150 g. Gli animali sono stati sistemati in numero di quattro per gabbia e tenuti in ambiente controllato, a temperatura e umidità costanti, e in condizione invertita di luce/buio a cicli di 12 ore (07:00 luci spente, 19:00 luci accese), con libero accesso al cibo e all'acqua. Prima dell'inizio dei trattamenti, i ratti sono stati abituati alla stessa colonia per almeno una settimana. Le procedure utilizzate in questo studio sono state eseguite in stretto accordo con la legislazione europea (EEC n. 86/609) e sono state approvate dal Comitato Etico dell'Università di Siena e dal Ministero della Salute.

6.3.2 Preparazione delle sospensioni

Gli estratti sono stati solubilizzati in etanolo al 20% e somministrati per os in un volume di 2 ml/kg di peso corporeo. Le frazioni cromatografiche di *H. connatum* sono state solubilizzate in DMSO/acqua 50:50 vol/vol e somministrate per os in un volume di 1 ml/kg di peso.

6.3.3 Procedura di stress acuto

Il modello ED (Escape Deficit) è una variante della classica *Learned Helplessness Syndrome* (Gambarana *et al.*, 1995). In breve, la sessione di stress inevitabile ha una durata di 50 min. Ogni ratto viene completamente immobilizzato da una rete metallica flessibile, con la coda esposta a cui viene collegato un elettrodo, e sottoposto a circa 80 scosse elettriche (1 mA x 5 sec, 1 ogni 30 sec). Ventiquattro ore dopo, i ratti sono valutati con il test di fuga in un apparato costituito da una gabbia in plexiglas (30 x 60 x 30 cm) con pareti scure e un pavimento dotato di barre di acciaio inox distanziate di 1 cm l'una dall'altra. La gabbia è divisa, per mezzo di una parete in plexiglas scura dotata di una porta scorrevole delle dimensioni di 10 x 10 cm, in due compartimenti uguali di cui uno (camera neutra) non elettrificato e l'altro (camera elettrificata) connesso per mezzo di un elettrodo ad uno stimolatore Grass S 44. L'animale, alla cui coda è collegato un elettrodo, è posto nella camera elettrificata dove è lasciato per un periodo di 5 minuti libero di ambientarsi nei due compartimenti. Successivamente, al ratto vengono somministrate 30 scariche elettriche consecutive (1 mA x 3,5 sec), ad intervalli di 30 secondi e in corrispondenza di ogni scossa viene aperta la porta di collegamento tra i compartimenti per un periodo di 3,5 secondi. Gli animali scappati verso la camera neutra, in coincidenza di ogni scossa elettrica,

vengono reintrodotti nella camera elettrificata alla fine dei 3,5 secondi. A questo punto si segna il numero di fughe che il ratto compie su 30 prove.

6.3.4 Procedura di stress cronico

Dopo 14 giorni di trattamenti ripetuti, i gruppi di ratti sono esposti alle sessioni standard di stress inevitabile e di prove di fuga, analogamente alla procedura in acuto.

6.3.5 Effetto protettivo sulle conseguenze comportamentali da stress

Gli esperimenti sono stati condotti in due periodi diversi: nel primo periodo (novembre 2010) è stato valutato l'effetto protettivo della somministrazione acuta e cronica delle piante in esame, rispetto ai controlli, sulle conseguenze comportamentali indotte nei ratti dallo stress inevitabile; nel secondo periodo (agosto 2011) è stato valutato l'effetto protettivo di due frazioni cromatografiche (B e C) ottenute dall'estratto etanologico dell'*H. connatum* mediante frazionamento con Sephadex LH-20, rispetto ai controlli. Nel primo periodo, sono stati utilizzati 44 ratti distinti in 6 gruppi di cui 4, di 8 ratti ciascuno, sono stati trattati nel modo seguente: il primo gruppo con l'estratto etanologico di *H. connatum*, il secondo gruppo con l'estratto metanologico di *H. hircinum*, il terzo gruppo con l'estratto metanologico di *H. perfoliatum*, il quarto gruppo con l'estratto idroalcolico di *H. perforatum*, nel trattamento acuto, e con fluoxetina, nel trattamento ripetuto. Gli altri 2 gruppi, di 6 ratti ciascuno, trattati con 2 ml/kg p.v. di soluzione fisiologica, sono stati i controlli (controllo stress e naive). I ratti sono stati pre-testati e testati in acuto e in cronico. Nella fase di pre-test, i ratti sono stati trattati con gli estratti alle dosi di 0,5 g/kg p.v. e 1 g/kg p.v. e, 60 minuti dopo, sottoposti a stress inevitabile. Dopo 24 ore, i ratti sono stati valutati con il test di fuga.

