

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO



DIPARTIMENTO DI SCIENZA E TECNOLOGIA

DEL FARMACO

CORSO DI LAUREA IN TECNICHE ERBORISTICHE

PROVA FINALE

STUDIO SULL' ARTEMISIA ANNUA L.:
COLTIVAZIONE E DETERMINAZIONI ANALITICHE

STUDY ON 'ARTEMISIA ANNUAL L.:
CULTIVATION AND ANALYTICAL DETERMINATIONS

Candidato: Alessandro Careglio

Tutor Accademico

Tutor aziendale

Anno accademico 2014/2015

INDICE

1. RIASSUNTO
2. CARATTERI BOTANICI
3. ASPETTI DI FARMACOGNOSIA E FITOFARMACIA
 - 3.1 Composizione
 - 3.2 Proprietà chimico fisiche dell'artemisinina
 - 3.3 Farmacologia e usi tradizionali dell'Artemisia annua
 - 3.4 Via biosintetica dell'artemisinina
4. COLTIVAZIONE E TECNICHE COLTURALI
 - 4.1 Crescita e sviluppo: caratteristiche
 - 4.2 Fotoperiodo
 - 4.3 Condizioni di crescita ottimali
 - 4.4 Propagazione
 - 4.5 Coltivazione
 - 4.5.1 Sesto d'impianto
 - 4.5.2 Concimazione
 - 4.6 Aspetti patologici

4.7 Raccolta e trattamenti post-raccolta

5. PROVE DI COLTIVAZIONE IN PIEMONTE

6. DETERMINAZIONE DEL TITOLO IN ARTEMISININA

6.15 standard

6.2 METODO A

6.1.1 Materiali

6.1.2 Esecuzione del saggio

6.3 METODO B

6.3.1 Materiali

6.3.2 Esecuzione saggio

7. RISULTATI

7.1 Considerazioni sui risultati

2

8. TITOLO IN ARTEMISININA DI ALCUNE SPECIE DEL GENERE ARTEMISIA
E IN SOLUZIONE IDROALCOLICA

9. TIROCINIO

9.1 APPROFONDIMENTO SULL' ESSICCAZIONE

10. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

11. ABSTRACT

12. BIBLIOGRAFIA

13. SITOGRAFIA

14. ABSTRACT

15 PAROLE CHIAVE

16 RINGRAZIAMENTI

17 APPENDICE

1. RIASSUNTO

In questo studio sull'*Artemisia annua* sono considerati gli aspetti agronomici e il titolo in artemisinina (uno dei principali principi attivi della specie).

Nella prima parte del lavoro si illustrano le principali caratteristiche botaniche, la farmacognosia della pianta e la coltivazione.

Nella seconda le determinazioni analitiche vengono eseguite con due diversi metodi: TLC-densitometria e con spettrofotometro, con due tipi di derivatizzazione (con ammoniaca e NaOH), in modo da aumentare l'assorbimento nell'UV, portandolo a 250-300 nm, dove si ha un'assorbanza adeguata.

I metodi sono adatti per un uso utile alla produzione: è infatti indispensabile conoscere il titolo in artemisinina del materiale che si andrà a produrre e, se si punta ad ottenere produzioni con caratteristiche tali da consentirne un'utilizzazione farmaceutica, è necessario adottare metodiche adeguate.

Nell'ultima parte si accenna ad un nuovo modo di utilizzo dell'*Artemisia annua*.

2. CARATTERI BOTANICI



Fig.1

Artemisia annua L. (1753), Asteraceae. Nome comune assenzio annuale, artemisia annuale.

Etimologia: L'etimo di questa pianta è molto controverso, perché esistono più ipotesi: c'è chi sostiene che derivi dal nome della moglie del re Caria Mausolo (300 a.C.), altri lo fanno risalire a Artemide, dea della caccia, ed altri ancora dal greco "Artemes" (sano), in relazione alle sue proprietà medicinali.

Forma biologica: Terofite scapose. Si tratta di piante annuali con asse fiorale allungato, spesso privo di foglie.

Descrizione: pianta erbacea annua alta 50 - 150 (200) cm, variamente glabra, fortemente aromatica e con presenza di cellule filamentose (tricomi).

La radice è fittonante e dotata di filamenti laterali.

Il fusto è eretto, ramoso sin dalla base o talora monocaule, cilindrico, striato e arrossato nella parte mediana e terminale (caratteristica che l'intera pianta assume con l'età).

Le foglie sono più o meno tomentose nella pagina inferiore, verde intenso in quella superiore, che presenta anche punteggiature ghiandolari; 2 - 3 pennatosette con contorno triangolare 3 - 5 (10) x 2 - 4 cm e bordi lievemente revoluti, rachide fogliare strettamente alato, lobi stretti e variamente dentati, picciolo lungo 1 - 2 cm. Le foglie poste nella parte mediana e apicale sono 1 - 2 pinnato partite.

L'infiorescenza è formata da una pannocchia terminale e fogliosa di capolini penduli lunghi 15 - 20 cm e larghi 1,5 - 2,5 mm, dotata di brattee embricate di forma lanceolata, di colore paglierino e con nervatura centrale verde-ialino, non superanti la corolla, con peduncolo molto corto.

I fiori, pentameri, sono ermafroditi e composti da una corolla tubolare attinomorfa di 1,5 mm, di colore giallo paglierino o scuro, simpetala, con margine pentalobato nei fiori ermafroditi interni e bilobato in quelli femminili esterni.

Gli stami sono 5, le antere saldate tra loro, lo stimma profondamente bifido; l'ovario infero, bicarpellare e uniloculare. L'antesi avviene generalmente tra agosto e ottobre.

Il frutto è un achenio ellittico-ovoidale senza pappo. I semi sono numerosi e molto piccoli.

Tipo corologico: Eurasiat. - Eurasiatiche in senso stretto, dall'Europa al Giappone.

Habitat: chiarie di boschi in ambienti umidi, scarpate, rive di fiumi, ruderi, terreni sabbiosi o ghiaiosi da 0 a 500 m s.l.m. È presente in quasi tutta Italia, con l'eccezione di alcune Regioni centrali e meridionali.



Fig. 2: Presenza in Italia dell'Artemisia annua



Fig. 3: foglia di *A. annua*

Fig.4: infiorescenza (pannocchia) di *A. annua*

CLASSIFICAZIONE

Classificazione Cronquist

Dominio Eukaryota

Regno Plantae

Superdivisione Spermatophyta

Divisione Magnoliophyta

Classe Magnoliopsida

Sottoclasse Asteridae

Ordine Asterales

Famiglia Asteraceae

Sottofamiglia Asteroideae

Tribù Anthemideae

Sottotribù Artemisiinae

Genere *Artemisia*

Specie *A. annua*

Nomenclatura binomiale

Artemisia annua

L., 1753

Sinonimi

Artemisia chamomilla

Nomi comuni

Assenzio annuale

(DE) Einjähriger Beifuß

(FR) Armoise anuelle

(EN) Annual Mugwort

L'epiteto della specie è chiaramente riferito alla durata vegetativa.

Come tutte le artemisie, anche questa specie è presente nella medicina popolare, specialmente come antispasmodica, per regolare i disturbi mestruali, come diuretica, emmenagoga, sudoripara, digestiva, carminativa

Il principio attivo (artemisinina) è secreto dai tricomi ghiandolari (peli ghiandolari) presenti nelle foglie infatti. Infatti, le popolazioni di *A. annua* che non presentano tali caratteristiche non producono il principio attivo o ne presentano quantità estremamente modeste.

Alcune immagini di *artemisia annua* con microscopio MOTIC e fotocamera amatoriale (2 M pixel):



Fig. 5: immagini al microscopio di peli ghiandolari prima della fioritura (1000 X) Fig.6: peli

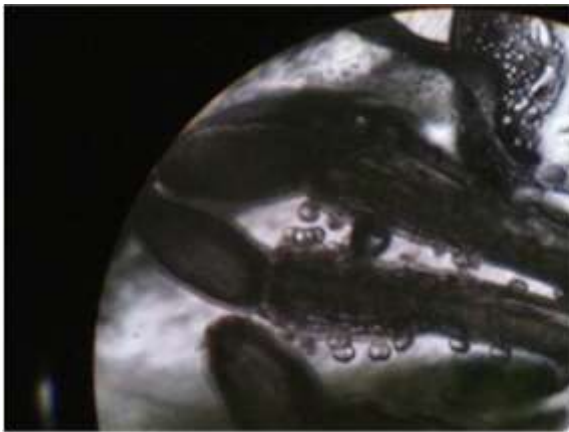


Fig. 7: fiore femminile (tubuloso) con peli ghiandolari sul pistillo (100 X

Fig. 8: fiore maschile con granuli pollinici e peli secretori (100 X)



Fig. 9: pelo secretore (1000X)



Fig. 10: pelo secretore (100 X)



Fig. 11: granuli pollinici (100 X)



Fig. 12 granulo pollinico (tricolporato) (1000 X)

L'artemisia viene utilizzata anche nella produzione di liquori, in modo particolare il "vermuth".

Curiosità: Questa pianta è originaria della Cina, da cui si è poi diffusa in tutto il mondo. Deve il suo interesse principalmente alla guerra nel Vietnam, perché veniva utilizzata dai vietcong nelle zone umide e paludose come antimalarico, mentre gli statunitensi avevano a disposizione il chinino. L'imput al suo studio fu reso possibile dalla richiesta di aiuto fatta da Ho-Chi-Min a Mao Tse Tung, il quale ordinò di approfondire gli studi su questa pianta, da sempre usata nella medicina popolare cinese. Nel 1971 si scoprì il principio attivo responsabile della sua efficacia nel bloccare gli attacchi di malaria (artemisinina), tra lo scetticismo degli studiosi del mondo occidentale. Era in grado di curare persino i ceppi malarici resistenti alle cure con il chinino. Solo nel 1982 i cinesi fecero partecipare il mondo occidentale di tale scoperta (al vertice del Paese c'era allora Deng Xiaoping), con una relazione della ricercatrice You-You Tu, che svelò che il principio attivo, se assunto sotto forma di decotto, perdeva quasi tutta la sua potenzialità, mentre, se si usava il suo succo fresco, questo era in grado di debellare la febbre malarica. Con l'avvento della "politica del Ping-Pong", anche gli occidentali poterono avere accesso a questi studi, rendendo il principio attivo meno tossico e usato insieme a un cocktail di altre medicine, al fine di migliorarne l'assorbimento.

