



Dottorato di Ricerca in Scienze Farmaceutiche “Facoltà di Farmacia”
Università “Magna Græcia” di Catanzaro



Dottorato di Ricerca in Farmacologia e Biochimica della Morte Cellulare
Università della Calabria

ERBE MEDICHE: dalla ricerca di base alle possibili applicazioni in terapia

Hotel Porto Pargos Parghelia (VV)
8 Luglio 2005



Presidenti onorari

De Pasquale Rita (Messina)
Nisticò Giuseppe (Roma)

Comitato Scientifico

Alcaro Stefano (Catanzaro)
Bagetta Giacinto (Cosenza)
Borgese Domenica (Catanzaro)
Corasaniti Maria Tiziana (Catanzaro)
Di Renzo Gianfranco (Napoli)
Fresta Massimo (Catanzaro)
Genchi Giuseppe (Cosenza)
Mollace Vincenzo (Catanzaro)
Panno Maria Luisa (Cosenza)
Ragusa Salvatore (Catanzaro)
Rotiroti Domenicantonio (Catanzaro)
Statti Giancarlo (Cosenza)

Comitato Organizzatore

Amantea Diana (Cosenza)
Morrone Luigi Antonio (Cosenza)
Navarra Michele (Catanzaro)
Palma Ernesto (Catanzaro)

Segreteria Scientifica

Navarra Michele, Dipartimento di Scienze Farmacobiologiche, Università
"Magna Graecia" di Catanzaro, 88021 Roccelletta di Borgia (CZ); Tel.
0961/3694125, Fax 0961/391490, Email: navarra@unicz.it

Responsabile supporti multimediali

Fico Nicola, Dipartimento Farmaco Biologico, Università della Calabria, 87036
Rende (CS); Tel 0984 493248, Fax 0984 493462, Email: fico@unical.it.

SIPHAR

Società Italiana di Farmacognosia



Facoltà di Farmacia Università degli Studi “Magna Græcia” di Catanzaro



Assessorato Politiche Scolastiche e Sociali della Provincia di Catanzaro



Assessorato alla Cultura del Comune di Girifalco



Ordine dei Farmacisti della Provincia di Catanzaro



Federfarma Catanzaro

PROGRAMMA

Venerdì 8 Luglio 2005

10.00-10.15 Apertura del Convegno

Moderatori: **G. Bagetta & S. Cuzzocrea**

10.15-10.30 S. Alcaro, F. Ortuso & A. Artese

Docking e Virtual Screening su composti naturali: esempi su quercitina e cucurbitacina.

10.30-10.45 F. Pizzimenti, C. Naccari, A. Nostro, A. Pizzimenti & V. Sdrafkakis

Attività del "Peratoner": olio essenziale di bergamotto su Propionibacterium acnes.

10.45-11.00 G. Calapai

Reazioni avverse alle piante medicinali.

11.00-11.15 M. Rizzo, D. Ventrice, M.A. Varone, A. Caridi, R. Sidari & M. Geria

Nuove metodiche estrattive di polifenoli dalla Vitis vinifera.

11.15-11.30 M.L. Panno, F. Giordano, F. Mastroianni, M.G. Palma, S. Aquila & S. Andò

Effetti del Bergaptene nella inibizione della cinetica proliferativa e nella induzione dell'apoptosi in una linea cellulare di tumore mammario umano.

11.15-11.45 Coffee break

Moderatori: **G. Calapai & S. Ragusa**

11.45-12.00 L.A. Morrone, L. Rombolà, D. Amantea & G. Bagetta

Effetti neurobiologici dell'olio essenziale di bergamotto.

12.00-12.15 V. Mollace

Effetti cardiovascolari ed antiossidanti dell'olio essenziale di bergamotto.

12.15-12.30 S. Cuzzocrea

Un estratto di Te Verde riduce il danno polmonare in un modello sperimentale di pleurite indotta da carragenina nel topo.

12.30-12.45 **F. Cimino**, F. Virgili & A. Saija
Attività fotoprotettiva in vitro di cianidina-3-glucoside.

12.45-13.00 M.R. Mondello, **M. Giampà**, G. Contartese, N. Miceli & E.M. Galati
Aspetti morfostrutturali della cicatrizzazione indotta nel ratto da olii essenziali di Citrus Bergamia Risso & Poiteau.

13.00-13.15 **S. Micali**, A. Celia, M.C. Sighinolfi, S. De Stefani & G. Bianchi
Ruolo del Phyllanthus Niruri (Uriston) nella terapia adiuvante alla litotrissia extracorporea per i calcoli renali.

13.15-15.30 Lunch break

Moderatori: **V. Mollace & A. Saija**

15.30-15.45 **D. Trombetta**, G. Bisignano & A. Saija
Meccanismi coinvolti nell'attività antimicrobica di monoterpeni.

15.45-16.00 **D. Paolino**, D. Mardente, M. Iannone, C. Celia & M. Fresta
Utilizzo di Advanced Drug Delivery Systems per la veicolazione di sostanze di origine naturale.

16.00-16.15 L. Di Donna, F. Mazzotti, **R. Salerno** & G. Sindona
Separazione ed identificazione dei composti del succo di bergamotto mediante LC/UV/MS-electrosray.

16.15-16.30 A. Trovato, M.T. Monforte, N. Miceli, M.F. Taviano, V. Sdrafkakis, R. De Pasquale & **M.R. Mondello**
Effetti del succo del frutto di Citrus bergamia Risso & Poiteau sulla ipercolesterolemia sperimentale nel ratto.

16.30-16.55 **G. Statti**, M. Bonesi, F. Conforti, M.R. Loizzo, R. Tundis & F. Menichini
Valutazione tassonomica di endemismi del genere Senecio in funzione della diversità fitochimica.

16.45-17.00 **M. Navarra**, J. Maiuolo, D. Rotiroti & M.T. Corasaniti
Caratterizzazione del profilo farmaco-tossicologico dell'olio essenziale di bergamotto e suo effetto neuroprotettivo in vitro.

17.00 **G. Nisticò**
Chiusura dei lavori.

ABSTRACTS

MAIN LECTURES

(L1-L17)

DOCKING E VIRTUAL SCREENING SU COMPOSTI NATURALI: ESEMPI SU QUERCITINA E CUCURBITACINA

Alcaro S., Ortuso F. and Artese A.

Dipartimento di Scienze Farmacobiologiche, Università degli Studi Magna Græcia di Catanzaro

I composti naturali rappresentano una sorgente pressoché illimitata di strutture chimiche potenzialmente utili per l'interazione con macromolecole responsabili di malattie non ancora sconfitte. La conoscenza della struttura tridimensionale di molte macromolecole costituisce la base per poter condurre screening in silico di composti di origine naturale e per suggerire opportune modificazioni per la semisintesi di nuovi farmaci.

Nella comunicazione si presentano due esempi di composti naturali che sono attualmente oggetto di studio presso il Laboratorio di Chimica Farmaceutica Computazionale del Dipartimento di Scienze Farmacobiologiche di Catanzaro.

Il primo esempio riguarda la quercitina, che possiede molteplici funzioni biologiche ed è particolarmente interessante per la notevole diffusione in alimenti di varia natura. Tra gli effetti farmacologici è stato focalizzato lo studio sulle proprietà di modulazione che tale composto possiede in particolare su enzimi che operano a livello del Sistema Nervoso Centrale. Lo studio di docking, effettuato mediante tecniche computazionali, ha confermato la selettività per una particolare isoforma enzimatica, ha consentito di proporre un meccanismo di interazione e di individuare adeguate modificazioni semisintetiche per l'ottimizzazione del prodotto.

