



Le caratteristiche di alcuni mieli italiani consentono la preparazione di prodotti con attività antibatterica potenziata



La resistenza batterica agli antibiotici

Secondo uno studio planetario sulla resistenza antimicrobica (Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022), le infezioni causate da batteri resistenti agli antibiotici sono tra le principali cause di morte per persone di tutte le età. Si stima che nel 2019 quasi 5 milioni di persone sono morte a causa di malattie in cui la resistenza batterica ha avuto un ruolo fondamentale. Di questi, 1,27 milioni di decessi sono stati il risultato diretto della resistenza antimicrobica, il che significa che le infezioni resistenti ai farmaci hanno ucciso più persone dell'HIV/AIDS (864.000 decessi) o della malaria (643.000 decessi). La resistenza antimicrobica è un problema globale che richiede molta attenzione da parte della comunità sanitaria da integrare con azioni urgenti da parte dei responsabili politici.

E mentre la resistenza agli antibiotici continua ad aumentare in tutto il mondo, l'attività di ricerca di nuovi antibiotici è in diminuzione per vari motivi tra cui quelli economici. Infatti, è generalmente contenuta la redditività del capitale investito in studi di questo genere mentre sono numerosi gli oneri normativi per le piccole aziende farmaceutiche che lavorano sulla creazione di nuovi antibiotici. Si ricorre molto spesso a cocktail di antibiotici con diversa modalità di azione che comunque non evita l'antibiotico-resistenza. Tuttavia, l'emergere di ceppi di batteri multi-resistenti e la formazione di biofilm batterici difficili da eradicare hanno portato a cercare alternative a questo tipo di cure.

Il miele è stato da sempre impiegato per il trattamento di ferite infette ma, con l'arrivo degli antibiotici, il suo uso terapeutico è stato praticamente abbandonato. Studi recenti sulle sue potenzialità antibatteriche, con conseguente guarigione delle ferite, hanno risvegliato l'interesse per questo prodotto dell'alveare.

Attività dei laboratori GreenSapiens del Dipartimento di Ingegneria Chimica Materiali e Ambiente (DICMA) dell'Università di Roma 'La Sapienza'

Il DICMA è attivo in numerose ricerche che hanno in comune la sostenibilità ambientale. Si citano, ad esempio,

lo studio di processi biotecnologici innovativi e sostenibili per il recupero di composti di interesse nutraceutico da scarti agroindustriali e della filiera ittica, e le ricerche sulle biomasse algali come fonte di energia e pigmenti.

Un ulteriore ambito di ricerca riguarda lo sviluppo di prodotti funzionali per i settori cosmetico, nutraceutico e alimentare con attività antiossidante e/o con proprietà antibatteriche e anti-*quorum sensing*. È importante sottolineare che il *quorum sensing* (QS) è un sistema di comunicazione utilizzato dai batteri basato su segnalazioni da cellula a cellula per determinare le loro attività fisiologiche e coordinare l'espressione genica. Molte funzioni fisiologiche batteriche come virulenza, luminescenza, motilità, sporulazione e formazione di *biofilm* sono regolate dal QS.

Con il termine *biofilm* si indica un aggregato di microrganismi racchiusi in uno strato sottile gelatinoso costituito da proteine, polisaccaridi e materiale genetico. I batteri che vivono in un *biofilm* solitamente hanno proprietà significativamente differenti dai batteri delle stesse specie non confinati, perché l'ambiente protettivo del *biofilm* permette loro di cooperare e interagire in varie maniere. Un beneficio di questo ambiente è l'aumentata resistenza a detergenti e antibiotici da parte dei microrganismi, dato che la densa matrice extracellulare e lo strato esterno delle cellule protegge la parte interna della comunità. In alcuni casi i *biofilm* aumentano fino a mille volte la resistenza agli antibiotici. I *biofilm*, quindi, fungono da barriera alla penetrazione di componenti del sistema immunitario e di