La malaria oggi è una malattia molto frequente in Africa, ove miete migliaia di vittime, specialmente tra i bambini. La povertà delle economie dei paesi interessati a queste epidemie non consente la possibilità di accedere alle moderne terapie, troppo costose. Di conseguenza l'artemisinina risulta di fatto l'unico presidio a basso costo cui possono accedere. Disgraziatamente per loro, questa pianta stenta a vegetare nei paesi a clima caldo-secco, quindi è necessario l'approvvigionamento da altri stati (Paesi nel Nord-Africa, Asia, Europa e Nord America), che la possono produrre e vendere a prezzo calmierato grazie all'intervento dell'OMS.

In Italia questa pianta cresce rigogliosa in tutti gli ambienti umidi, specialmente lungo le rive di fiumi e torrenti o laghi, tanto da diventare invasiva



3. ASPETTI DI FARMACOGNOSIA E FITOFARMACIA

2.6 Composizione chimica

2.6.1 I principali costituenti chimici di *A. annua* si trovano nell'olio essenziale e nella frazione non volatile. I componenti volatili sono lo 0,2-0,25% rispetto al peso della droga essiccata. I composti principali, che rappresentano circa il 70% degli oli essenziali, sembrano essere canfene, β -canfene, chetone isoartemisico, 1-8 cineolo, β -cariofillene e β -pinene. Inoltre, nella frazione volatile altre molecole di minor interesse come artemisia chetone, canfene idrato, e cuminale si trovano

I principi non volatili includono sesquiterpenoidi, flavonoidi e cumarine e enzimi (come β -galattosidasi, β -glucosidasi), steroidi (ad esempio β -sitosterolo e stigmasterolo) .

I principali sesquiterpenoidi sono: artemisinina, artemisinina I, II artemisinina, artemisinina III, IV artemisinina, artemisinina V, acido artemisico, artemisilattone, artemisinolo e acido epoxyarteannuico. (WHO: Artemisia annua 2006)

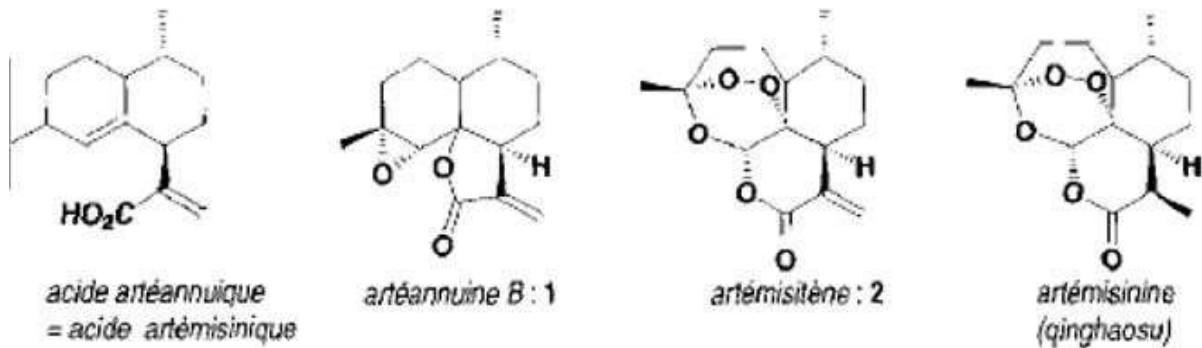


Fig. 14: artemisinina e composti analoghi

L'analisi di campioni di varia origine conferma l'esistenza di due ecotipi: "Cina" (ma presente anche in Europa e nel Nuovo Mondo), a basso contenuto di artemisinina e ricco di acido artemisinico e diidroartemisinico; ecotipo "Vietnam", ricco di artemisinina e acido diidroartemisinico, povero in acido artemisinico, coltivati in Asia (Cina, Vietnam) e in Africa (Tanzania, Kenya), le cui piante vengono raccolte in fioritura precoce ed essiccate al sole. Con tecnica estrattiva adeguata si ottengono 5 kg artemisinina per tonnellata di artemisia essicata (Brunetton IV ed 2009). La sintesi totale di artemisinina è stata effettuata da diversi gruppi di ricerca, ma la sua bassa resa porta a non avere applicazioni industriali. L'emisintesi da acido artemisinico è più vantaggiosa. La ricerca condotta per produrre artemisinina in colture in vitro di tessuti e cellule ha ottenuto importanti risultati, in questi ultimi anni si assiste al rapido sviluppo di progetti finalizzati alla produzione di artemisinina e/o acido artemisinico da microrganismi geneticamente modificati.

3.2 Proprietà chimico fisiche dell'artemisinina

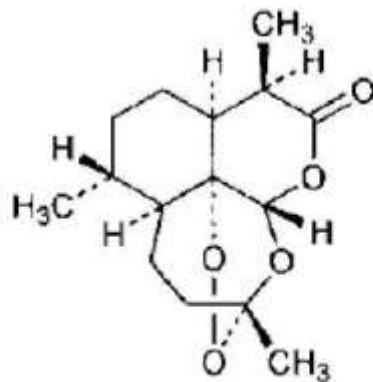


Fig. 15: formula di struttura dell'artemisinina

Nomenclatura IUPAC:

(3R, 5 α S, 6R, 8 α S, 9R, 12S, 12 α R) -Octahydro-3,6,9-trimetil-3,12-epossidica-12H-pirano
[4,3-j] -1,2-benzodioxepin-10 (3H) -one

Massa molecolare relativa: 282.3

Descrizione: aghi incolori o polvere bianca cristallina.

Solubilità: Praticamente insolubile in acqua.

Conservazione: l'artemisinina deve essere conservata in un contenitore ben chiuso, protetto dalla luce e in un luogo fresco.

Temperatura di fusione: 151-154 ° C.

Potere rotatorio specifico: utilizzando una soluzione 10 mg / ml in etanolo assoluto:

$$[\alpha]_D^{20} = +75^\circ \text{ to } +78^\circ$$

Table 1 : Artemisinin content of different organs and structures greenhouse -and field- grown *Artemisia annua*, determined by HPLC-EC (Source: Ferreira *et al.*, 1995)

Artemisinin (% DW x 1000)		
Organ/ structure	Greenhouse	Field
Leaves	3-30	6-60
Main stems	0-3	0.4-7
Side stems	0	0.4-14
Roots	0	0
Flowers	12-42	104-264
Pollen	0	ND
Seed husks	ND	116
Seeds*	36	81

ND : Not determined / * : Containing floral debris

Fig. 16: Concentrazione di artemisinina in foglie, fusti, fiori e radici.

3.3 Fitofarmacia e farmacognosia dell'*Artemisia annua*

Attività farmacologica: *A. annua* ha una lunga storia d'uso medicinale in Cina e in diversi altri paesi.

Attività antimalarica: la farmacopea della Repubblica Popolare Cinese indica l'uso della pianta come antipiretico e contro la malaria.

L'artemisinina, un lattone sesquiterpenico estratto e isolato dalle foglie di *A. annua*, è un farmaco antimalarico, i derivati di artemisinina; l'acido artelinico, artemisina, artemimol diidroartemisinina, diidroartemisinina e artesunato, sono considerati circa cinque volte più potenti artemisinina (anche se sovente col termine artemisinina, si indicano la serie di composti sopra citati).

I composti dell'artemisinina sono efficaci contro *Plasmodium falciparum* e *P. vivax*, compresi i ceppi multiresistenti che vengono eliminati rapidamente nelle fasi asessuate.

L'azione antiparassitaria è rapida; la risposta sintomatica è più veloce rispetto ad altri antimalarici. Il meccanismo d'azione, che è ormai stato elucidato: risulta legato alla struttura perossidica, attivata dal ferro (in analogia con la reazione di decomposizione del perossido di idrogeno di FENTON) e prodotti di decomposizione radicalica, reagenti nocivi contro il parassita le cui proteine sono strutture rapidamente alchilate con alterazione della membrana. In realtà, è stato ipotizzato che la morte del parassita coinvolga radicali specifici e una o più destinazioni, tra cui l'enzima SERCA (Sarco / reticolo endoplasmatico Ca^{2+} + ATPasi) e il PfATPase 6. Inoltre, è noto che si formano con l'artemisinina addotti con emina (ferricoproporfirina) e forma ferrosa (ferrosoproporfirina IX) risultante dalla digestione di emoglobina da parte del parassita: è possibile che l'artemisinina impedisca la polimerizzazione di emina in emozoina, cioè nella sua disintossicazione

Sono stati fatti tentativi per modificare la biodisponibilità e aumentare l'efficienza con derivati emisintetici più attivi e diversa solubilità: artemether e artesunato (vedi Fig. 17)

Tossicità: Il trattamento con artemisinina e i suoi derivati provoca leggeri effetti collaterali (disturbi gastrointestinali, mal di testa, tinnito). Sebbene una certa neurotossicità sia stata rilevata da diversi studi in animali, non sembra che tali casi, ben documentati, siano estendibili all'uomo. Le associazioni con artesunato-meflochina possono causare effetti neuropsichiatrici o aritmie. L'OMS raccomanda di evitare derivati di artemisinina per donne in gravidanza durante il primo trimestre (ad eccezione di pericolo di vita).

La dose totale di artemisinina nell'adulto non deve superare 2,5 g (40mg/kg), che corrisponde a 600 mg (10mg/kg) di artemetere orale, di-idro-artemisinina o artesunato di sodio (parenterale, cioè non somministrato per ingestione). L'artemetere intramuscolo non deve superare i 320 mg (6mg/kg).