Il secondo esempio deriva dall'applicazione di tecniche di screening virtuale su un target macromolecolare coinvolto in patologie tumorali ematopoietiche. Un fattore di crescita, di cui si dispone del modello cristallografico, è stato analizzato ed usato come target per l'individuazione di composti in grado di perturbarne la dimerizzazione, condizione necessaria per esercitare l'effetto iperproliferativo di alcune linee cellulari tumorali. Lo screening in silico ha individuato nel composto naturale, noto come cucurbitacina, un lead ad attività inibitoria piuttosto potente confermata da prove preliminari in vitro.

ATTIVITÀ DEL "PERATONER": OLIO ESSENZIALE DI BERGAMOTTO SU PROPIONIBACTERIUM ACNES

***Pizzimenti F., *Naccari C., *Nostro A., **Pizzimenti A. and ***Sdrafkakis V.**

**Dipartimento Farmaco-Biologico- Facoltà di Farmacia-Università di Messina*

***Dipartimento di Sanità Pubblica- Facoltà di Veterinaria-Università di Messina*

****Borsista Specchiasol - Verona*

L'olio essenziale di bergamotto ha un vasto impiego nell'industria alimentare e cosmetica.

In precedenti ricerche(F.Pizzimenti et al.)è stata valutata l'attività antimicrobica su batteri gram+ e gram -, su C.albicans e su dermatofiti degli oli essenziali ottenuti dallo scarto di lavorazione del bergamotto (ricicli,pulizia dischi,etc).

In questo lavoro viene valutata l'attività antibatterica del "Peratoner" sottoprodotto della lavorazione del bergamotto su Propionibacterium acnes agente etiologico dell'acne, valutando la MIC e la MBC dell'olio come tale e dei maggiori componenti presenti nella forma racemica e nelle due forme enantiomeriche.

ADVERSE REACTIONS TO HERBAL MEDICINES**Calapai G.**

Department of Clinical and Experimental Medicine and Pharmacology – Section of Pharmacology - University of Messina

Use of herbal remedies is increased in all the developed countries and continues to expand across the world. The most important factor contributing to this success is that exists among consumers the widespread misconception that “natural” means “safe” leading to believe that natural products are harmless. Consequently, the most of people consider the herbal medicines products as natural and consequently free of toxic effects.

At the contrary, numerous case reports have been published on toxicity of herbal remedies thus indicating that adverse reactions caused by herbs need more attention. To complicate the toxicological clinical aspects of adverse reactions to herbs there is the evidence that a part of them can be due not to active principle found in the plants but they are attributable to problems of quality. For example, contamination of products with heavy metals or pathogenic agents and adulteration with undeclared synthetic drugs can be further cause of toxicity. Adverse events may also occur from the mistaken use of wrong species of plants or for interactions with other natural or synthetic medicinal products.

For these reasons the safety of herbal medicines is becoming a major concern to the health system. The World Health Organization (WHO) has recently published the guide-lines on safety monitoring of herbal medicines indicating actions needed to improve the vigilance on adverse reactions to herbal medicines. They include: clear identification of the nature of adverse events; management of the consequent risks; institution of measure to prevent adverse events to herbs; good communication of the risks and benefits of herbal medicines. We believe that a further actions necessary as basic to reach the objectives suggested by WHO is surely to inform physicians and pharmacists on use of principal medicinal plants and on their toxicity including side effects, herb-drug interactions and fundamental contraindications. In other words it is important to create following the principles of pharmacovigilance a cultural basis for vigilance on adverse reactions to medicinal plants.

NUOVE METODICHE ESTRATTIVE DI POLIFENOLI DALLA VITIS VINIFERA**¹Rizzo M., ¹Ventrice D., ¹Varone M.A., ²Caridi A., ²Sidari R. and ²Geria M.***(¹)Dipartimento di Scienze Farmacobiologiche, Università "Magna Græcia" di Catanzaro; (²)Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Forestali e Ambientali, Università degli Studi Mediterranea, Reggio Calabria*

Recenti studi hanno evidenziato che in molti alimenti sono presenti molecole, indicate come chemiopreventivi, il cui meccanismo d'azione è correlato all'attività antiossidante ed alla capacità di scavenging dei radicali liberi [1]. E' stato riportato che molecole polifenoliche interagiscono con le vie di segnale che regolano la morte cellulare programmata [2]. Inoltre i composti fenolici del vino inibiscono l'ossidazione in vitro delle LDL [3], agiscono da inibitori dell'aggregazione piastrinica [4], riducono la fragilità vasale [5] e mostrano proprietà carcinostatiche [6]. Tuttavia, non è ancora chiaro quali siano le componenti del vino rosso responsabili di tali effetti biologici. Pertanto, ruolo cruciale rivestono i metodi analitici di estrazione ed identificazione che consentano una valutazione qualitativa e quantitativa della componente antiossidante del vino: essa dipende dal vitigno, dall'annata, dalle tecniche agronomiche adottate e dai metodi di vinificazione. Le sostanze fenoliche presenti nell'uva e, di conseguenza, nei mosti e nei vini si possono differenziare in: fenoli non flavonoidi, polifenoli flavonoidi e polifenoli tannici. Il ruolo dei lieviti nella evoluzione dei composti fenolici durante i processi di vinificazione e di maturazione ha ricevuto poca attenzione. Sebbene sia dimostrato che il lievito è uno dei fattori che inducono la perdita di parte dei polifenoli nei vini [7], non è ugualmente chiaro se l'adsorbimento degli antociani sulle pareti cellulari sia l'unico meccanismo in gioco. Al fine di valutare l'influenza del lievito usato nella fase fermentativa sul contenuto finale in polifenoli dei vini, diversi ceppi sono stati selezionati in funzione della differente interazione lievito-polifenoli. È stato messo a punto un metodo semplice e veloce per determinare il grado di adsorbimento di polifenoli, in terreni coltivati in piastre Petri. Sono state preparate due diverse matrici, utilizzando bucce e semi di uva nera, insemiante con 173 ceppi diversi di *Saccharomyces*, 18 per piastra. La corrispondenza tra colore della biomassa e contenuto totale in polifenoli, è stata determinata col metodo di Folin-Ciocalteu. Al fine di determinare la qualità e quantità dei composti fenolici adsorbiti, è stato messo a punto un metodo di separazione e analisi cromatografica mediante HPLC, associata a rivelazione ultravioletta. Polifenoli costituiti principalmente da acido gallico quale fenolo non flavonoide, catechina quale flavanolo e rutina quale flavonol-glicoside, sono stati scelti in riferimento delle diverse classi di polifenoli studiati. L'estrazione dalla biomassa è stata effettuata con metanolo e la separazione su colonna Hypersil ODS 5 eluita con acido acetico/metanolo/acqua (5/45/50, v/v). Selettività e sensibilità del metodo sono risultate confacenti alla determinazione di polifenoli adsorbiti sui lieviti.