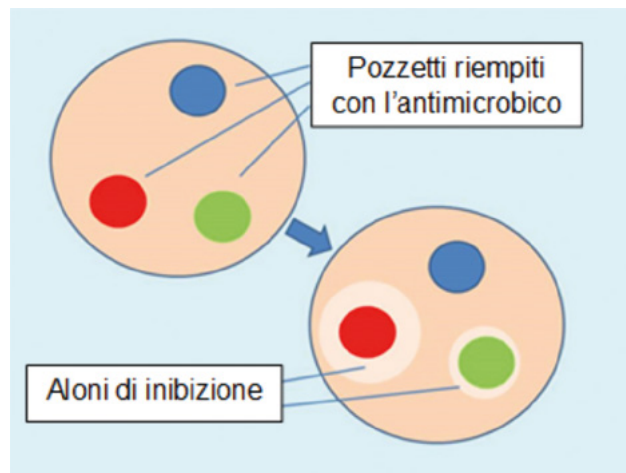


Figura 1. Test per diffusione in agar: i ceppi sensibili all'antimicrobico sono inibiti a una distanza elevata dal pozzetto mentre i ceppi resistenti hanno zone di inibizione più ristrette

antimicrobici rendendo il trattamento antibiotico difficile e potenzialmente senza successo.

Le ricerche condotte presso i laboratori GreenSapiens del DICMA sono finalizzate alla creazione di prodotti naturali a base di miele con proprietà anti-QS e con attività antimicrobica ad ampio spettro. Le tematiche investigate sono portate avanti anche attraverso collaborazioni internazionali, in particolare con l'Université de La Lorraine e con il gruppo di ricerca Italian Latin American Biochemical Group di cui è coordinatore il Prof. Antonio Zuurro.

Per la sua potenzialità merita di essere brevemente illustrato il progetto che punta allo sviluppo di preparati a base di miele con attività antibatterica potenziata. Il tutto parte da uno studio sulle proprietà dei mieli italiani condotto dal gruppo di ricerca dei Proff. Antonio Zuurro e Roberto Lavecchia (www.bit.ly/GreenSapiens) che ha dimostrato che alcuni di essi sono in grado di contrastare efficacemente l'azione di batteri resistenti agli antibiotici.

Lo studio sulle potenzialità dei mieli italiani

Mieli italiani di eucalipto, timo e bosco e due mieli di melata (abete e *Metcalfa*) sono stati testati per la loro attività antibatterica contro patogeni comunemente associati a ferite e ustioni infette. Sono stati considerati i batteri *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* meticillino-resistente (MRSE) e *Enterococcus faecalis* resistente alla vancomicina (VREF), in quanto il trattamento delle infezioni provocate da questi patogeni è complicato dall'emergere di ceppi multi-resistenti e dal fatto che questo tipo di batteri forma *biofilm* che, come accennato, si comportano da barriere per la penetrazione dei farmaci.

Per valutare l'effetto battericida dei mieli sui patogeni esaminati sono stati eseguiti una serie di test.

Test per diffusione in agar. Un pozzetto cilindrico di dimensioni opportune viene ricavato nel terreno di coltura e riempito con il prodotto da testare. L'antimicrobico si diffonde dal disco nel terreno e la crescita del microrganismo in esame è inibita a una distanza dal disco che risulta proporzionale alla suscettibilità di quel microrganismo. I ceppi sensibili all'antimicrobico sono inibiti a una distanza cospicua dal disco mentre i ceppi resistenti hanno zone di inibizione più ristrette. Il diametro dell'alone di inibizione può essere quindi correlato alla sensibilità del batterio all'antimicrobico: maggiore è l'alone, più elevata sarà la

sensibilità del batterio all'antimicrobico; minore è l'alone, maggiore sarà la resistenza del batterio all'antimicrobico (Figura 1).

Determinazione della Concentrazione Minima Inibente (MIC). È una prova per valutare la più bassa concentrazione di antimicrobico in grado di inibire la crescita batterica.