La somministrazione parenterale dei derivati dell'artemisinina dovrebbe essere limitata al trattamento delle forme di malaria severa.

Malaria grave: artesunato di sodio in terapia parenterale, prima dose 120 mg (2mg/kg) seguita da due dosi di 1 mg/kg a distanza di 12 ore, poi 1 mg/kg/die fino a quando il paziente non sia in grado di passare alla terapia orale per una dose cumulativa successiva di 10 mg/kg.

Forme non complicate di malaria da *Plasmodium falciparum* multi farmaco-resistente si trattano con un'associazione artesunato-meflochina: artesunato 2mg/kg al primo giorno, artesunato 1mg/kg + meflochina 15mg/kg al secondo giorno, artesunato 1mg/kg + meflochina 10mg/kg al terzo giorno.

Il principale problema legato all'uso di artemisinina e derivati è dato dal fatto che spesso non si ottiene una cura definitiva e, per prevenire le recrudescenze, va eseguito un trattamento associato o supplementare con altri farmaci anti-malarici (meflochina). Sono farmaci generalmente ben tollerati, benché a volte possano provocare episodi di febbre iatrogena. Possono inoltre essere tossici per il feto nel primo trimestre di gravidanza.

L'artemisinina e i suoi derivati stanno riscuotendo molto interesse nel campo della ricerca, in particolare presso l'Università di Washington, per la loro capacità di eliminare selettivamente le cellule tumorali. I ricercatori hanno osservato che l'artemisinina, liberando radicali liberi, colpisce selettivamente le cellule contenenti eccessive quantità di ferro (le cellule tumorali ne contengono molto più della media) portandole all'eliminazione.

È stato inoltre osservato un effetto di inibizione della crescita delle cellule di carcinoma epatocellulare. [7-8]

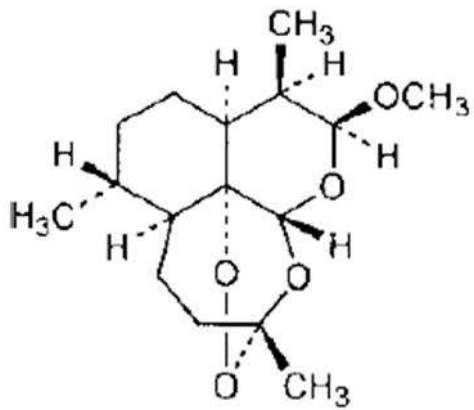


Fig. 17: artemetere

Altre attività e impieghi.

La farmacopea della Repubblica Popolare Cinese elenca le seguenti indicazioni: febbre causata da calore-estivo, febbre del pomeriggio legata alla carenza di yin o in malattie tubercolari; e ittero. Viene descritta anche la sua azione per alleviare la febbri tifiche.

Ha effetti analgesici-antipiretici, antibatterici, e anti-infiammatori.

L'olio essenziale di *A. annua* è stato segnalato per avere effetto repellente su alcuni coleotteri.

L'artemisinina inoltre è un potente inibitore della crescita vegetativa delle piante, potrebbe quindi essere utilizzato come erbicida naturale.

Sono stati riportati effetti sul sistema immunitario, tra cui l'attività immunosoppressiva sia in vivo che in vitro.

I principi attivi della pianta si sono dimostrati inoltre essere inibitori su varie linee di cellule tumorali [8-9-10] e sul virus dell'epatite B (HBV) in vitro (10).

17

3.4 Via biosintetica dell'artemisinina

L'artemisinina è un sesquiterpene (terpene a 15 atomi di carbonio), che viene biosintetizzato a partire da due unità a 5 atomi di carbonio (C5) rispettivamente DMAPP (dimetil-allil-pirofosfato) e IPP (isopentenil-pirofosfato)

L'addizione di un'unità C5 (isopentenil difosfato) al geranyl difosfato, in un prolungamento della reazione dell'enzima prenil transferasi, porta alla formazione del precursore fondamentale dei sesquiterpeni, il farnesil difosfato (FPP) (Figura 18). FPP può, poi, dare origine ad una serie di sesquiterpeni sia lineari che ciclici. Il numero dei possibili modi di ciclizzazione aumenta, in virtù dell'aumentare della lunghezza della catena e della presenza di doppi legami addizionali, il che può portare alla formazione di una vasta gamma di strutture mono-, bi- e tri-cicliche.

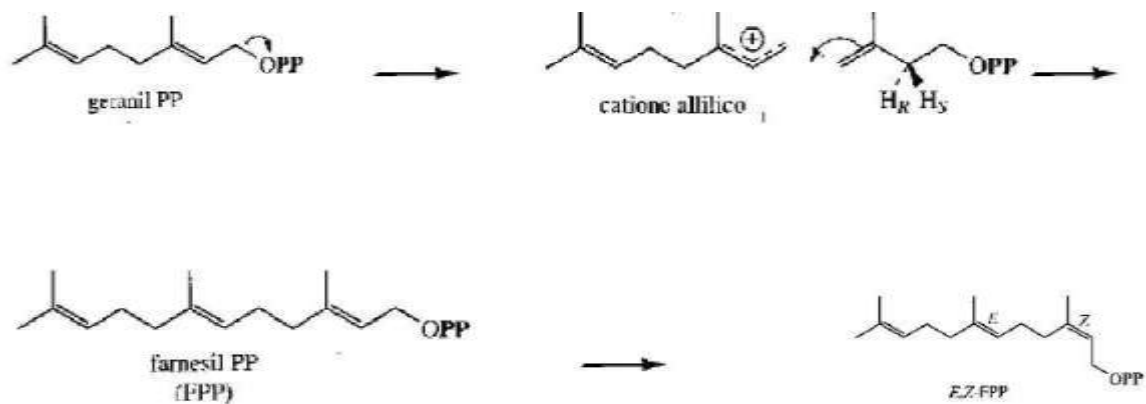


Fig. 18: formazione del farnesil difosfato a partire dal geranil difosfato.

Il doppio legame più vicino al gruppo difosfato può adottare una configurazione E (come in FPP), oppure una configurazione Z, ottenuta in seguito a ionizzazione.

La geometria del doppio legame consente differenti possibilità sia per il ripiegamento della catena carboniosa, ovviamente dettate dall'enzima coinvolto, che per la conseguente ciclizzazione ottenuta per attacco elettrofilo sul doppio legame appropriato.

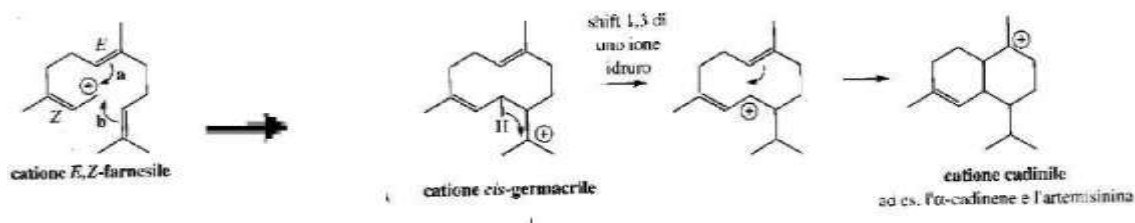


Fig. 19: biosintesi del catione cadinile, dal quale si forma il cadinene precursore dell'artemisinina

Lo scheletro del cadinano è il punto di partenza per ulteriori modificazioni che portano all'artemisinina (Fig. 20). Questa via biosintetica procede con la formazione di acido artemisinico ed arteannuina B, attraverso semplici processi ossidativi. Ulteriori modificazioni richiederebbero una scissione del legame C-C della funzione epossidica e la formazione, in ultimo, di un legame perossidico. Una possibile via biogenetica è indicata in Figura 8.

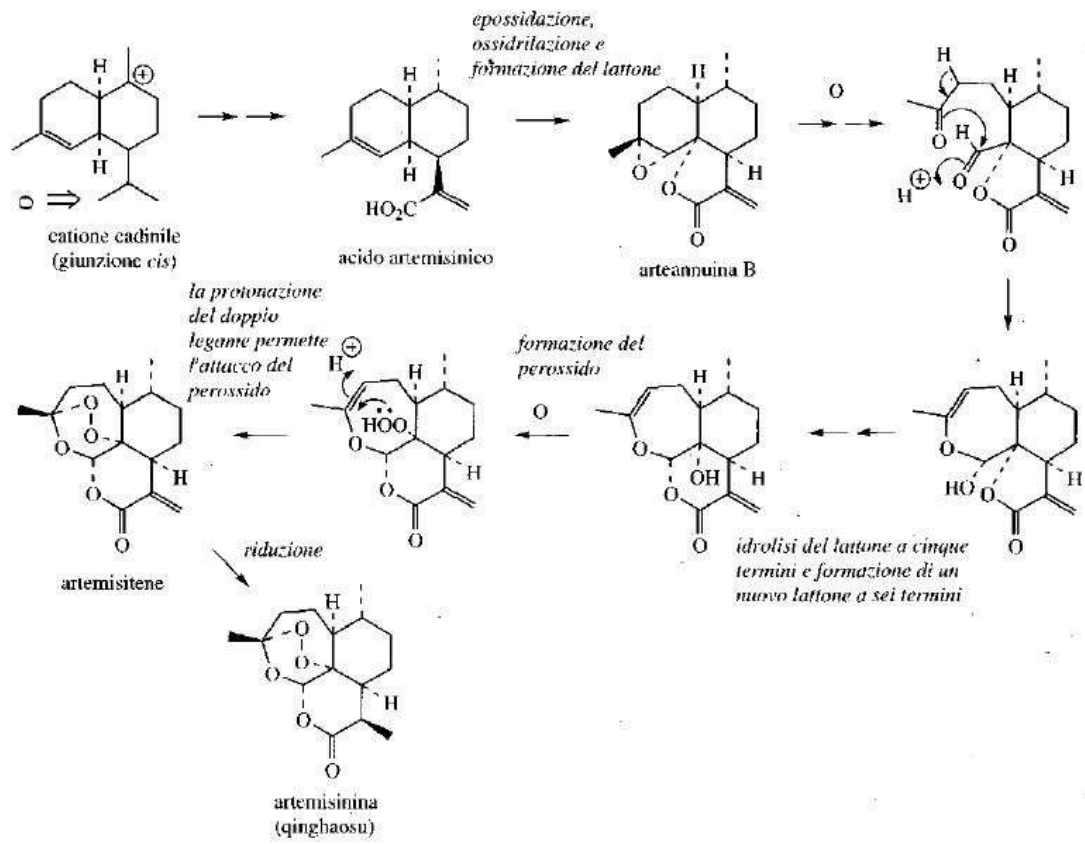


Fig. 20 biosintesi dell'artemisinina a partire dal cadinano.