Nel secondo periodo, sono stati utilizzati 21 ratti distinti in 4 gruppi di cui il primo di 8 ratti è stato trattato con la frazione cromatografica B (1,2647 g), il secondo di 4 ratti è stato trattato con la frazione cromatografica C (0,4225 g) e gli altri 2 gruppi (uno di 6 ratti e l'altro di 3 ratti), trattati con soluzione fisiologica, sono stati i controlli (6 stress e 3 naive). I ratti sono stati pre-testati e testati in acuto. Nella fase di pre-test, i ratti sono stati trattati con le frazioni B e C alle dosi di 0,250 g/Kg e, 60 minuti dopo, sottoposti a stress inevitabile. Dopo 24 ore, i ratti sono stati valutati con il test di fuga.

6.1.6 HPLC

La purificazione dei composti è stata ottenuta con HPLC a fase inversa, utilizzando una colonna μ -Bondapack C₁₈ semipreparativa (30 cm x 7,8 mm). La frazione C è stata eluita con una miscela in isocratica acqua:metanolo (30%:70%, 60') ad un flusso di 1,00 ml/min. Sono state recuperate tre frazioni.

6.3.7 NMR

Gli studi NMR sono stati eseguiti con lo strumento Bruker Spectrospin 600 MHz. I campioni di flavonoidi sono stati solubilizzati in CD₃OD e i dati sono stati comparati con quelli disponibili in letteratura.

6.3.8 Analisi dei dati

Tutti i dati sono stati espressi come $media \pm S.E.M.$. Dato che più trattamenti sono stati confrontati con i valori di un unico gruppo di controllo, confronti statistici sono stati fatti con un test non parametrico, ANOVA (Kruskal-Wallis), seguito dall'analisi "post hoc" utilizzando la comparazione multipla Dunn prova (InStat 2,01 per Macintosh, Software GraphPad, Inc.), se non diversamente specificato.

6.4 Saggi biologici *in vitro*

6.4.1 Attività antimicrobica

Gli estratti di *H. connatum*, *H. perfoliatum*, *H. hircinum* sono stati analizzati mediante il test di diffusione sul disco, a dosaggi diversi (10 µg, 25 µg, 50 µg, 100 µg), per valutare l'efficacia di inibizione su *Escherichia coli* DSM 8579, *Bacillus cereus* DSM 4313 e DSM 4384, *Staphylococcus aureus* DSM 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 50071, *Chromobacterium violaceum* DSM 30191 e *Cronobacter sakazakii*.

6.4.2 Attività antiquorum sensing

In questo studio, è stato esaminato il sistema quorum sensing del *Chromobacterium violaceum*. Il quorum sensing (QS) in questo tipo di ceppo batterico è ben documentato (McLean *et al.*, 2004) e consiste nel controllo della produzione di pigmenti violacei prodotti in risposta all'autoinduzione di molecole come C6-acil omoserina lattoni e C4-acil omoserina lattoni. È stato impiegato il metodo della diffusione su disco per valutare l'attività anti-QS degli estratti di *H. connatum*. In questo test, l'inibizione della crescita batterica è dimostrata dalla formazione di un chiaro alone intorno al disco, mentre l'inibizione del quorum sensing è visibile in un torbido alone ospitante le cellule batteriche (PIGMENTLESS) di *Chromobacterium violaceum* DSM 30191. Le colture di *C. violaceum* sono state preparate mediante incubazione dei batteri in Nutrient Broth (Oxoid, Milano, Italy) per 16-18 ore a 30°C. Le colture sono state regolate a 0,5 McFarland standard (1×10^8 CFU/mL). Gli estratti di *H. connatum*, preventivamente solubilizzati in DMSO, sono stati aggiunti, a differenti dosi (10 µg, 25 µg, 50 µg, 100 µg) in piastre di agar inoculate con *C. violaceum* (0,1 ml per piastra). Dopo 10 minuti, le piastre inoculate sono state incubate, sotto cappa a flusso laminare, a 30 °C per 24 ore.