Bibliografia

- [1] Kapiszewska M. et al.. The protective ability of the Mediterranean plant extracts against the oxidative DNA damage. The role of the radical oxygen species and the polyphenol content. *J Physiol Pharmacol.* 2005 Mar;56 Suppl 1:183-97.
- [2] Romero I. et al. Polyphenols in red wine inhibit the proliferation and induce apoptosis of LNCaP cells. *BJU Int.* 2002 Jun;89(9):950-4.
- [3] van Golde PH. et al. Characteristics of piraltin, a polyphenol concentrate, produced by freeze-drying of red wine. *Life Sci.* 2004 Jan 16;74(9):1159-66.
- [4] Appeldoorn CC. et al. Gallic acid antagonizes P-selectin-mediated platelet-leukocyte interactions: implications for the French paradox. *Circulation.* 2005 Jan 4;111(1):106-12.
- [5] Stoclet JC. et al. Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol.* 2004 Oct 1;500(1-3):299-313.
- [6] Hakimuddin F. et al. Selective cytotoxicity of a red grape wine flavonoid fraction against MCF-7 cells *Breast Cancer Res Treat.* 2004 May;85(1):65-79.
- [7] Caridi A. et al. - Influence of yeast on polyphenol composition of wine. *food technology and biotechnology,* 42(1), 37-40, 2004.

EVIDENCE THAT BERGAPTEN "PER SE" INHIBITS CELL GROWTH AND INDUCES APOPTOSIS IN BREAST CANCER CELLS

°Panno M.L., °Giordano F., *Mastroianni F., °Palma M.G., *Aquila S. and °*Andò S.

Dipartimento di Biologia Cellulare e Dipartimento Farmaco – Biologico, Facoltà di Farmacia, Università della Calabria, Rende, Cosenza

The combination of psoralen with UVA radiation (PUVA photochemotherapy) has been used for many years as therapeutic approach useful in the treatment of skin disease such as psoriasis and some immune disorders. Despite accumulating evidence on the effects of PUVA treatment, scarce information is available concerning the role and molecular mechanisms of psoralen or bergapten (5-MOP) on cancer cells. In this study we have reported for the first time that 5-MOP reduced cell cycle progression and cell survival in MCF-7 breast cancer cells. Bergapten is able to downregulate PI3K/Akt pathway and Bcl-2 phosphorylation. Combined used with UVA (PUVA) treatment, did not give any additional effect. To better understand the molecular mechanism of bergapten we evaluated its action on p53 pathway. Our results showed a significant induction of p53 in terms of mRNA and protein. Worthy, western blot of nuclear and cytosolic extracts demonstrated that bergapten induced a complete nuclear translocation of this key proapoptotic factor. To evidence whether bergapten action on p53 is functional, we also evaluated the expression of p21 that showed a similar pattern. Moreover, our data demonstrated the novel finding that p21 and PCNA under bergapten plus UV induced a very strong PCNA-dependent p21 recruitment. This latter event may explain the observed cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7. In conclusion, our finding showed a new natural therapeutic approach that could be taken into account in setting new pharmacological strategies for breast cancer disease.

NEUROBIOLOGICAL EFFECTS OF BERGAMOT ESSENTIAL OIL**Morrone L.A., Rombolà L., Amantea D. and Bagetta G.***Dept. of Pharmacobiology, University of Calabria, Arcavacata di Rende (CS), Italy*

Experimental data show that components of bergamot (*Citrus Bergamia* Risso) essential oil (BEO) interferes with fundamental cellular mechanisms such as K^+ and Ca^{2+} currents (During et al., 2000; Occhiuto & Circosta, 1997) suggesting that it might affect finely regulated mechanisms such as exocytotic release and reuptake of neurotransmitters. Accordingly, the present work was carried out to characterise the effects of BEO on extracellular levels of amino acids (AAs) using the brain microdialysis technique in the rat. Male Wistar rats (250-300g) were anaesthetised with chloral hydrate (400 mg/kg i.p.) and a concentric microdialysis probe (2 mm) was implanted in the hippocampus (P, 5.2; L, 4.8; V, 8 mm, relative to bregma). After 24 h the probe was perfused with artificial CSF (flow-rate=1 μ l/min) and samples collected at 20 min intervals for 3 h, stored at -80°C and the AAs analysed by HPLC with fluorimetric detection (Richards *et al.*, 2000). The BEO, provided by Bergamot Consortium (Reggio Calabria, Italy), was diluted 10:1 in 90% ethanol and was administered (after the third sample has been collected) systemically (i.p.) or focally into the dorsal hippocampus via the probe (20 μ l; flow-rate 1 μ l/min). Systemic administration of BEO (100 μ l/kg, n=10) showed a trend towards an increase of all of the AAs studied as compared to basal levels defined as the mean of the last 3 samples prior to BEO administration. However, statistical significance ($P < 0.05$, repeated measures ANOVA with post-hoc Dunnett's test) as compared to basal levels was achieved by aspartate (μ M, 0.27 ± 0.06 vs 0.46 ± 0.08) and glycine (μ M, 1.60 ± 0.18 vs 0.82 ± 0.19) only and this concerned the first sample after treatment; per se ethanol (100 μ l/kg i.p.; n=3), 90% in double distilled H_2O , yielded no significant changes ($P > 0.05$) as compared to basal levels of aspartate (0.22 ± 0.09 vs 0.19 ± 0.09), glutamate (4.17 ± 1.72 vs 3.22 ± 1.4), glycine (2.08 ± 0.55 vs 2.07 ± 0.5) and GABA (0.06 ± 0.01). The observed increases in aspartate and glycine are Ca^{2+} -dependent since experiments (n=5) carried out in Ca^{2+} -free CSF yielded no significant changes versus basal levels (μ M, aspartate= 0.28 ± 0.17 ; glycine= 0.97 ± 0.30). When BEO was injected into the hippocampus via the dialysis probe (20 μ l/20 min) significant increase ($P < 0.01$, repeated measures ANOVA with post-hoc Dunnett's test) of aspartate, glycine, taurine as well as of GABA and glutamate was observed (n = 3). Noticeably, the effect of BEO administered intra-hippocampus was completely insensitive to removal of Ca^{2+} from the CSF (n = 4).

In conclusion, our present data suggest that BEO is endowed with properties enhancing discrete amino acid neurotransmission in the hippocampus of rat and that different release mechanisms are involved in this effect.

Bibliografia

During T. *et al.* (2000) *Gen Physiol Biophys* **19**, 345-364.

Occhiuto F. & Circosta C. (1997) *Phytother Res* **11**, 450-453.

Richards D.A. *et al.* (2000) *Neurosci Lett* **293**, 183-186

EFFETTI CARDIOVASCOLARI ED ANTIOSSIDANTI DELLA FRAZIONE NON VOLATILE DELL'OLIO ESSENZIALE DI BERGAMOTTO**Mollace V., Muscoli C. and Ragusa S.***Facoltà di Farmacia, Università of Catanzaro "Magna Graecia", Catanzaro*

Le proprietà curative del bergamotto e dei suoi derivati sono note da tempo e vanno dal settore cosmetologico a quello della disinfezione sino alle più recenti acquisizioni nel settore nutrizionale. Meno noti, viceversa, sono gli effetti sistemici della frazione non volatile dell'olio essenziale di tale agrume, che è ricco di sostanze farmacologicamente attive. In particolare, studi recenti condotti presso i nostri laboratori, hanno documentato come la frazione non volatile dell'olio essenziale di bergamotto, iniettata cronicamente per 15 giorni i.p. nel ratto, produce effetti antiproliferativi sia ex vivo che in vivo sulle cellule muscolari lisce vasali. In particolare, tale estratto del bergamotto produce effetti sulla proliferazione neo-intimale che si verifica dopo angioplastica sperimentale. Tali effetti sono, presumibilmente, da attribuire alla presenza di sostanze antiossidanti nella frazione non volatile dell'olio essenziale del bergamotto dal momento che la proliferazione neointimale correlata con il danno vasale si associa ad un aumento dello staining per la nitrotirosina, un marker dello stress ossidativo vasale. Inoltre, grazie alla presenza nella frazione non volatile di bergamottina, una sostanza provvista di effetti calcio antagonisti, si registra un effetto ipotensivo di lunga durata dopo iniezione e.v. Tale effetto sembra verificarsi anche dopo somministrazione cronica della frazione non volatile nel ratto geneticamente iperteso (ratti SHR).