Riporto di seguito le considerazioni fatte dall' IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori [5]

In sintesi, per informare correttamente i cittadini e i pazienti, al momento attuale possiamo dire che:

- i modelli preclinici ci fanno considerare artemisinina una molecola promettente in patologie selezionate;
- l'emivita di questi farmaci (ovvero la "sopravvivenza" del principio attivo all'interno dell'organismo) è molto breve, al punto che come farmaco antimalarico è necessario somministrarlo in combinazione a un altro trattamento perché sia effettivamente efficace;
- la dose utile come farmaco antineoplastico nei modelli in vitro è molto superiore a quella utilizzata nei preparati antimalarici;
- i diversi preparati di Artemisia Annua hanno diverse emivite e diversi profili di distribuzione e tossicità;
- non sappiamo quale sia la vera percentuale del principio attivo presente nelle differenti formulazioni di Artemisia Annua disponibili online o nelle erboristerie;
- non esistono studi clinici validi che dimostrino l'efficacia e la sicurezza di questi preparati nell'essere umano.

Detto in parole semplici, non conosciamo ancora che tipo di prodotto scegliere, quale dose abbia una risposta antitumorale nell'uomo e con quali effetti collaterali, dunque siamo ancora lontani dal poter affermare con certezza che l'artemisinina e i suoi derivati siano utilizzabili con sicurezza nell'uomo e veramente utili nel trattamento dei tumori.

Queste sono le ragioni per cui nessun medico oncologo e ricercatore può consigliare una dose, un preparato specifico e una schedula di somministrazione dell'Artemisia Annua che possa essere, su solide basi scientifiche, efficace e sicuro. Inoltre, le interazioni con alcuni farmaci biologici o chemioterapici non sono completamente note quindi si sconsiglia vivamente, ai pazienti che fossero in trattamento con terapie standard, l'assunzione di parafarmaci o prodotti erboristici a base di Artemisia Annua senza informare i medici curanti. Esistono invece molte opzioni di cura nell'ambito di sperimentazioni cliniche già in corso presso l'Istituto Nazionale dei Tumori con farmaci promettenti, ma anche in questi casi bisogna essere coscienti che il concetto di sperimentazione, se da una parte rappresenta una speranza, dall'altra implica un'incertezza e non una sicurezza.

La Direzione Scientifica

Considerazioni del candidato: nella nota informativa dell'IRCCS non è considerata l'analisi del rischio tossicologico: per una persona che ha un'aspettativa di vita breve il concetto di sicurezza d'uso cambia totalmente di significato perché è cambiato il contesto in cui si opera. La sicurezza d'uso viene riferita di fatti, per l'Artemisia annua come farmaco antimalarico

Inoltre nella nota viene considerato un solo studio, mentre in letteratura, su diverse banche dati, di studi dell'attività antitumorale in vitro sull' Artemisia annua ne sono stati pubblicati un centinaio.

4. COLTIVAZIONE E TECNICHE COLTURALI

4.1 CRESCITA E SVILUPPO

Il ciclo di crescita di *A. annua* dalla semina all'appassimento si compone di sei fasi, vale a dire crescita, ramificazione, formazione dei boccioli fiorali, fioritura, fruttificazione e appassimento. La lunghezza di ogni periodo di crescita di è funzione del materiale genetico utilizzato, delle tecniche di coltivazione e delle condizioni ambientali. Durante le prime fasi di sviluppo la biomassa aumenta e raggiunge il massimo poco prima dell'antesi. La biomassa diminuisce dal momento della fioritura di fino all'appassimento.

I semi impiegano da 5 a 25 giorni a germinare, in funzione di temperatura e umidità; sono poi necessari 5-20 giorni per la comparsa delle prime 4 foglie, 60-75 per raggiungere il massimo dello sviluppo vegetativo (170 giorni dal trapianto per ottenere il massimo della biomassa. La fioritura avviene mediamente 195 giorni dopo il trapianto, la produzione del seme dopo circa altri 20 giorni, mentre l'appassimento richiede da 260 a 310 giorni dal trapianto se coltivata nelle regioni monsoniche.



Fig. 21: Piantine di *Artemisia annua* seminate in vasetto

4.2 FOTOPERIODO

Ogni fase di crescita e sviluppo è influenzata dal numero di ore di sole.

A. annua raggiunge l'antesi troppo presto se il periodo di illuminazione è eccessivo. Al contrario, una carenza nel numero di ore di illuminazione porterà a un ritardo della fioritura.

A. annua è una pianta con fotoperiodo di circa 13,5 ore.

Poiché con l'inizio della fioritura si ha un'interruzione della crescita vegetativa e la durata del giorno varia tra le diverse aree geografiche in cui la specie è diffusa, è fondamentale garantire un'adeguato fotoperiodo, in modo da ottenere una resa in peso economicamente conveniente.

A tale scopo, prove preliminari relative alla risposta alle specifiche condizioni ambientali del luogo di coltivazione di *A. annua* sono pertanto necessarie prima di iniziare la produzione su larga scala.

21



Fig. 22: *Artemisia annua* coltivata a La Morra

4.3 CONDIZIONI DI CRESCITA OTTIMALI

A. annua presenta una elevata capacità di adattamento, purché, come visto, siano soddisfatte le sue elevate esigenze eliofile. La temperatura per la germinazione dei semi deve essere superiore a 7 ° C. Sulla base delle esperienze condotte in vari paesi (4), la temperatura di crescita ottimale è stata identificata tra 20 e 25° C.

A. annua cresce bene in climi caldi. L'esperienza ha dimostrato che essa richiede una temperatura media annua nel range 13,5-17,5° C, con un limite minimo 10°C. Il numero annuo di ore di sole dovrebbe essere di circa 1000. Le condizioni più adatte per la crescita di *A. annua* si trovano in regioni umide tropicali, caratterizzate da clima monsonico, dove la temperatura

media durante la fase di crescita sia 17,6-28,4° C e la pioggia annuale oscilli tra 1150 e 1350 mm, di cui 600-1000 mm durante la stagione di crescita.

A. annua cresce nella maggior parte dei tipi di suolo, purché il pH sia compreso tra 4,5 e 8,5. Il terreno deve inoltre essere ricco di sostanza organica e caratterizzato da un buon drenaggio.

A. annua è spontanea e cresce bene sui bordi delle foreste, sulle colline ed in prossimità del deserto. L'altitudine alla quale vegeta varia da paese a paese: per esempio, 50-500 m in Vietnam, 600-800 m in Cina e 1000-1500 m in Kenya e Tanzania (8).

22

4.4 PROPAGAZIONE

Il materiale di propagazione deve avere un'origine nota, in modo da confermare che sia adatto per il sito scelto per la coltivazione.

A. annua si propaga per seme e per talea. I semi non hanno fase dormiente e possono essere utilizzati nello stesso anno di produzione o l'anno successivo. Un grammo di semi contiene indicativamente 60.000 semi.

Sebbene la struttura dei fiori renda possibile l'auto-impollinazione, questa è piuttosto rara, anche per la presenza di meccanismi di auto-incompatibilità. Di conseguenza, è difficile conservare le caratteristiche genetiche delle piante migliori mediante propagazione sessuale, tra cui, in particolare, il contenuto di artemisinina. Pertanto è bene che i semi provengano da piante opportunamente selezionate: per chi si produce i semi è opportuno analizzare in essi il contenuto di artemisinina che è proporzionale al contenuto di artemisinina nella pianta al periodo della raccolta.



Fig. 23-24: Semi di *A. annua* (*Actaplantarum*), dimensioni dei semi confrontati con una moneta. [3]

23

4.5 COLTIVAZIONE

Selezione e preparazione del luogo di coltivazione: dovrebbe essere scelto un sito di coltivazione favorevole, preferibilmente su un pendio, esposto a sud. Di primaria importanza il controllo delle infestanti.

Le operazioni preliminari per la preparazione del terreno sono di seguito elencate:

Aratura, eseguita con aratro multi vomere, che è l'operazione mediante cui si rivoltano le zolle, portando i semi delle infestanti in profondità (fino a 30 cm) e non permettendone la germinazione, ed aumentando l'aerazione del terreno in al di sotto della superficie, perché le cellule delle radici hanno bisogno di ossigeno per la respirazione cellulare. Lascia, però il terreno in uno stato fisico inadatto per la semina a causa dell'eccessiva macro zollosità, pertanto richiede l'integrazione con lavori complementari.

Fresatura, che viene eseguita con un apposito utensile che viene collegato al trattore (Fig. 25). Lo sminuzzamento del terreno viene eseguito da zappe collegate ad assi con rotazioni su piani diversi a seconda del modello. Alla fresa viene collegato un rullo che permette una spianatura ed un'adeguata compattazione, in modo da facilitare le operazioni successive di semina o trapianto.



Fig. 25: trattore con fresa e rullo

Semina: i semi possono essere seminati in sementaio, con successivo trapianto, oppure direttamente in campo.