6.4.3 Analisi dei dati

I dati sono stati espressi come $media \pm DS$ in tre esperimenti indipendenti.

6.5 Ricerca dei cardenolidi e attività cardiotonica

6.5.1 Saggi farmacognostici

La ricerca dei glicosidi cardioattivi è stata effettuata aggiungendo all'estratto etanologico inizialmente piombo acetato, per precipitare i pigmenti, le proteine ed eventuali alcaloidi, e poi sodio solfato, per eliminare il piombo in eccesso. Successivamente, è stata eseguita l'estrazione della fase acquosa con cloroformio, il test di Liebermann (anidride acetica – acido solforico concentrato) per la ricerca del nucleo steroidico, la reazione di Keller-Kiliani per i desossizuccheri e il saggio di Kedde per il lattone α - β insaturo. La presenza dei cardenolidi è stata confermata con spettroscopia IR.

6.5.2 Animali

Gli esperimenti sono stati condotti su ratti maschi Fischer 344 del peso di circa 200 g. Gli animali sono stati sistemati in numero di tre per gabbia e tenuti in ambiente controllato, a temperatura e umidità costanti, e in condizione invertita di luce/buio a cicli di 12 ore (07:00 luci spente, 19:00 luci accese), con libero accesso al cibo e all'acqua. Prima dell'inizio dei trattamenti, i ratti sono stati abituati alla stessa colonia per almeno una settimana. Le procedure utilizzate in questo studio sono state eseguite in stretto accordo con la legislazione europea (EEC n. 86/609) e sono state approvate dal Comitato Etico dell'Università di Napoli e dal Ministero della Salute.

6.5.3 Preparazione delle sospensioni

Gli estratti sono stati solubilizzati in 2 ml di soluzione fisiologica e somministrati per via i.p. alla dose di 100 mg/kg di peso corporeo. I controlli negativi sono stati trattati con 2 ml di soluzione fisiologica per via i.p.

6.5.4 ECG

I ratti sono stati anestetizzati con 0,15 ml i.p. di zolazepam tiletamina e 0,05 ml i.p. di medetomidina e posti su una piastra riscaldata a 37 °C, collegata con degli elettrodi a un elettrocardiografo. L'esperimento è durato circa 60 minuti durante i quali, a intervalli di 15 minuti, è stata registrata l'attività cardiaca (Figura 31). Circa 35 minuti dopo l'inizio dell'esperimento, i ratti sono stati trattati. A fine esperimento, i ratti sono stati risvegliati con 0,05 ml i.p. di atipamezolo.



Figura 31 – Tracciato elettrocardiografico di un ratto trattato con l'estratto etanologico di *H. connatum*, 35 minuti dopo l'inizio dell'esperimento.

Bibliografia

Abreu IN, Porto ALM, Marsaioli AJ, Mazzafera P **2004**. Distribution of bioactive substances from *Hypericum brasiliense* during plant growth. *Plant Science* **167**:949–954.

Adams RP **2007**. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. 4th ed.; Allured Publishing: Carol Stream, IL, USA.

Avato P **2005**. A survey on the *Hypericum* genus: secondary metabolites and bioactivity. *Studies in Natural Products Chemistry* **30**:603-634.

Avato P, Raffo F, Guglielmi G, Vitali C, Rosato A **2004**. Extracts from St John's Wort and their antimicrobial activity. *Phytotherapy research* **18**(3):230-232.

Azizi M, Fuji Y **2006**. Allelopathic effect of some medicinal plant substances on seed germination of *Amaranthus retroflexus* and *Portulaca oleraceae*. *Acta Horticulturae* **689**:61-68

Benkiki N, Kabouche Z, Tillequin F, Vérité P, Chosson E, Seguin E **2003**. A new polyisoprenylated phloroglucinol derivative from *Hypericum perforatum* (Clusiaceae). *Verlag der Zeitschrift Naturforschung* **58C**:655–658.

Bewley D, Black M **1985**. Seeds: Physiology of Development and Germination. *Plenum Press*, New York (USA), **36**(12) pp 1916-1927.

Brand-Williams W, Cuvelier JJ, Berset C **1995**. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology* **28**:25-30.