Determinazione della Concentrazione Minima Battericida (MBC). È una prova per valutare la più bassa concentrazione del composto in esame necessaria a provocare la morte di oltre il 99.9% della popolazione microbica.

Determinazione dell'attività anti-*quorum sensing*. L'attività anti-*quorum sensing*, che rappresenta la capacità di un composto di interferire con i meccanismi di comunicazione batterica, può essere valutata attraverso l'inibizione della produzione di violaceina da parte del *Chromobacterium violaceum*.

I risultati più importanti della ricerca

Tutti i mieli testati hanno mostrato attività battericida contro i microrganismi, ma con gradi di efficienza diversi: i mieli di melata sono risultati i più efficaci. I diversi mieli hanno inoltre inibito la produzione di violaceina nel *Chromobacterium violaceum*, dimostrandone così le potenzialità nel contrastare la formazione del *biofilm* controllata dal QR (Figura 2).

Un aspetto da sottolineare è che i mieli testati non solo hanno inibito la crescita batterica, ma ne hanno anche provocato la morte. In particolare, specie di *Staphylococcus* resistenti alla meticillina (MRSA, MRSE A e MRSE B) sono risultate molto sensibili al miele. Si consideri che negli ultimi anni, MRSA e MRSE sono diventati la causa più importante di infezioni acquisite in ospedale e di quelle correlate all'uso dispositivi medici (valvole cardiache, cateteri, protesi, ecc.).

Altro punto da evidenziare è la maggiore sensibilità dei batteri Gram-positivi ai mieli testati. La minore suscettibilità dei batteri Gram-negativi potrebbe essere

Figura 2. I mieli testati a diversa concentrazione sono stati in grado di inibire la produzione di violaceina, dimostrando di possedere un'attività anti-QS (da Fidaleo, Lavecchia e Zuurro, 2015)

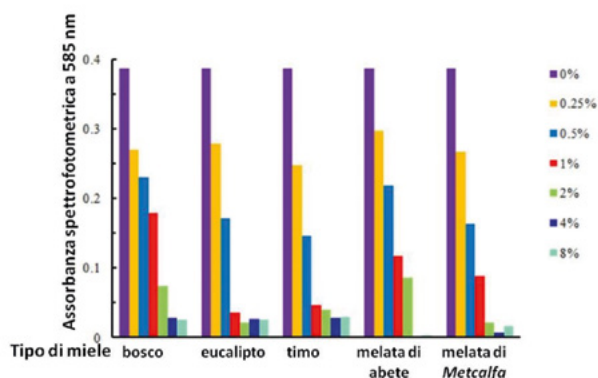


Figura 3. Miscela di mieli nello sviluppo di medicazioni avanzate

dovuta alla presenza, in questi organismi, di una membrana esterna di lipopolisaccaridi in aggiunta allo strato interno contenente peptidoglicani (i componenti principali della parete cellulare dei batteri). Questa doppia struttura sarebbe in grado di ostacolare la penetrazione nella cellula dei componenti bioattivi.

I meccanismi responsabili dell'attività antimicrobica del miele non sono ad oggi pienamente compresi: ad essa sembrerebbero concorrere più proprietà del miele, quali l'elevata osmolarità, il basso pH, la presenza di perossido di idrogeno e/o di composti di altra natura provenienti dai fiori o dalle stesse api. È verosimile ipotizzare che il miele possa esplicare un'attività multifattoriale ed agire su più target batterici.

Il risultato più importante e stimolante dello studio è stata la dimostrazione della capacità dei mieli testati di inibire il QS e, al tempo stesso, di svolgere attività battericida nei confronti di patogeni antibiotico-resistenti. Questa abilità dovrebbe essere alla base dello sviluppo della prossima generazione di antimicrobici perché, come già accennato, il QS regola molti fattori di virulenza, compreso lo sviluppo di *biofilm* che costituisce un ruolo chiave nella resistenza agli antibiotici così come nella patogenesi di infezioni clinicamente rilevanti.