La semina in campo fornisce buoni risultati (Tasmania, Ferreira et al 2005) se il seme viene miscelato prima della semina automatica con perfosfato e terreno calcareo (50/50) considerando le piccole dimensioni del seme. Profondità di semina 5 mm.

Semi preventivamente confettati sono di più facile semina.

24

Viste le dimensioni dei semi è opportuno miscelarli a terriccio e distribuirli in cassette; quando hanno raggiunto 6-8 foglie si può procedere al trapianto in campo. Si deve prestare particolare attenzione all'irrigazione dei sementali, per evitare la possibile insorgenza di fitopatie, in particolar modo dovuto a botriti.

4.5.1 Sesto d'impianto.

La distanza tra le piante e sulla fila è un parametro che viene influenzato da molte variabili:

Tipo di macchinari ed utensili: se si possiede una sarchiatrice per il diserbo meccanico che richiede un'interfila di 50 cm, sarà opportuno trapiantare o seminare con file a distanza di 60 cm.

Composizione del terreno: terreni di composizione diversa portano ad un maggiore o minore sviluppo della pianta.

Sperimentazioni in Italia, eseguite in siti diversi con composizioni differenti del terreno hanno portato a risultati non omogenei per crescita e composizione di artemisinina come riportato da Interlandi et al 2006 (12), la densità di coltivazione è influente rispetto al contenuto di artemisinina riferito alla superficie coltivata come indicato dai grafici di Fig. 26 e 27

Si ipotizza un investimento ottimale di 11 piante/ m² (linee blu del grafico Fig. 26).

Allo stesso risultato sono pervenuti Ferreira et al (2005) (12) con coltivazioni in diverse parti del mondo.

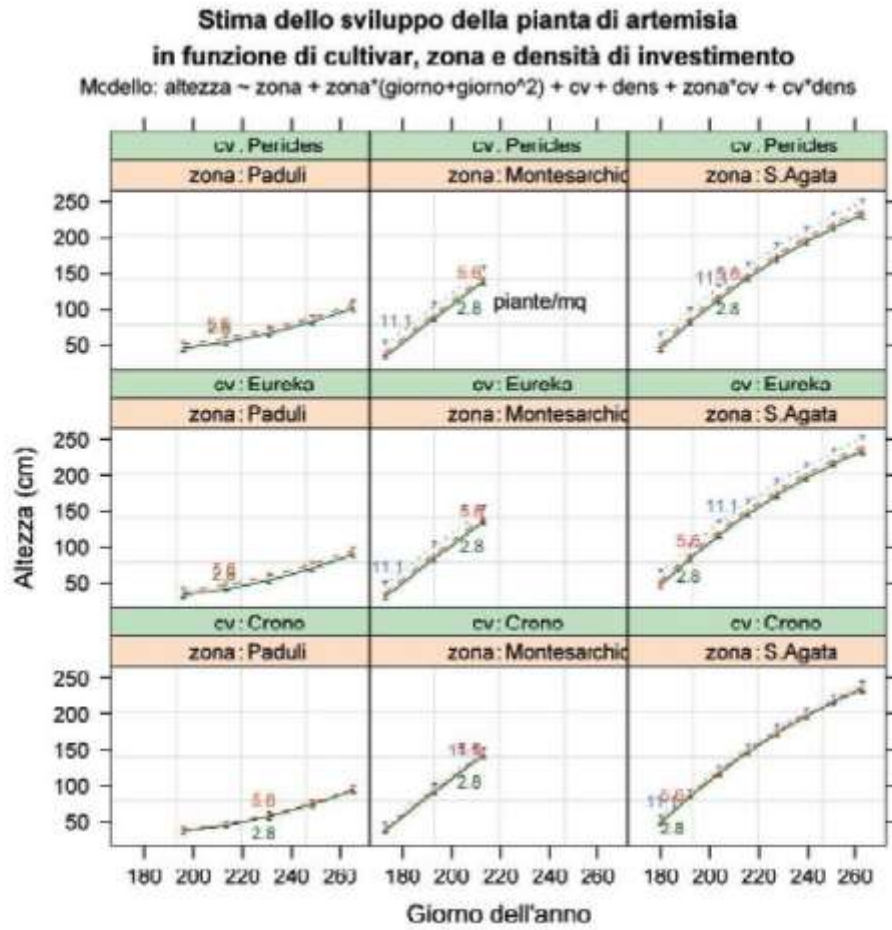


Fig. 26 Altezza di crescita in diversi siti del beneventano.

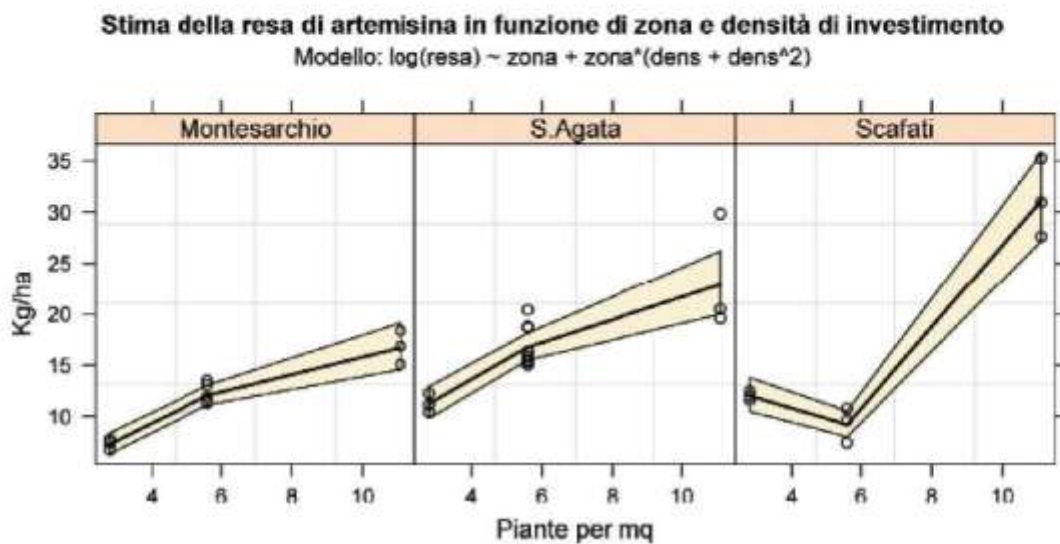


Fig. 27 Resa in artemisinina in funzione della densità di investimento.

4.5.2 Concimazione

Concimi con azoto fosforo e potassio a diverse composizioni sono stati utilizzati in sperimentazioni da Ferreira et al (Rif.12) in più stati e Interlandi et al (Rif.13) in Italia. Azoto (40,5 kg/ha) fornisce una produzione ottimale di artemisinina, meglio se interrato con appositi concinatori che interrano il prodotto sulla fila prima della semina o trapianto.

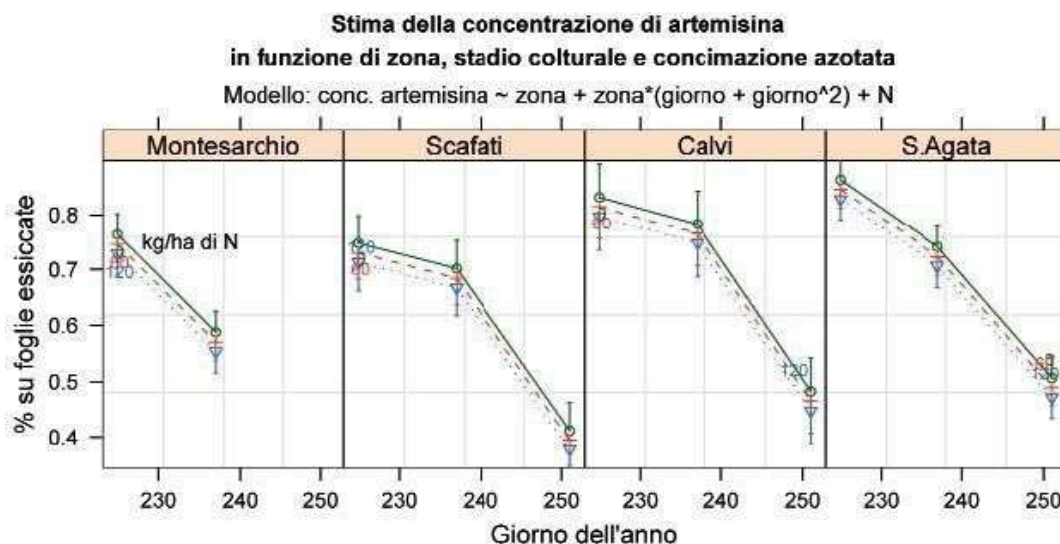


Fig. 28: Stima sulla concentrazione di artemisinina in funzione della concimazione azotata (40/80/120 Kg N/ettaro) e dello stadio colturale e del luogo di produzione.

Per Blanc et al (rif. N° 14) la concimazione ottimale si ottiene con N/P/K di 60/60/50 kg/ha

Gestione del campo: A annua mal tollera condizioni asfittiche dovute a ristagno idrico. Nella stagione delle piogge, canali e solchi di drenaggio dovrebbero essere tenuti regolarmente puliti.

Irrigazione: prima della comparsa della sesta foglia le piantine sono particolarmente suscettibili sia alla siccità carenza che al ristagno idrico. Una volta affermatesi, le piante mostrano invece una maggior adattabilità e resistenza a siccità o ristagni, a causa delle loro abbondanti e dense radici laterali. Tuttavia, la coltura ha relativamente elevate necessità di acqua in fase preliminare di crescita. Come risultato, in questo periodo dovrebbe essere garantito un adeguato approvvigionamento idrico nonché un buon drenaggio.

Durante tutto il processo di crescita e sviluppo è necessario valutare l'umidità del terreno. In caso di lunghi periodi di siccità è possibile ricorrere alla fertirrigazione

Sarchiatura: il diserbo manuale dovrebbe essere il metodo principale di diserbo controllo delle infestanti. L'uso di diserbo chimico non è consentito, secondo la monografia WHO, a meno che non sia espressamente autorizzato.