Infine, è da registrare la forte presenza di folati nel succo del bergamotto. Se si associa tale potenzialità alle recenti acquisizioni del ruolo dei folati nel controllo dell'iper-omocisteinemia, un importante fattore pro-aterogeno, si desume un quadro di effetti cardiovascolari protettivi degli estratti del bergamotto che si esercitano a più livelli.

Pertanto, i derivati del bergamotto rivestono un ruolo importante nel settore dei possibili agenti terapeutici di origine officinale. Per la serie di effetti multi-livello che gli estratti del bergamotto rivestono sul sistema cardiovascolare, ne deriva un potenziale utilizzo per gli anni a venire di sicuro rilievo nel campo dei rimedi non convenzionali per combattere le principali patologie cardiovascolari quali l'ipertensione arteriosa e le vasculopatie.

EFFECTS OF GREEN TEA EXTRACT IN CARRAGEENAN-INDUCED PLEURISY**Cuzzocrea S.**

Institute of Pharmacology, School of pharmacy, University of Messina

Here we investigate the effects of the green tea extract in animal model of acute inflammation, carrageenan-induced pleurisy. We report here that green tea extract (given at 25mg/kg i.p. bolus1h prior to carrageenan). exerts potent anti-inflammatory effects in animal model of acute inflammation in vivo.

Injection of carrageenan (2%) into the pleural cavity of mice elicited an acute inflammatory response characterized by fluid accumulation in the pleural cavity that contained many neutrophils (PMNs), an infiltration of PMNs in lung tissues and increased production of nitrite/nitrate, tumor necrosis factor alpha. All parameters of inflammation were attenuated by green tea extract treatment. Furthermore, carrageenan induced an up-regulation of the adhesion molecule ICAM-1, as well as nitrotyrosine and poly (ADP-ribose) synthetase (PARS) formation, as determined by immunohistochemical analysis of lung tissues. The degree of staining for the ICAM-1, nitrotyrosine, and PARS was reduced by green tea extract.

Our results clearly demonstrate that treatment with green tea extract exerts a protective effect and offers a novel therapeutic approach for the management of lung injury.

IN VITRO PHOTOPROTECTIVE ACTIVITY OF CYANIDIN-3-GLUCOSIDE**Cimino F., * Virgili F. and Saija A.***Dip. Farmaco-Biologico, University of Messina, and *Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione, Rome*

One of the most significant risk factors associated with the development of skin cancer is exposure to ultraviolet radiation from the sun. UVB light activates different pathways that perturb mitochondrial structure and cell functions, leading to skin aging and eventually to skin cancer. Anthocyanins, a group of flavonoids present in many common foods, are under investigation for their chemopreventive activity. The aim of this study was to evaluate the efficacy of cyanidin-3-glucoside (C3G) on modulation of cellular responses to UVB exposure in human keratinocytes (HaCaT) and particularly on both inflammation and apoptosis pathways.

Our results indicate that UVB radiation affects cellular integrity only at the UVB dose above 20 mJ/cm² in HaCaT cells. The translocation of pro-inflammatory transcription factors NF-κB and AP-1 increases 1 hour after UVB exposure while lower levels were detected in C3G-treated cells. To evaluate the entity of inflammation we assessed IL-8 mRNA levels. High mRNA levels of this proinflammatory cytokine are detected upon UVB exposure and significant inhibition is associated with C3G treatment. UVB also activates procaspase-3 cleavage an executioner key in apoptotic signalling pathway. Our results show that C3G inhibits caspase-3 activation with values similar to sham-irradiated controls.

These results indicate that C3G can efficiently modulate the cellular inflammatory response to UVB through its action on NF-κB and AP-1 translocation and also on κB-responsive genes such as proinflammatory interleukine-8. Furthermore, C3G treatment inhibits caspase cascade suggesting an efficacy also in UVB-induced apoptotic process. C3G might affect also neoplastic cell transformation by blocking tumor-promoter AP-1 translocation.

ASPETTI MORFOSTRUTTURALI DELLA CICATRIZZAZIONE INDOTTA NEL RATTO DA OLII ESSENZIALI DI *CITRUS BERGAMIA* RISSO & POITEAU**Mondello M.R., Giampà M., Contartese G., Miceli N. and Galati M.***Dipartimento Farmaco-Biologico-Università di Messina*

Per dare una validazione scientifica all'utilizzazione nella medicina tradizionale delle essenze di varie specie di *Citrus* nel processo di riparazione delle lesioni cutanee, abbiamo studiato nel ratto l'attività cicatrizzante di olii ottenuti dal frutto di *Citrus bergamia* Risso & Poiteau.

Dall'epicarpo del frutto, mediante l'uso di macchine raspatrici, si ottiene l'olio di bergamotto, un'essenza ampiamente utilizzata in profumeria, che contiene, oltre a derivati terpenici, anche gli psoraleni. Questi composti provocano iperpigmentazione e possono facilitare l'insorgenza di tumori cutanei.

Dai residui del processo di estrazione dell'olio si ottiene, mediante distillazione in corrente di vapore, il peratoner, un olio anch'esso costituito da derivati terpenici, di cui il principale componente è il linalolo, e privo di psoraleni. Studi precedenti hanno dimostrato che il peratoner ha attività antibatterica e non manifesta mutagenicità.

Per la sperimentazione è stata utilizzata una crema base contenente il 5% dell'olio di bergamotto o del peratoner. Sul dorso depilato di ratti Wistar maschi è stata provocata una ferita a margini netti, di 1 cm di lunghezza. I ratti, divisi in due gruppi, sono stati trattati con le preparazioni suddette due volte al giorno, per 5 gg. I risultati sono stati confrontati con quelli di un gruppo di ratti trattati con un cicatrizzante commerciale. Un gruppo di ratti trattato con la sola crema base ha fatto da controllo. Campioni di cute, opportunamente processati, sono stati osservati al microscopio ottico e fotografati. La cute degli animali trattati con le preparazioni in esame, al 5° giorno, appare ricostituita. All'osservazione microscopica la cute dei ratti trattati con l'olio di bergamotto presenta riepitelizzazione e il letto della ferita appare denso di infiltrati di tessuto di granulazione, con pochi fibroblasti. Il quadro morfologico è molto simile a quello degli animali trattati con la preparazione commerciale.