Butaye J, Honnay O, Adriaens D, Delescaille LM, Hermy M **2005**. Phytosociology and phytogeography of the calcareous grasslands on Devonian limestone in Southwest Belgium. *Belgian Journal of Botany* **138**:24-38.

Butterweck V **2003**. Mechanism of action of St John's wort in depression: what is known? *CNS Drugs* **17**(8):539-62.

Butterweck V, Wall A, Liefländer-Wulf U, Winterhoff H, Nahrstedt A **1997**. Effects of the total extract and fractions of *Hypericum perforatum* in animal assays for antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry* **30(suppl)**:117-124.

Canning S, Waterman M, Orsi N, Ayres J, Simpson N, Dye L **2010**. The efficacy of *Hypericum perforatum* (St John's wort) for the treatment of premenstrual syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *CNS Drugs* **24**(3):207-25.

Chimenti F, Cottiglia F, Bonsignore L, Casu L, Casu M, Floris C, Secci D, Bolasco A, Chimenti P, Granese A, Befani O, Turini P, Alcaro S, Ortuso F, Trombetta G, Loizzo A, Guarino I **2006**. Quercetine as the active principle of *Hypericum hircinum*

exerts a selective inhibitory activity against MAO-A: extraction, biological analysis, and computational study. *Journal of Natural Products* **69**:945-949.

Conti F, Abbate G, Alessandrini A, Blasi C **2005**. An Annotated Checklist of the Italian Vascular Flora. *Palombi Editori*, p 113.

Couladis M, Baziou P, Verykokidou E, Loukis A **2002**. Antioxidant Acitivity of Polyphenols from *Hypericum triquetrifolium* Turra. *Phytotherapy Research* **16**:769-770.

Couladis M, Baziou P, Petrakis PV, Harvala C **2001**. Essential oil composition of *Hypericum perforatum* L. growing in different locations in Greece. *Flavour and Fragrance Journal* **16**:204-206.

Cowan MM **1999**. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews* **12**(4):564-582.

Dadé MM, Fioravanti DE, Schinella GR, Tournier HA **2009**. Total antioxidant capacity and polyphenol content of 21 aqueous extracts obtained from native plants of Traslasierra valley (Argentina). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* **8**(6):529-539.

Davies NW **1990**. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. *Journal of Chromatography* **503**:1-24.

De Vry J, Maurel S, Schreiber R, de Beun R, Jentsch KR **1999**. Comparison of *hypericum* extracts with imipramine and fluoxetine in animal models of depression and alcoholism. *European Neuropsychopharmacology* **9**(6):461-8.

Diana G, Capasso A, Quaranta E, De Feo V **2007**. Differential effects of three species of *Hypericum* in an open field test. *Phytotherapy Research* **21**:215-219.

do Rego JK, Benkiki N, Chosson E, Kabouche Z, Seguin E, Costentin J **2007**. Antidepressant-like effect of hyperfoliatin, a polyisoprenylated phloroglucinol derivative from *Hypericum perforatum* (Clusiaceae) is associated with an inhibition of neuronal monoamines uptake. *European Journal of Pharmacology* **569**:197-203.

Dürr D, Stieger B, Kullak-Ublick GA, Rentsch KM, Steinert HC, Meier PJ, Fattinger K **2000**. St John's Wort induces intestinal P-glycoprotein/MDR1 and intestinal and hepatic CYP3A4. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **68**(6):598-604.

European Pharmacopoeia **2004**. Council of Europe, Strasbourg Cedex, France, 5th Ed., Volume I, 2.8.12, pp 217-218.

Fenner R, Sortino M, Rates SM, Dall'Agnol R, Ferraz A, Bernardi AP, Albring D, Nör C, von Poser G, Schapoval E, Zacchino S **2005**. Antifungal activity of some Brazilian *Hypericum* species. *Phytomedicine* **12**(3):236-240.

Ferraz A, Faria DH, Benneti MN, da Rocha AB, Schwartzmann G, Henriques A, von Poser GL **2005**. Screening for antiproliferative activity of six southern Brazilian species of *Hypericum*. *Phytomedicine* **12**(1-2):112-115.

Fritz D, Bernardi AP, Haas AS, Ascoli BM, de Loreto Bordignon SA, von Poser G **2007a**. Germination and growth inhibitory effects of *Hypericum myrianthum* and *H. polyanthum* extracts on *Lactuca sativa*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **17**:44-48.