La prima sarchiatura dovrebbe essere eseguita circa 20 giorni dopo il trapianto; la seconda prima della fase di ramificazione principale, seguita da una rincalzatura.

Ulteriori sarchiature non sono più necessarie quando la coltura ricopre interamente il campo. Quando necessari, pesticidi approvati dovrebbero essere applicati al livello efficace minimo, in conformità con le modalità di distribuzione previste.

4.6 ASPETTI PATOLOGICI

Marciume radicale e malattie da virus sono le principali patologie che possono colpire le coltivazioni di *A. annua* (in Cina)

Seguono alcuni esempi di malattie e parassiti, con indicazione sui metodi per la prevenzione e il controllo

Marciume radicale. Appassimento di tutto l'impianto: la radice diventa nera e marcisce. In caso di attacco occorre rimuovere le piante malate e applicare un trattamento con fungicida autorizzato in prossimità della radice.

Malattie virali. Le nuove foglie appaiono rugose e non arrivano a crescita completa; La cura consiste nell'asportare le zone colpite (la vegetazione in crescita è meno suscettibile all'attacco virale)

Afidi. Gli afidi vivono in gruppi sulle foglie giovani e sulla pagina inferiore delle foglie. In caso di attacchi pesanti, si consiglia di applicare specifici aficidi.

4.7 RACCOLTA E TRATTAMENTI POST-RACCOLTA

Il periodo ottimale di raccolta viene stabilito in funzione del contenuto di artemisinina. L'alto contenuto di artemisinina che può essere raggiunto è fino a 1-2% in peso di parti aeree di *A. annua*. Sebbene il contenuto di artemisinina sia influenzato da numerosi fattori come la localizzazione geografica, il periodo di raccolta, la temperatura e la concimazione, è di fondamentale importanza, per garantire un contenuto ottimale di artemisinina, rispettare il periodo balsamico

Gli studi fatti in paesi in cui si produce *A. annua* hanno dimostrato che il miglior periodo di raccolta è la fase iniziale di antesi.

La raccolta meccanizzata è resa difficoltosa dalle dimensioni della pianta (fino a 220 cm), rendendo difficile il caricamento con carri auto caricanti trainati da trattore, mentre lo sfalcio sarebbe opportuno con un ricondizionatore che riduca la pianta in parti.

La resa di *A. annua* sul secco in contenuto di artemisinina risultano ridotti se la raccolta è anticipata oppure ritardata. Il contenuto di artemisinina di *A. annua* dovrebbe essere pertanto testato prima della raccolta.

Si consiglia di effettuare la raccolta in una giornata soleggiata, dopo aver rimosso le erbe infestanti. Le modalità di essiccazione possono influire sul rendimento di artemisinina. Confronti tra essiccamento al sole, all'ombra ed in essiccatoio a 60° C hanno dimostrato che l'essiccazione al sole è il metodo migliore, naturalmente proteggendo il materiale dalla pioggia

Raggiunto il valore di umidità adeguato è possibile procedere alla separazione dei gambi dalle foglie.

La macinazione per ottenere i tagli richiesti dall'acquirente deve essere fatta rispettando le norme igieniche, ed il materiale trasformato stoccato in opportuni locali, con adeguata temperatura e umidità per evitare gli attacchi da parte di funghi produttori di micotossine o insetti infestanti.

5. PROVE DI COLTIVAZIONE IN PIEMONTE

Le condizioni climatiche del Piemonte sono notevolmente diverse da quelle del sud della Cina e del Vietnam dove l'A annua è di uso tradizionale.

Le prove di coltivazione hanno previsto la semina di 500 semi in semenzaio (in serra) ad aprile 2015. La germinazione è risultata stentata a causa della temperatura non sufficientemente elevata. Il costo dei 500 semi è stato 20 Euro. (semi di Mediaplant migliorati geneticamente con alto contenuto in artemisinina costano 125 euro/grammo con ordine minimo 3 grammi e 18000/20000 semi/grammo e germinazione minima 90%, costo che mi è stato impossibile sostenere.)



Fig. 29: Piantine di Artemisia annua in semenzaio

Raggiunti i 10 cm di altezza (metà maggio), è stato effettuato il trapianto dai semenzali in una zona esposta a sud (Comune di La Morra, CN, frazione S. Maria, 250 metri s.l.m.), in un terreno relativamente povero, ma previa concimazione organica. Si è verificata una buona crescita, grazie al periodo prolungato di caldo, molto superiore alle normali condizioni climatiche del Piemonte.



Fig. 30,31,32,33 Immagini di Artemisia annua (luglio 2015)

Dalle 30 piante ottenute sono state ricavate 100 talee (per aumentare e velocizzare la produzione), utilizzando come radicante Germon per talee erbacee (prodotto con principio attivo

derivati dell'acido naftilacetico), sotto copertura di telo ombreggiato(50% irraggiamento) e usando come substrato sabbia, segatura e terriccio per talee a stati in vasetti da 13 cm di diametro e con uno strato di acqua di 3-5 cm alla base addizionato di anti botritico e rame ossicloruro, indispensabile per l'attecchimento, considerando che i vasi linfatici sono totalmente esposti alla colonizzazione fungina e batterica. Ho utilizzato una combinazione di anti botritico di sintesi(Switch) e rame ossicloruro perché quest'ultimo inibisce la proliferazione batterica a basse concentrazioni, mentre inibisce i funghi patogeni ad alte concentrazioni, inibendo però la radicazione. Dopo 1 mese è avvenuta la radicazione e si è quindi potuto procedere al trapianto presso l'azienda agricola di Piero Ferrero (Pancalieri, TO). A metà agosto le piante hanno raggiunto un peso fresco di 400 g, ma non hanno raggiunto la fioritura.

Sono state prodotte 100 talee a inizio agosto osservando un'antesi immediatamente dopo la radicazione, che non si è verificata nelle piante da cui sono state ottenute le talee, nonostante avessero la stessa età biologica. Il telo ombreggiante che inibisce l'irraggiamento del 50% va ad attivare alcuni fotocettori situati agli apici, come indicato da Ferreira et al, andando a modificare l'antesi. Lo stesso fenomeno si è verificato nel lavoro di Ferreira et al (2005) in una serra nell'Indiana in serra modificando il tempo di illuminazione giornaliero mediante oscurazione a 8, 10, 12 h si è notato un fotoperiodo ottimale di 13,5 h per l'antesi.



Fig. 34,35: Talee di Artemisia annua (luglio 2015)

6. DETERMINAZIONE DEL TITOLO DELL'ARTEMISININA

L'artemisinina assorbe la luce UV nella regione tra 190 e 210 nm, il suo coefficiente di estinzione è basso.

Le analisi dell'artemisinina da fonti naturali non sono facili a causa del ridotto contenuto nelle piante. Inoltre, la molecola presenta un'assorbanza minima e altri costituenti della pianta possono interferire con il rilevamento. D'altra parte, l'assenza di un cromoforo specifico nella molecola rende il rilevamento complesso.

Si rende pertanto necessaria una derivatizzazione per convertire l'artemisinina in composti che ne aumentino la lunghezza d'onda di assorbimento massimo. A tal fine è possibile adottare due metodi.

Metodo A: formazione della 10-axadeoxyartemisina λ max a 320 nm secondo Thongchai Koobkokruad et al (2006), (291 nm riscontrato dalle analisi, vedere Fig. 38 per reazione dell'artemisinina con vapori di ammoniacca (direttamente su lastrina TLC)

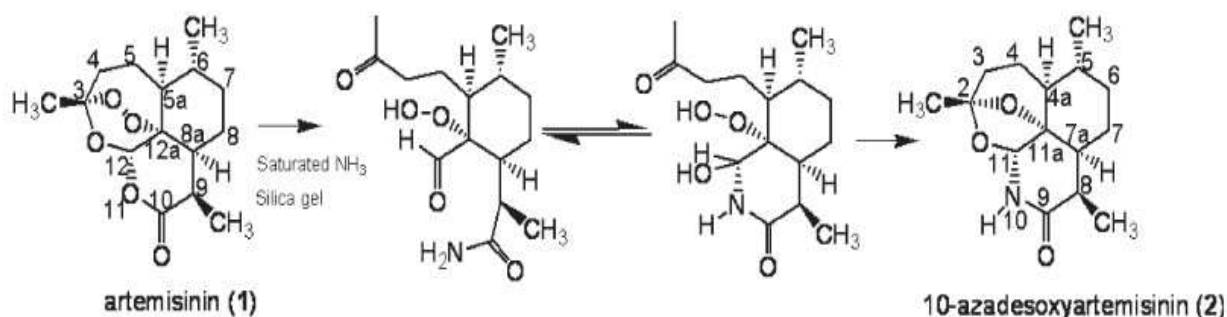


Fig. 36/A: derivatizzazione dell'artemisinina con ammoniacca

Metodo B: reazione con soda caustica a 60°C con formazione del composto Q 258 come indicato da Ghafoori et al (2013) con assorbimento a 254 nm (riscontrato 292 nm, vedere Fig. 47-48) e lettura dell'assorbanza con spettrofotometro.