La cute dei ratti trattati con il peratoner mostra, oltre alla riorganizzazione epidermica, una riduzione del letto della ferita. In tale sede è possibile osservare pochissimi elementi di granulazione, mentre notevole è il numero di fibroblasti. Dai risultati è evidente che sia l'olio di bergamotto che il peratoner manifestano attività cicatrizzante. Tuttavia la cicatrizzazione indotta dal peratoner è caratterizzata da un rimodellamento tissutale a carico soprattutto del derma. Infatti l'ordinata disposizione dei fasci connettivali potrebbe essere determinata dai numerosi fibroblasti responsabili della secrezione di collagene. Rispetto alla cicatrizzazione ottenuta con l'olio di bergamotto, quella indotta dal peratoner sembra essere più completa. Inoltre il peratoner, non contenendo psoraleni, non causa i danni cutanei fotoindotti.

RUOLO DEL PHYLLANTHUS NIRURI (URISTON) COME TERAPIA ADIUVANTE ALLA LITOTRISSIA EXTRACORPOREA PER I CALCOLI RENALI**Micali S., Celia A., Sighinolfi M.C., De Stefani S. and Bianchi G.***Cattedra di Urologia, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia***Introduzione e Obiettivi**

Il *Phyllanthus niruri* è una pianta utilizzata nella medicina popolare brasiliana per il trattamento della urolitiasi in quanto regola l'escrezione endogena degli inibitori della litogenesi.

Abbiamo valutato l'efficacia del *Phyllanthus niruri* dopo ESWL nella calcolosi renale.

Metodi

118 pazienti affetti da calcolosi renale con sospetta o nota composizione di ossalato di calcio sono stati considerati prospettivamente.

Le dimensioni medie dei calcoli erano di 9.94 mm (4-25 mm). La localizzazione dei calcoli era così divisa: 20/118 in sede caliceale superiore, 17/118 in sede caliceale medio, 41 in sede caliceale inferiore e 40/118 in sede pelvica. Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad un singolo trattamento ESWL (Dornier Lithotripter S), impiegando 3500 colpi ed energia media al 65%. Successivamente in 72/118 pazienti (61%) è stata impostata terapia antidolorifica (Gruppo A), mentre in 46/118 (39%) è stata impostata terapia con Uriston® (2 gr die) e terapia antidolorifica (Gruppo B). Riguardo la dimensione dei calcoli non vi erano significative differenze tra i due gruppi. La stone clearance è stata valutata a 30, 90 e 180 giorni mediante radiografia diretta dell'addome ed ecografia reno-vescicale. È stata considerata condizione di stone-free la completa clearance della calcolosi o la presenza di calcolosi residua di diametro inferiore a 3 mm.

Risultati

La percentuale di stone-free globale (6 mesi) era 80% nel Gruppo A e 97% nel Gruppo B ($p = 0.000$). La percentuale di stone-free nel Gruppo A era del 33,3% e 63,8% a 1 e 3 mesi rispettivamente; la percentuale di stone-free nel Gruppo B era 34,7% e 73,9% allo stesso follow-up ($p = 0.75$; $p = 0.01$). È stato necessario eseguire un re-trattamento nel 38,8% dei casi del Gruppo A e nel 30,4% del Gruppo B ($p = 0.055$).

Tra i pazienti affetti da calcolosi caliceale inferiore è stata registrata una differenza significativa nella percentuale degli stone-free tra il gruppo non trattato (64,28%) rispetto al gruppo trattato (94,1%) ($p = 0.000$).

Conclusioni

La terapia con Uriston® determina un incremento globale della percentuale di stone-free ed una riduzione dei tempi di espulsione dei frammenti dopo ESWL.

Particolare attenzione viene posta alla calcolosi caliceale inferiore, per la quale Uriston® migliora l'efficacia del trattamento ESWL con percentuali di stone-free nettamente superiori ai dati presenti in Letteratura.

MECHANISMS INVOLVED IN THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THREE MONOTERPENES**Trombetta D., Bisignano G. and Saija A.***Dip. Farmaco-Biologico, University of Messina*

We studied the antimicrobial efficacy of three monoterpenes [linalyl acetate, (+)menthol and thymol] against the Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus* and the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. For a better understanding of their mechanism of action, the capability of these three monoterpenes to damage biomembranes was evaluated by monitoring the release, following exposure to the compounds under study, of the water-soluble fluorescent marker carboxyfluorescein from unilamellar vesicles with different lipidic composition (phosphatidylcholine, phosphatidylcholine/phosphatidylserine 9:1; phosphatidyl-choline/stearylamine 9:1; phosphatidylglycerol/cardiolipin 9:1). Furthermore, the interaction of the terpenes tested with dimyristoilphosphatidylcholine multilamellar vesicles as model membranes was monitored by means of differential scanning calorimetry technique. Finally, the results were related also with the relative lipophilicity and water solubility of the compounds examined. Taken together, our findings lead us to speculate that the antimicrobial effect of (+)menthol, thymol and linalyl acetate may result, partially at least, from a perturbation of the lipidic fraction of microorganism plasmatic membrane, resulting in alterations of membrane permeability properties and in leakage of intracellular materials. Besides being related to physicochemical characteristics of the drugs (such as lipophilicity and water solubility), this effect seems to be dependent on lipidic composition and net surface charge of microbic membranes. Furthermore, the drugs might cross the cell membranes, so penetrating into the interior of the cell and interacting with intracellular sites critical for antibacterial activity.

UTILIZZO DI ADVANCED DRUG DELIVERY SYSTEMS PER LA VEICOLAZIONE DI SOSTANZE DI ORIGINE NATURALE**Paolino D., Mardente D., Iannone M., Celia C. and Fresta M.***Department of Pharmacobiological Sciences, University "Magna Græcia" of Catanzaro, and ISN-CNR Catanzaro*

La *Glycyrrhiza glabra* L., pianta le cui proprietà curative sono note da oltre 35 secoli, è un arbusto spontaneo appartenente alla famiglia delle *Leguminosae*, cespuglioso, perenne, a fusto legnoso. Al genere *Glycyrrhiza* appartengono circa quindici specie che crescono in zone con clima preferibilmente marittimo. La pianta della liquirizia è nativa di zone come Iraq, Turchia, Spagna, Grecia e Cina Settentrionale; cresce spontaneamente anche nelle zone litorali dell'Italia Centro Meridionale e insulare. Le specie del genere *Glycyrrhiza* diffuse in Italia sono la *Glycyrrhiza glabra* L. (o *Glycyrrhiza officinalis* nota in Calabria come "cordara" o "fimmina") e la *Glycyrrhiza chinata* ("chiovara" o "masculina"). La prima in particolare è molto pregiata per la qualità e la bontà dell'estratto. Attualmente in Calabria la pianta della liquirizia è endemica nel litorale della piana di Sibari (Rossano, Crosia, Calopezzati, ecc.) e nel litorale ionico catanzarese (Placanica, 1980).