Fritz D, Venturi CR, Cargnin S, Schripsema J, Roehe PM, Montanha JA, von Poser GL **2007b**. Herpes virus inhibitory substances from *Hypericum connatum* Lam., a plant used in southern Brazil to treat oral lesions. *Journal of Ethnopharmacology* **113**(3):517-520.

Fusco MR, Sosa A, Petenatti ME, Juárez A, Del Vitto L, Petenatti EM **2007**. Medicamentos Herbarios en el Centro-oeste Argentino. VII. Caracterización Farmacognóstica y Actividad Cardiotónica de *Hypericum connatum* (Clusiaceae). *Latin American Journal of Pharmacology* **26**(2):209-214.

Gambarana C, Ghiglieri O, Taddei I, Tagliamonte A, De Montis MG **1995**. Imipramine and fluoxetine prevent the stress-induced escape deficits in rats through a distinct mechanism of action. *Behavior Pharmacology* **6**:66-73.

Gastpar M, Singer A, Zeller K **2006**. Comparative efficacy and safety of a once-daily dosage of *Hypericum* extract STW3-VI and citalopram in patients with moderate depression: a double-blind, randomised, multicentre, placebo-controlled study. *Pharmacopsychiatry* **39**(2):66-75.

Gnerre C, von Poser GL, Ferraz A, Viana A, Testa B, Rates SM **2001**. Monoamine oxidase inhibitory activity of some *Hypericum* species native to South Brazil. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **53**(9):1273-1279.

Gruz J, Novák O, Strnad M **2008**. Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC-MS/MS. *Food Chemistry* **111**:789-794.

Härtel H, Markova I **2005**. Phytogeographic importance of sandstone landscapes. *Ferrantia* **44**:103-106.

Jennings W, Shibamoto T **1980**. Qualitative Analysis of Flavour and Fragrance Volatiles by Glass capillary Gas Chromatography. Academic Press: New York, USA.

Juárez J, Barrios De Tomasi E, Virgen M **2002**. Effects of estradiol treatment on voluntary and forced alcohol consumption in male rats. *Pharmacology Biochemistry Behavior* **71**(1-2):259-268.

Lapčík O **2007**. Isoflavonoids in non-leguminous taxa: A rarity or a rule? *Department of Chemistry of Natural Compounds* **68**:2909-2916.

Linnaeus C. **1753**. *Species Plantarum*, Vol. 2, Laurentius Salvius, Stockholm, p. 783.

Maggi F, Cecchini C, Cresci A, Coman MM, Tirillini B, Sagrantini GG, Papa F, Vittori S **2010**. Chemical composition and antimicrobial activity of *Hypericum hircinum* L. subsp. *majus* essential oil. *Chemistry of Natural Compounds* **46**:125-129.

Marandino A, De Martino L, De Feo V, Coppola R, Nazzaro F **2010**. Antimicrobial and Anti Quorum Sensing activities of extracts from *Hypericum connatum*. Abstracts of International Conference on Antimicrobial Research, ICAR 2010, 3-5 novembre 2010, Vallaidolid.

Marandino A, De Martino L, Mancini E, Milella L, De Feo V **2011a**. Chemical Composition and Possible *in vitro* Antigermination Activity of Three *Hypericum* Essential oils, *Natural Product Communications* **6**(11):1735-1738.

Marandino A, De Martino L, Mancini E, Consiglio A, Capuano E, De Feo V, Scheggi S, Gambarana C **2012**. Efficacia di estratti di specie diverse di *Hypericum* nel prevenire la condizione di escape deficit o ripristinare la normale reattività nel ratto. Abstracts del Congresso Interdisciplinare sulle Piante Medicinali, 31 maggio – 2 giugno 2012, Cetraro.

Marandino A, De Martino L, De Feo V, Nazzaro F **2011b**. Antimicrobial activity of different extracts from *Hypericum perforatum* L. Abstracts Alimed 2011, 22 – 25 maggio 2011, Palermo.

Mártonfi P, Brutovská R, Čellárová E, & Repčák M **1996**. Apomixis and hybridity in *Hypericum perforatum*. *Folia Geobotanica & Phytotaxonomica* **31**:389–396.

McLean R, Pierson LS, Fuqua C **2004**. A simple screening protocol for the identification of quorum sensing signal antagonists. *Journal of Microbiological Methods* **58**:351-360.