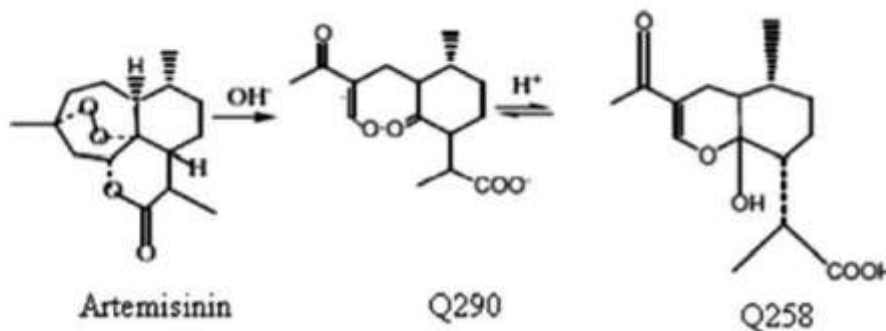


Fig.36/B: derivatizzazione artemisinina con NaOH

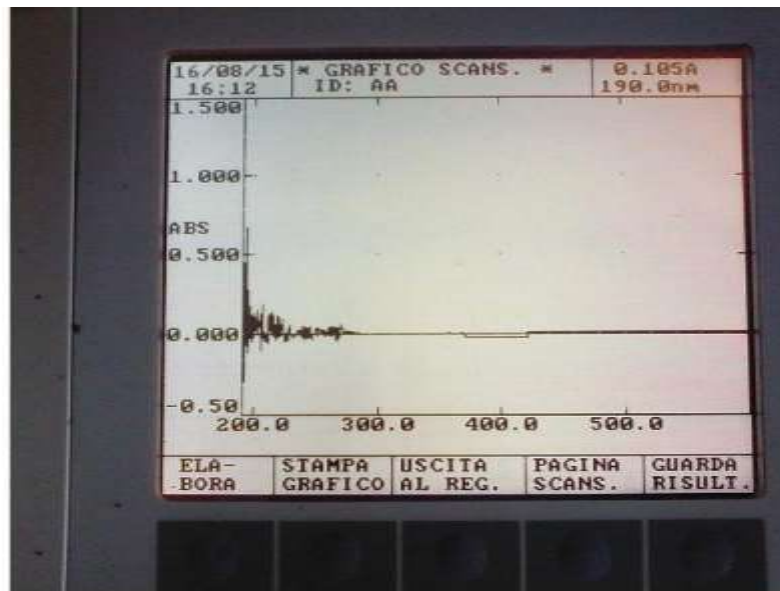


Fig. 37: Spettro artemisinina non derivatizzata in metanolo



Fig. 38: artemisinina derivatizzata

NOME CAMPIONE: A		
MARCA	ABS. (A)	LUNG. D'ONDA
1	FICCO 0.332	192.5
2	FICCO 0.098	200.0
3	FICCO 0.140	211.5
4	FICCO 0.100	217.0
5	FICCO 0.153	224.0
6	FICCO 0.147	230.5
7	FICCO 0.107	245.0
8	FICCO 0.100	250.0
9	FICCO 0.091	260.0
10	FICCO 1.473	291.0

GRAFICO SCANS.	STAMPA LISTA	USCITA AL REG.
----------------	--------------	----------------

Fig. 39: lunghezza d'onda dei picchi e assorbanza

6.15 STANDARD

Lo standard è stato ricavato da capsule di artemisinina acquistate in rete da Biovea (www.biovea.net), perché la quantità di prodotto dello standard della Sigma Aldrich è insufficiente (100 mg) per il tipo di determinazioni eseguite.

L'estrazione dell'artemisinina eseguita su 5 capsule (Best artemisinin Doctor's Best), contenenti 100 mg di artemisinina ciascuna con i relativi eccipienti: magnesio stearato e cellulosa.

Indicazioni d'uso dell'integratore: migliora lo stato di benessere. In etichetta si dice che la dose che non causa effetti avversi non è stata stabilita dalla FDA (Food and Drug Administration)

L'estrazione viene fatta con esano (100 ml) a caldo con raffreddamento a ricadere per un'ora, ma la solubilità dell'artemisinina in esano è bassa (però si ottiene prodotto con grado di purezza elevato, confermato dalla TLC della fig. 23/A, dove non si vedono bande aggiuntive, solitamente l'artemisinina è accompagnata da tracce di quercetina, visibile per la presenza di un gruppo cromoforo con lampada di Wood, (rif.16) e si ottengono 0,32 g di artemisinina, anziché 0,5 come si sarebbe dovuto ottenere. La solubilità dell'artemisinina nei diversi solventi viene indicata nei lavori di Malwade et al e Nti-Gyabaah et al (rif. 16 - 17).

Con acetato di etile si estrae l'artemisinina totalmente con un buon grado di purezza: estrazione eseguita a caldo con acetato di etile (100 ml) su 5 capsule private dell'involucro di gelatina per 1 ora con refrigerante a ricadere.



Fig. 40: capsule di artemisinina e peso del contenuto di una di esse

Vediamo ora in dettaglio le caratteristiche dei due metodi.

6.2 METODO A (Tecnica TLC-densitometrica)

Questo metodo di analisi è basato sulla conversione strutturale dell'artemisinina su uno strato di gel di silice in presenza di vapori di ammoniaca per formare 10-azadesoxyartemisinin, composto cromoforo (λ max. 320nm) ma visibile anche a 254 nm con lampada di Wood (con sensibilità inferiore), attraverso un confronto densitometrico delle bande di artemisinina con la stessa dello standard.

6.2.1 MATERIALI

Il titolo di artemisinina è stato valutato da piantine coltivate nell'azienda agricola di Ferrero Piero (Pancalieri, TO), i semi sono stati acquistati su Ebay, perché l'alternativa Mediaplant, con semi di qualità superiore per quantità di artemisinina richiede un ordine minimo di 3 g, che porta ad un costo di circa 300 euro, troppo alto per le risorse economiche a disposizione per lo studio.

Solventi, lampada di Wood, lastre TLC (Sigma Aldrich) con rivelatore fluorescenza a 254 e 365 nm e materiale da laboratorio sono stati acquistati dalle ditte Savatec e Labotec, grazie alla collaborazione del Dott. Moruzzi.

6.2.2 ESECUZIONE DEL SAGGIO

Preparazione del campione: foglie fresche ottenuti dalle piante sono state essiccate a 55 ° C in un forno a convezione, ridotte in opportune dimensioni in mulino e la polvere risultante passata attraverso un setaccio n°40.

5 g di pianta essiccata sono stati estratti a ricadere con 100 ml di etere di petrolio/esano (2:1) per 4 h.

Dopo il raffreddamento, l'estratto è stato filtrato su carta da filtro, privato dal solvente attraverso la distillazione sotto vuoto, ed il residuo aggiunto di esano, arrivando al volume di 10 ml, utilizzato per l'analisi TLC densitometrica.

E' stata fatta la curva del metodo deponendo su lastra TLC 4 bande di standard (8, 16,24, 56 µL di soluzione con standard corrispondenti rispettivamente a 0,8- 1,6-2,4-5,6 µg di artemisinina). L'analisi densitometrica delle bande è stata eseguita con il programma 'IMAGEJ', acquisito in rete.

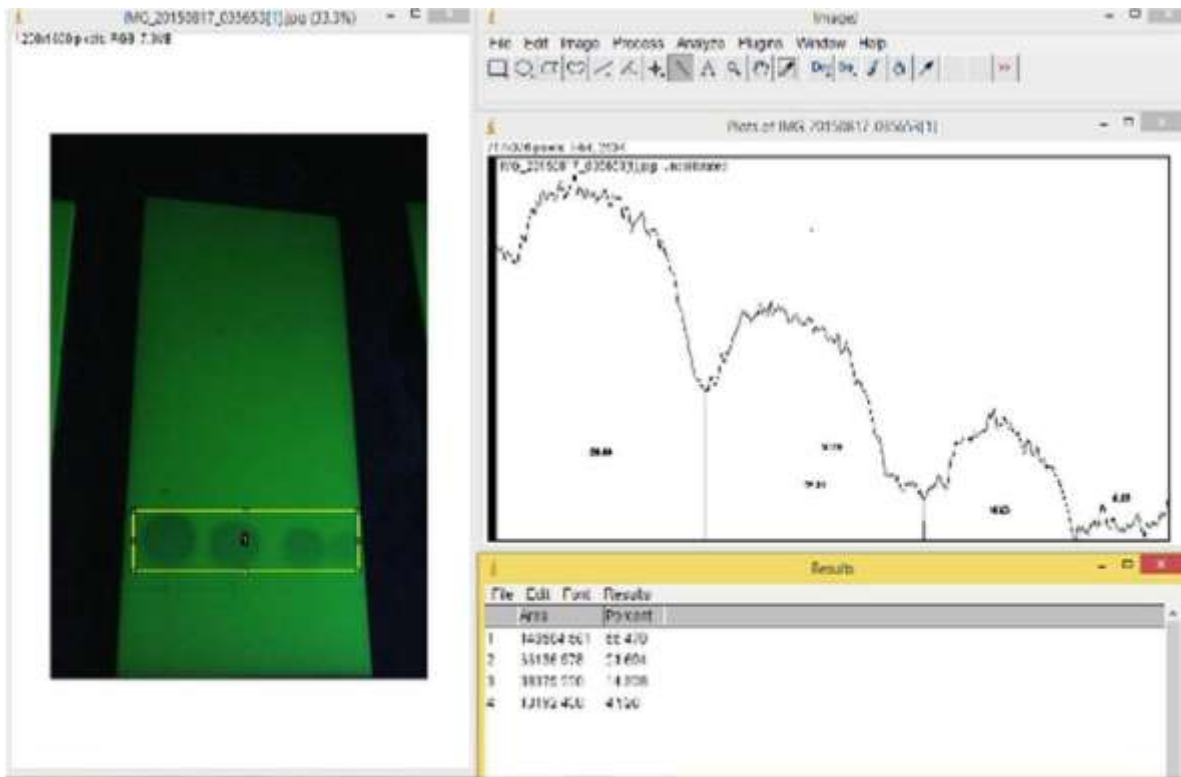


Fig. 41: TLC dello standard artemisinina con 4 deposizioni (5,6, 2,4, 1,6, 0,8 µg), picchi corrispondenti alle relative bande e area di ognuno.