La droga contiene: saponine triterpeniche (3-5%), di cui il principale è la glicirizina (acido glicirizico) che è il diglicuronide dell'acido glicirretico; flavonoidi (1-1,5%), tra cui il liquiritoside e isoliquiroside e le loro genine, glabridina licoricina; steroidi; fra cui β -sitosterolo e stigmaterolo; oligosaccaridi (3-5%) fra cui glucosio e saccarosio; polisaccaridi come amido (20-30 %) e glicerizzani; asparagina (2-4%). (Ignesti et al. 1999)

L'azione antiflogistica della *Glycyrrhiza glabra* è legata al potenziamento indiretto dell'attività dei glicocorticoidi; infatti, *in vitro* l'acido glicirretico inibisce la delta 4,5 β reduttasi, enzima responsabile dell'inattivazione degli steroidi a catena 3-oxo-delta 4. Tale inibizione potrebbe essere competitiva e connessa al legame 11-oxo-delta 12,13 dell'acido glicirretico (Chen et al., 1991). È stato anche evidenziato che l'acido glicirretico inibisce la trasformazione del cortisolo a cortisone da parte della 11 β idrossisteroide deidrogenasi.

Scopo di questa lavoro è stato la preparazione, la caratterizzazione chimico-fisica in funzione di alcuni parametri formulativi mediante analisi dimensionale e potenziale zeta la e valutazione *in vitro* ed *in vivo* di un *carrier* innovativo, gli etosomi, per il trasporto percutaneo del glicirizzato di ammonio, derivato semisintetico dell'acido glicirretico.

Le prove di efficacia svolte *in vivo*, effettuate per valutare se questi sistemi preparati con il glicirizzato di ammonio risultano essere efficaci *in vivo* hanno mostrato che la formulazione etosomiale è in grado di far regredire un eritema chimicamente indotto in un tempo significativamente più rapido rispetto alle soluzioni di riferimento.

Infine il protocollo sperimentale effettuato *in vivo*, per confermare l'eventuale sequestro della pelle del carrier etosomiale ha mostrato che gli etosomi sono in grado mantenere elevate concentrazioni di glicirizzato di ammonio a livello dermico che contrasta in maniera significativa l'insorgenza di eritema indotto chimicamente.

Bibliografia

Ignesti G, Maleci L Medica A Pirisino R Piante medicinali: Botanica-Chimica-Farmacologia Tossicologia, Pitagora Editrice Bologna 1999, 120-121

Placanica A Pece e liquerizia nei Casali cosentini nel Settecento forme d'industria e forze di lavoro, in: Rivista Storica Calabrese», anno 1, numeri 1-2, gennaio-giugno 1980)

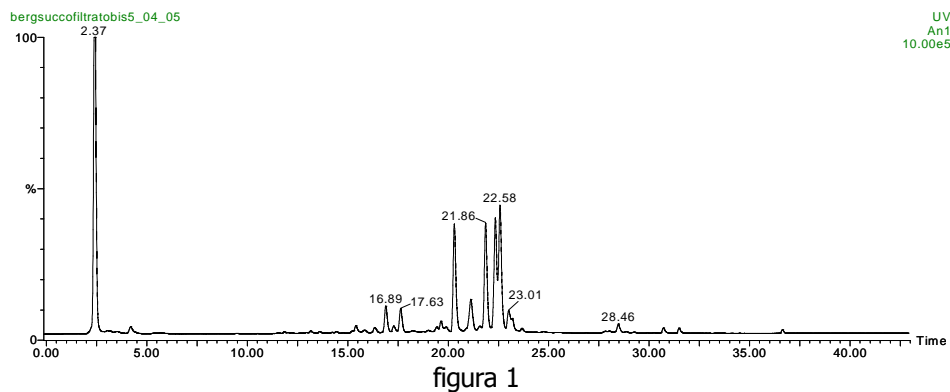
SEPARAZIONE ED IDENTIFICAZIONE DEI COMPONENTI DEL SUCCO DI BERGAMOTTO MEDIANTE LC/UV/MS- ELECTROSPRAY

Di Donna L., Mazzotti F., Salerno R. and Sindona G.

Dipartimento di Chimica, Università della Calabria, Arcavacata di Rende (CS)

Il bergamotto (*Citrus bergamia*), apparso nel sud Italia prima del 1700 è definito come un ibrido tra il *Citrus aurantium* ed il *Citrus limon* L. Attualmente è nota la componente volatile (olio essenziale) per le sue proprietà curative, dovute ai composti presenti nella buccia del frutto stesso, i quali sono stati caratterizzati esclusivamente per gascromatografia. Pochi lavori esistono in letteratura sui componenti non volatili presenti nel succo, sia come proprietà curative che come struttura molecolare. La caratterizzazione di tali specie può essere meglio effettuata, in analogia con altri risultati riportati dal nostro laboratorio¹, applicando metodologie di spettrometria di massa spray. L'LC/UV/MS (ESI). Tale tecnica utilizzata, infatti avvalendosi di una separazione cromatografica prima, e di una successiva doppia analisi (massa ed UV) da informazioni sia sulla massa che sulle caratteristiche di assorbimento di tali specie. Inoltre la possibilità di raccolta dell'eluato permette un'ulteriore analisi MS/MS che, in funzione delle frammentazioni, fa risalire alla reale struttura chimica.

La traccia UV dell'eluato cromatografico (figura 1) non dà tutte le informazioni sui composti presenti nel succo sottoposto ad analisi, in quanto non tutte le specie hanno il massimo di assorbimento alla lunghezza d'onda scelta.



In base alla massa però si è potuto, in prima istanza, evidenziare la presenza di differenti flavonoidi glicosilati e non, i quali, sono di particolare interesse per la loro azione contro i radicali liberi. Essi, infatti, formano facilmente radicali flavonoidici stabili che bloccano la perossidazione lipidica².

Le principali specie rilevate sono: l'esperidina (rt 22,48 min; m/z 611), la naringina (rt 21,86 min; m/z 581) l'apigenina (rt 26,88 min; m/z 271) la eriocitrina (rt 20,30 min; m/z 597) nonché altre specie incognite che sono oggetto di ulteriori studi.

Da analisi MS/MS delle frazioni separate si è evidenziato, per alcuni di essi, un comune pattern di frammentazione (per esempio la presenza costante del picco a m/z 303), da cui si deduce la presenza di flavonoidi glicosidici e conseguente formazione degli agliconi (figura 2)³:

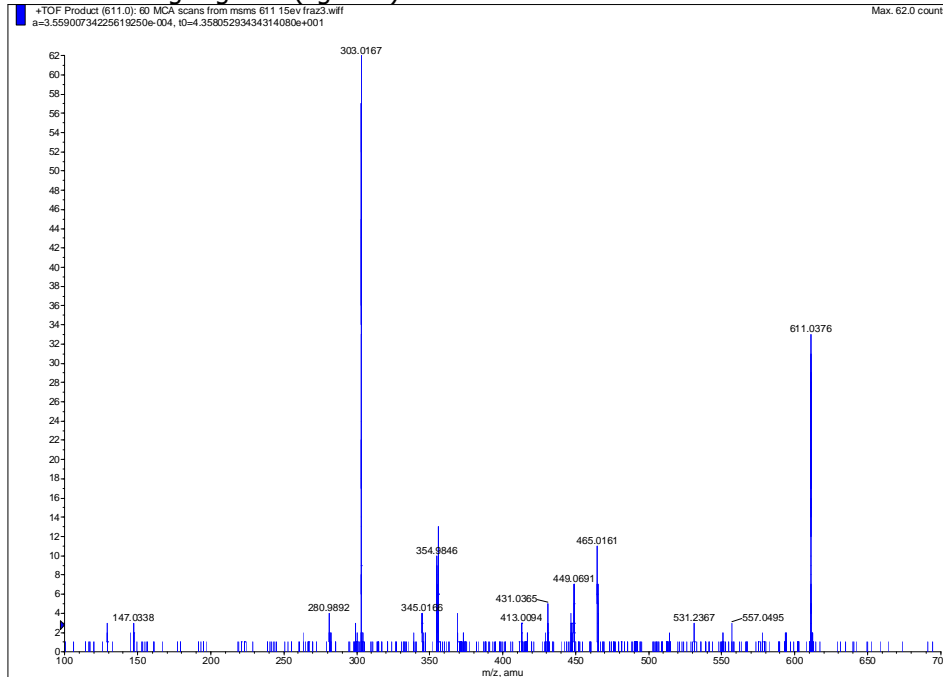


figura 2 (esperidina)

La caratterizzazione per massa conferma i dati ottenuti esclusivamente per HPLC mediante utilizzo di standards esterni e confronto dei tempi di ritenzione e inoltre, dà la possibilità di effettuare ricerche su specie non ancora caratterizzate (rt 17,63 m/z 625; rt 22,58 m/z 755)⁴. Inoltre si possono, vista l'alta sensibilità del metodo, effettuare delle analisi quantitative sui singoli componenti.