Meral GE, Karabay NU **2002**. *In vitro* antibacterial activities of three *Hypericum* species from west Anatolia. *Turkish Electronic Journal of Biotechnology special issue*:6-10.

Müller WE, Rolli M, Schäfer C, Hafner U **1997**. Effects of *Hypericum* extract (Li160) in biochemical models of antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry* **30**(suppl2):102-107.

Müller WE, Singer A, Wonnemann M **2001**. Hyperforin-Antidepressant activity by a novel mechanism of action. *Pharmacopsychiatry* **34**(suppl 1):98-102.

Nogueira T, Marcelo-Curto MJ, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Rubiolo P, Bicchi C **2008**. Chemotaxonomy of *Hypericum* genus from Portugal: Geographical distribution and essential oils composition of *Hypericum perforatum*, *Hypericum humifusum*, *Hypericum linarifolium* and *Hypericum pulchrum*. *Biochemical Systematics and Ecology* **36**:40-50.

Nunes JDM, Pinto PS, Bordignon SADL, Rech SB, von Poser GL **2010**. Phenolic compounds in *Hypericum* species from the Trigynobrathys section. *Biochem Syst and Ecol* **38**(2):224–228.

Parkar SG, Stevenson DE, Skinner MA **2008**. The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. *International Journal of Food Microbiology* **124**: 295-298

Pieroni A, Quave CL, Santoro RF **2004**. Folk pharmaceutical knowledge in the territory of the Dolomiti Lucane, inland Southern Italy. *Journal of Ethnopharmacology* **95**(2-3):373-384.

Pignatti S **1982**. *Flora d'Italia*, Edagricole, Bologna, vol. I, p. 343.

Pistelli L, Bertoli A, Zucconelli S, Morelli I, Panizzi L, Menichini F **2000**. Antimicrobial activity of crude extracts and pure compounds of *Hypericum hircinum*. *Fitoterapia* **71**:S138-S140.

Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M **1978**. Behavioural despair in rats; a new model sensitive to antidepressive treatments. *European Journal of Pharmacology* **47**:379-391.

Quave CL, Plano LRW, Bennet BC **2010**. Quorum Sensing Inhibitors of *Staphylococcus aureus* from Italian Medicinal Plants. *Planta Medica* **76**:1-8.

Radulović NS, Đorđević AS, Palić RM **2010**. The intrasectional chemotaxonomic placement of *Hypericum elegans* Stephan ex Willd. Inferred from the essential-oil chemical composition. *Chemistry & Biodiversity* **7**:943-952.

Radusiene J, Judzentiene A, Bernotiene G **2005**. Essential oil composition and variability of *Hypericum perforatum* L. growing in Lithuania. *Biochemical Systematics and Ecology* **33**:113-124.

Randløv C, Mehlsen J, Thomsen CF, Hedman C, von Fircks H, Winther K **2006**. The efficacy of St. John's Wort in patients with minor depressive symptoms or dysthymia a double-blind placebo-controlled study. *Phytomedicine* **13**(4):215–21.

Robson NKB, Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA **1968**. *Hypericum*. Flora Europea, Cambridge University Press **2**:261-269.

Robson NKB **2010a**. Studies in the genus *Hypericum* L. (Hypericaceae) 5(1). Sections 10. Olympia to15/16. Crossophyllum. *Phytotaxa* **4**:5-126.

Bibliografia

Robson NKB **2010b**. Studies in the genus *Hypericum* L. (Hypericaceae) 5(2). Sections 17. Hirtella to 19. Coridium. *Phytotaxa* **4**:127-258.

Rocha L, Marston A, Potterat O, Kaplan MAC, Stoeckli-Evans H, Hostettmann K **1995**. Antibacterial phloroglucinols and flavonoids from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry* **40**:1447–1152.

Sarrel EM, Cohen HA, Kahan E **2003**. Naturopathic treatment for ear pain in children. *Pediatrics* **111**:574-579.

Schmitt AC, Ravazzolo AP, von Poser GL **2001**. Investigation of some *Hypericum* species native to Southern of Brazil for antiviral activity. *Journal of Ethnopharmacology* **77**(2-3):239-45.

Schwob I, Bessiere JM, Masotti V, Viano J **2004**. Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle. *Biochemical Systematics and Ecology* **32**:735-745.