Come fase successiva del progetto, il gruppo di ricerca è impegnato nella formulazione di miscele di mieli in grado di agire con elevata efficacia sia sui Gram-positivi che sui Gram-negativi, oltre che ad interferire con i meccanismi che conducono alla formazione di *biofilm* (Figura 3).

Si sta anche valutando la possibilità di realizzare microcapsule antibatteriche contenenti le miscele di mieli ed eventuali principi attivi in grado di favorire la rigenerazione dei tessuti lesionati sedi dell'infezione batterica (Figura 4) ●.

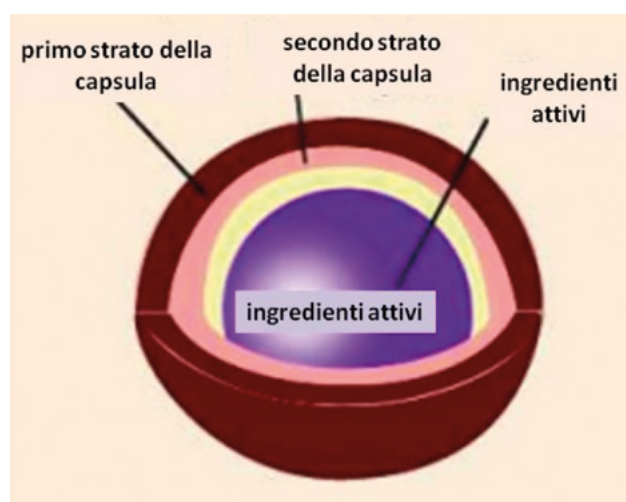
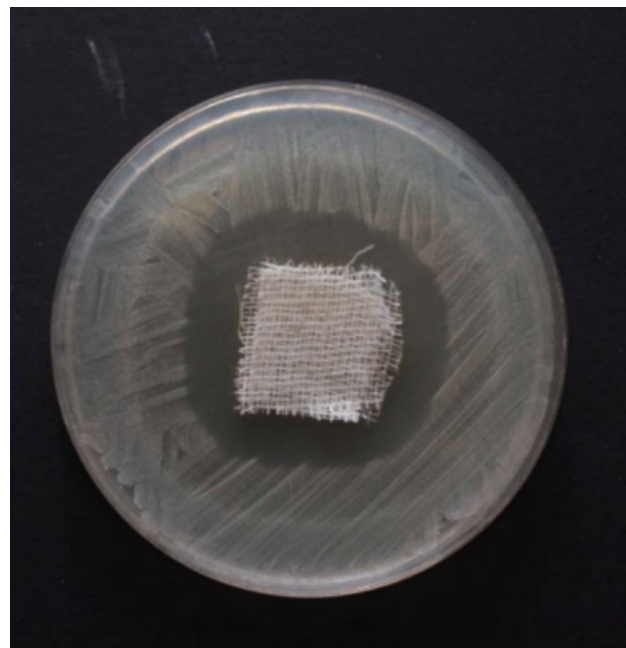


Figura 4. La tecnologia consente l'impiego di miscele di mieli antibatterici microincapsulate per usi nutraceutici o medicinali

FONTI

Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 2022 Jan 18; S0140-6736(21)02724-0. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0. Epub ahead of print. PMID: 35065702.

Fidaleo M., Lavecchia R., Zuurro A., 2015. Antibacterial and Anti-Quorum Sensing Activities of Selected Italian Honeys against Antibiotic-Resistant Pathogens. *Online Journal of Biological Sciences*, 15(4), 236-243. <https://doi.org/10.3844/ojbsci.2015.236.243>

Fidaleo M., Zuurro A., R. Lavecchia, 2011. Antimicrobial Activity of Some Italian honeys against Pathogenic Bacteria. *Chem. Eng. Trans.* 24, 1015-1020