Bibliografia

- 1) L. Di Donna, L. Maiuolo, F. Mazzotti, D. De Luca, G. Sindona, *Anal. Chem.* 2004, **76**:5104-5108.
- 2) Cos P, Calomme M, Sindambiwe JB, De Bruyne T, Cimanga K. Cytotoxicity and lipid peroxidation-inhibiting activity of flavonoids. *Planta Med* 2001; **67**:515.
- 3) Claeys M, Cuyckens F. Mass spectrometry in the structural analysis of food flavonoids *J. Mass Spectrom.* 2004; **39**: 1-15.
- 4) Calabrò M.L., Galtieri V., Cutroneo P, Tommasini S., Ficarra R, Ficarra P, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2004; **35**: 349-363.



EFFETTI DEL SUCCO DEL FRUTTO DI *CITRUS BERGAMIA* RISSO & POITEAU NELLA IPERCOLESTEROLEMIA SPERIMENTALE NEL RATTO

Trovato A., Monforte M.T., Miceli N., Taviano M.F., Sdrafkakis V., De Pasquale R. and Mondello M.R.

Dipartimento Farmaco-Biologico, Facoltà di Farmacia, Messina

Il succo dei frutti di molte specie di *Citrus*, utilizzato per scopi alimentari, possiede una spiccata attività ipocolesterolemizzante. Infatti, i dati presenti in bibliografia dimostrano che l'ipercolesterolemia sperimentale nel ratto, viene ridotta dalla somministrazione del succo di differenti specie di *Citrus* (1-3).

Il succo dei frutti di *Citrus bergamia* Risso & Poiteau (bergamotto), appartenente alla famiglia delle Rutaceae, viene da tempo utilizzato nella medicina tradizionale calabrese per ridurre i livelli di colesterolo ematico.

Nella presente ricerca vengono valutati gli effetti di un trattamento cronico con il succo di *C. bergamia* nella ipercolesterolemia da dieta nel ratto (4).

Per la sperimentazione gli animali sono stati suddivisi in quattro gruppi: il I gruppo di animali (controlli normolipidemici) è stato mantenuto a dieta standard per 30 giorni; il II gruppo (controlli iperlipidemici) ha ricevuto la dieta ipercolesterolemica per 30 giorni; gli animali del III gruppo sono stati mantenuti a dieta ipercolesterolemica per 30 giorni e, dal 16° al 30° giorno di dieta, sono stati trattati con il succo di *C. bergamia* (1ml/die, os); ai ratti del IV gruppo è stato somministrato il succo di *C. bergamia* (1ml/die, os) contemporaneamente alla dieta per 30 giorni.

I risultati ottenuti dimostrano che il succo dei frutti di *C. bergamia* ha determinato, oltre al decremento della curva di crescita, l'abbassamento dei livelli ematici di colesterolo, esercitando inoltre una protezione all'insorgenza della ipercolesterolemia.

Bibliografia

- [1] A. Trovato, M.T. Monforte, R. Barbera, A. Rossitto, E.M. Galati, A.M. Forestieri. *Phytomedicine* 2(3), 221-227, 1996.
- [2] E.M. Kurowska, N. Borradaile, M. Meade, J.D. Spence, K.K. Carrol. *Atherosclerosis* 134, 330, 1997.
- [3] M.T. Monforte, A. Trovato, S. Kirjavainen, A.M. Forestieri, R.B. Lo Curto, E.M. Galati. *Il Farmaco* 50, 595-599, 1995.
- [4] J. N. Moss, E. Z. Dajani. *Antihyperlipidemic agents. In: Screening Methods in Pharmacology*. R.A. Turner and Phebborn Eds., Vol. II, Academic Press, London and S. Diego, 136.

VALUTAZIONE TASSONOMICA DI ENDEMISMI DI SENECIO IN FUNZIONE DELLA VARIABILITÀ FITOCHIMICA**Statti G., Bonesi M., Conforti F., Loizzo M.R., Tundis R. and Menichini F.***Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Facoltà di Farmacia, Università della Calabria, Rende, Cosenza*

Il nome *Senecio* deriva dal termine latino *senex*, "vecchio", a causa del pappo grigio apicale dei semi che assomiglia alla testa canuta di un vecchio⁽¹⁾. È uno dei generi più vasti delle Angiosperme potendo annoverare da 2.000 a 3.000 specie diffuse in tutto il mondo; per questo motivo è un genere ancora in gran parte sconosciuto, anche se molto usato in medicina popolare. per l'azione emmenagoga, antinfiammatoria e vasodilatatoria⁽²⁾.

Numerosi sono gli esemplari di *Senecio* utilizzati nella medicina tradizionale di Paesi come l'Africa, l'Argentina, il Cile e la Cina. Il *Senecio latifolus*, per esempio, è comunemente usato in Sud Africa per il trattamento di bruciate e ferite; le sue radici venivano utilizzate come decotto, con proprietà emetiche e per il trattamento delle malattie veneree⁽³⁾.

Sulle affinità, origini e tendenze evolutive dei *seneci* sono state avanzate numerose ipotesi. Apparentemente si tratta di un gruppo polifiletico e neppure le sole specie europee e mediterranee sembrano appartenere a un ceppo unitario.

Il *S. gibbosus* subsp. *cineraria* è un'entità diffusa nel mediterraneo centro-occidentale e naturalizzata su gran parte delle coste atlantiche europee⁽⁴⁾, da questa sottospecie sembra prendere origine un gruppo a cui fanno capo numerose varietà costituite da molti endemismi. Due di queste varietà (e cinque sottospecie) sono state oggetto del presente studio al fine di evidenziare affinità o differenziazioni nella costituzione fitochimica degli estratti e correlare queste con l'appartenenza ad un unico gruppo botanico.

Le varietà esaminate sono state *Senecio ambiguus* subsp. *Ambiguus*, *Senecio ambiguus* subsp. *Nebrodenensis*, *Senecio gibbosus* subsp. *bicolor*, *Senecio gibbosus* subsp. *cineraria*, *Senecio gibbosus* subsp. *gibbosus*.