Schwob I, Bessiere JM, Viano J **2002**. Composition of the essential oils of *Hypericum perforatum* L. from southeastern France. *Comptes Rendus Biologies* **325**:781-785.

Scotland RW **2000**. Taxic homology and three-taxon statement analysis. *Systematic Biology* **49**:480-500.

Slusarski SR, Cervi AC, Guimarães OA **2007**. Estudo taxonômico das espécies nativas de *Hypericum* L. (Hypericaceae) no Estado do Paraná, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* **21**(1):163-184.

Sokal RR, Rohlf FJ **1981**. Biometry. *American Journal of Botany* **73**:139-151.

Thiele B, Brink I, Ploch M **1994**. Modulation of cytokine expression by *Hypericum* extract. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology* **7**(suppl 1):S60-2

Woelk H **2000**. Comparison of St John's wort and imipramine for treating depression: randomised controlled trial. *British Medical Journal* **321**:536.

Yazaki K, Okuda T **1994**. *Hypericum erectum* Thunb. (St. John's wort): *in vitro* culture and the production of procyanidins. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* **26**:167-178.

Sitografia

http://www.ucm.es/info/otri/cult_cient/infocientifica/noti_feb_09_01.htm

<http://www.guidaconsumatore.com/erboristeria/iperico.html>

http://www.webalice.it/prati_50/IMNEGRI.PDF

<http://oasiblu.com/old/iperico/hyp14.htm>

Ringraziamenti

Ringrazio il Prof. Vincenzo De Feo per avermi offerto l'opportunità di vivere questa bella e stimolante esperienza, per gli insegnamenti dati che sono stati indispensabili per il conseguimento degli obiettivi prefissati. Grazie, ancora, per avermi concesso la libertà di gestire il mio tempo dedicato all'attività di ricerca. Grazie, infine, per tutte le volte in cui ho ricevuto il suo sostegno morale, come in quest'ultimo periodo.

Ringrazio il gruppo del Prof. Alessandro Tagliamonte della Sezione di Farmacologia del Dipartimento di Neuroscienze dell'Università degli Studi di Siena, in particolare la Prof.ssa Carla Gambarana per la preziosa collaborazione offerta e per l'affetto con cui sono stato accolto nei soggiorni a Siena.

Ringrazio le dr.sse Filomena Nazzaro e Florinda Fratianni dell'Istituto di Scienze dell'Alimentazione del CNR di Avellino.

Ringrazio il gruppo del Prof. Libero Berrino della Sezione di Farmacologia del Dipartimento di Medicina Sperimentale della Seconda Università degli Studi di Napoli.

Ringrazio le dr.sse Laura De Martino e Emilia Mancini per la loro amicizia e per il supporto tecnico e scientifico alla mia attività di ricerca.

Ringrazio i ragazzi e le ragazze del laboratorio 42, in particolar modo Graziana Roscigno, Antonietta Salvati, Hanna Malova.

Ringrazio gli amici: Antonio Bracci, Antonio Fezza, Alessandro Consiglio, Emiddio Capuano, Gianmarco Esposito.

Un grazie particolare a una persona speciale per essere stata un inseparabile compagno in tante occasioni. Grazie Rosario, ti auguro una vita felice e ricca di soddisfazioni.

Ringrazio i miei genitori per la vita che mi hanno donato, per l'amore con cui mi hanno cresciuto, per l'educazione che mi hanno impartito, per il benessere che hanno creato al prezzo di una vita vissuta con enormi sacrifici e troppe rinunce, con il solo scopo di offrire a me e ai miei fratelli una vita migliore della loro. Spero, un giorno, di essere anch'io un esempio per le mie figlie.

Ringrazio mia sorella Carmela e mio fratello Giovanni per condividere da qualche mese un periodo difficile della nostra vita ma che, insieme, stiamo affrontando e superando con determinazione e con grande speranza.

Ringrazio mio cognato Emilio e mia cognata Elvira.

Un grazie dal profondo del cuore alla mie due splendide bambine, Benedetta e Angelica, per la gioia che provo nel sentirmi padre.

Ringrazio, infine, l'amore della mia vita per essere moglie e mamma esemplare, per condividere e incoraggiare le mie scelte, per esserci in ogni momento, per avermi reso felice. Grazie Barbara, amore mio.