Le parti aeree delle cinque specie sono state raccolte da botanici dell'Università della Calabria in diverse località dell'Italia centro-meridionale ed in Sicilia nel periodo di maggiore fioritura, giugno-luglio 2003, essiccate e polverizzate sono state sottoposte a macerazione con metanolo per fornire gli estratti totali. Questi sono stati solubilizzati in acqua acidificata con 2.5% H₂SO₄ (pH 1) e quindi frazionati mediante cromatografia liquido-liquido con *n*-esano, diclorometano ed acetato di etile; fornendo i rispettivi estratti. La fase acquosa restante è stata trattata overnight con zinco in polvere per ridurre gli N-ossidi degli alcaloidi, quindi basificata con NH₄OH (pH 10) ed estratta con CHCl₃.

Gli alcaloidi pirrolizidinici ed i terpeni sono i principali costituenti del genere *senecio* e sono i composti presi come markers per la valutazione fitochimica degli estratti. È stata analizzata in particolare la frazione di estratto solubile in

n-esano, costituita principalmente dalla frazione volatile (o comunque poco polare) e dalla frazione solubile in CHCl₃, prevalentemente costituita da alcaloidi (presenti in queste specie). Gli estratti in *n*-esano sono stati analizzati in GC/MS, mentre gli alcaloidi sono stati isolati per mezzo di cromatografie su colonna, dalla frazione di estratto solubile in CHCl₃, e riconosciuti per spettroscopia NMR

L'analisi qualitativa degli estratti, riportata in dendrogramma, ha mostrato come il *senecio cineraria*, in effetti, si pone al centro del gruppo e la variabilità fitochimica non sembra dipendere da variazioni genetiche imputabili a mutazioni o evoluzioni, ma soprattutto a adattamenti della pianta all'habitat vegetativo di crescita spontanea; rispettando, nelle differenze, gli ambienti spesso estremi di crescita in grado di influenzare il metabolismo delle specie.

Bibliografia

1. Jorge D. Pamplona Roger, *Piante che curano-Enciclopedia delle piante*, (1998-1999), 2, 598
2. Pascual Torres et al., secondary metabolites from *Senecio minutus* and *Senecio boissieri* : a new jacaranone derivative, *Fitoterapia*, (2000), 71, 91-93
3. V. Steenkamp et al., The effect of *Senecio latifolius* plant used as a South Africa traditional medicine, on a human Hepatoma cell line, *Journal of Ethnopharmacology*, (2001), 78, 51-58
4. J. Herborg , *Vegetable Chorologie der zentraleuropaischen Flora*, (1992), 3, 500

THE ESSENTIAL OIL OF BERGAMOT EXERTS NEUROPROTECTIVE EFFECTS IN EXCITOTOXICITY IN VITRO**Navarra M., Maiuolo J., Rotiroti D. and Corasaniti M.T.***Department. of Pharmacobiological Sciences, University "Magna Graecia" of Catanzaro*

Bergamot (*Citrus bergamia*, Risso) essential oil (BEO) comprises a volatile fraction containing terpenes and oxygenated derivatives and a non volatile fraction containing psoralens. Using an experimental model of excitotoxicity *in vitro*, we investigated the neuroprotective potential of BEO. For the study, human SH-SY5Y neuroblastoma cells were used and this because it has been previously demonstrated that these cells express both ionotropic and metabotropic glutamate receptors. Cell death caused by the excitotoxin N-methyl-D-aspartate (NMDA) was evaluated by trypan blue assay and accumulation of intracellular reactive oxygen species (ROS) was studied by using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate. Exposure of SH-SY5Y cells to NMDA (1 mM) induces significant cytotoxic effects ($P < 0.001$ vs control) and these are significantly reduced ($P < 0.001$) by competitive (CGP 40116, 100 μ M) and non-competitive (MK801, 200 nM) antagonists of NMDA subtype of glutamate receptors. Protection from NMDA-induced cell death is also afforded by 7-chlorokynurenic acid (10 nM), an antagonist at the glycine modulatory site of the NMDA receptor complex, and by 7-nitroindazole (10 μ M), a neuronal nitric oxide (NO) synthase preferring inhibitor.

Preliminary experiments were carried out to characterize the pharmacotoxicological profile of BEO in SH-SY5Y cultures. For the scope, cells were exposed to a medium containing graded dilutions (1:20,000-1:2,000) of BEO and cell viability was assessed by MTT assay and trypan blue staining 24 hours later. BEO dose-dependently affected cell viability, 1:5,000 (BEO 0.02% in medium) being the first dilution able to induce a statistically significant ($P < 0.001$) increase over control cell death whereas no significant effects on cell viability were observed by using higher dilutions (1:10,000 and 1:20,000) of BEO. Similar results were obtained by using fractions of BEO deprived of monoterpene hydrocarbons (BEO-MHF) and of psoralens (BEO-BF).

Pre-treatment of neuroblastoma cultures with BEO (1:10,000 and 1:20,000 dilutions) significantly ($P < 0.001$) reduced cell death caused by NMDA. Protection from NMDA-induced cell death was also afforded by BEO-BF (1:10,000 and 1:20,000 dilutions) supporting the deduction that psoralens may not be implicated. Quite importantly, BEO-MHF (1:20,000-1:5,000 dilutions) was ineffective ($P > 0.05$ vs cell death induced by NMDA given alone). The latter observation suggests that monoterpene hydrocarbons found in the volatile fraction of BEO are responsible for the neuroprotective effects of BEO. In addition, a statistically ($P < 0.05$) significant reduction of NMDA-induced ROS accumulation was obtained by pre-treating SH-SY5Y cultures with BEO (1:20,000 dilution) thus suggesting that prevention of ROS accumulation may be implicated in the mechanisms of neuroprotection.

INDEX OF AUTHORS

Alcaro S.	L1
Amantea D.	L6
Andò S.	L5
Aquila S.	L5
Artese A.	L1
Bagetta G.	L6
Bianchi G.	L11
Bisognano G.	L12
Bonesi M.	L16
Calapai G.	L3
Caridi A.	L4
Celia A.	L11
Celia C.	L13
Cimino F.	L9
Conforti F.	L16
Contartese G.	L10
Corasaniti M. T.	L17
Cuzzocrea S.	L8
De Pasquale R.	L15
De Stefani S.	L11
Di Donna L.	L14
Fresta M.	L13
Galati E. M.	L10
Geria M.	L4
Giampà M.	L10
Giordano F.	L5
Iannone M.	L13
Loizzo M. R.	L16
Maiuolo J.	L17
Mardente D.	L13

Mastroianni F.	L5
Mazzotti F.	L14
Menichini F.	L16
Micali S.	L11
Miceli N.	L10
Miceli N.	L15
Mollace V.	L7
Mondello M. R.	L10, L15
Monforte M. T.	L15
Morrone L. A.	L6
Naccari C.	L2
Navarra M.	L17
Nostro A.	L2
Ortuso F.	L1
Palma M. G.	L5
Panno M. L.	L5
Paolino D.	L13
Pizzimenti A.	L2
Pizzimenti F.	L2
Rizzo M.	L4
Rombolà L.	L6
Rotiroti D.	L17
Saija A.	L9, L12
Salerno R.	L14
Sdrafkakis V.	L2, L15
Sidari R.	L4
Sighinolfi M. C.	L11
Sindona G.	L14
Statti G.	L16
Traviano M. F.	L15
Trombetta D.	L12
Trovato A.	L15

Tundis R.	L16
Varone M. A.	L4
Vetrice D.	L4
Virgili F.	L9