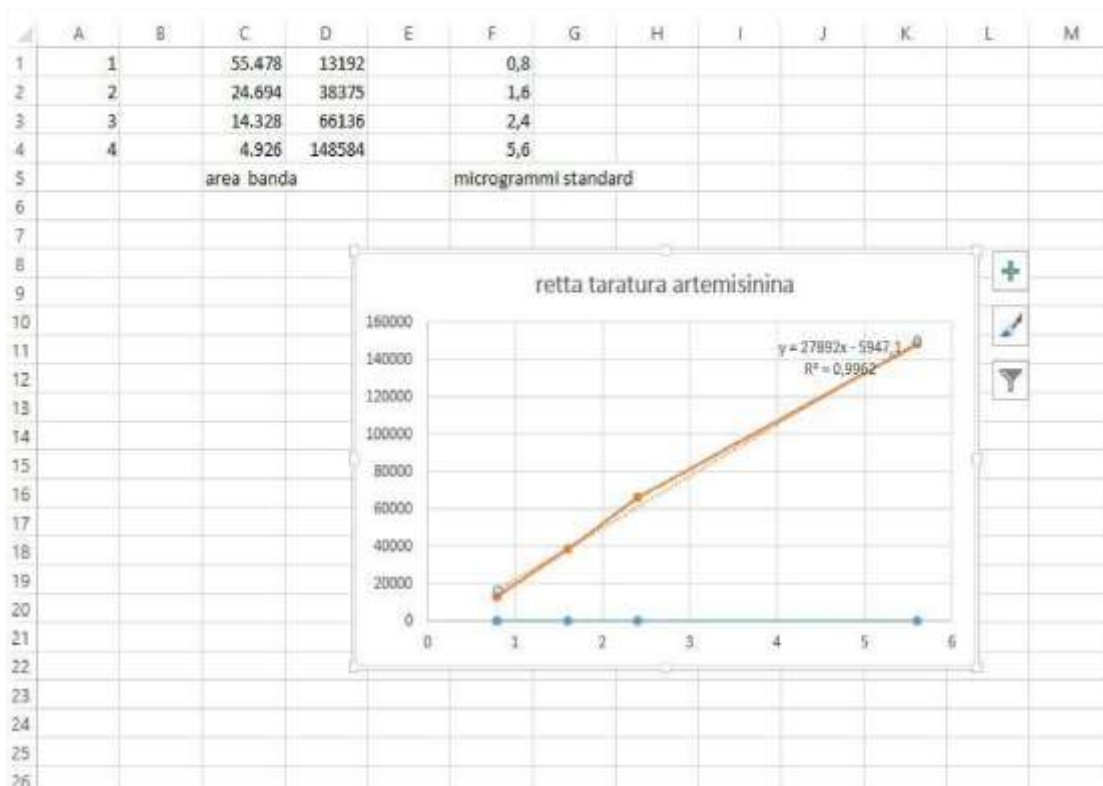


Fig. 42: retta di taratura artemisinina

La deposizione di 8 μ l dei campioni è stata eseguita con micro siringa, deponendo rispettivamente lo standard (2 mg artemisinina per ml di acetato di etile) e l'estratto di Artemisia annua (8 μ l di soluzione, ottenuta dall'estratto secco portata a 3,5 ml) su lastra TLC (10X4 cm in vetro) con soluzione eluente esano/etile acetato/acetone/etere di petrolio (16/1/1/2), la cui immagine è raffigurata di seguito

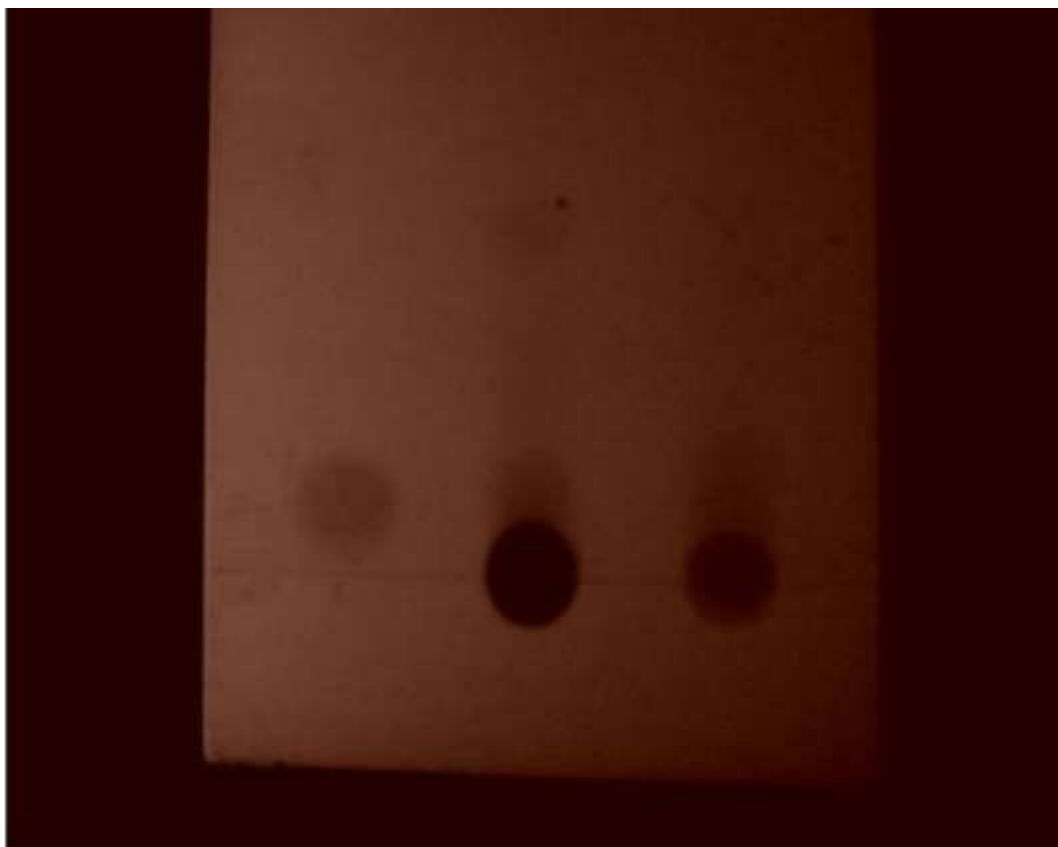


Fig. 43: Immagine lastrina TLC (lampada di Wood a 254 nm) scattata con fotocamera amatoriale (2Mpixel) 'effetto sepia' con standard artemisinina 16 microlitri (banda a sx.) ed estratto di Artemisia annua con deposizione di 16 microlitri al centro e 8 microlitri a dx.

E' stata eseguita l'analisi densitometrica delle bande con IMAGEJ:

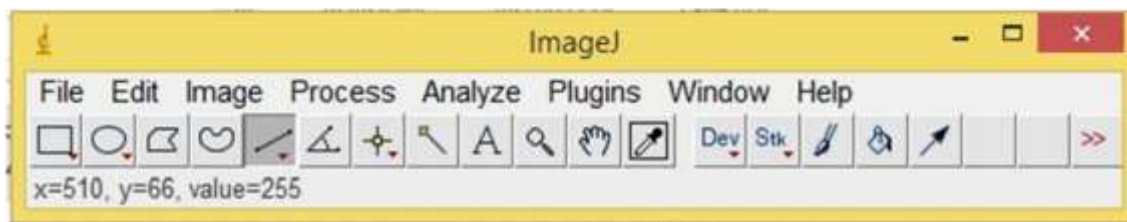


Fig. 44: barra dei comandi di imagej

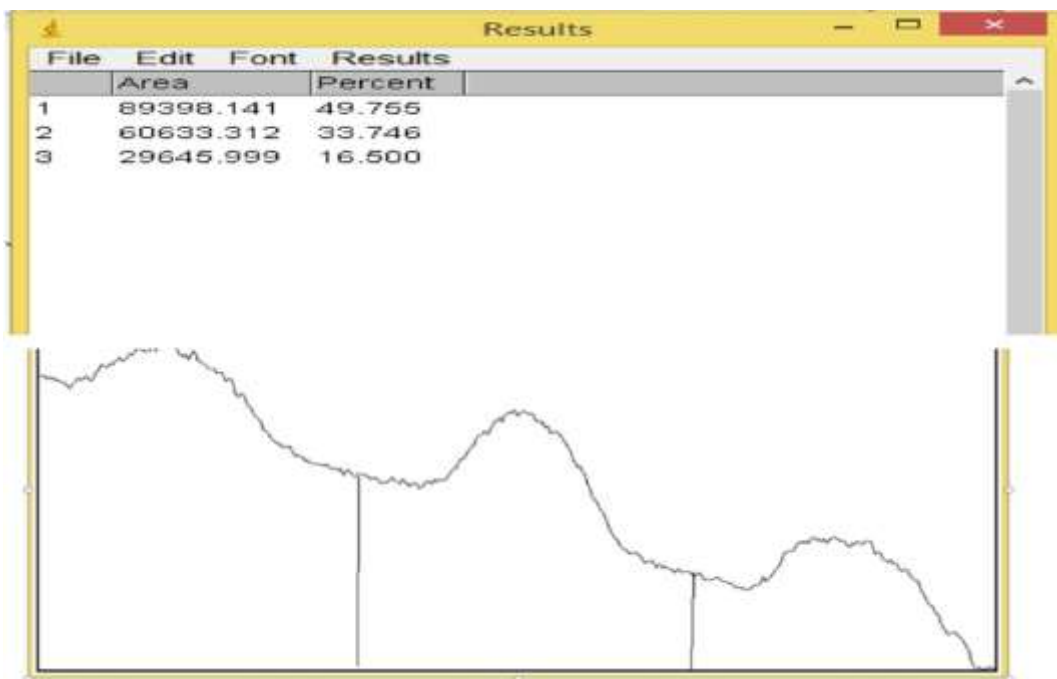


Fig. 45: analisi densitometrica delle bande di fig.25 con misura dell'area dei picchi.

L'estratto di *Artemisia annua* (5 g di pianta secca) in etere petrolio/esano (2/1), il cui residuo è stato sciolto in 3,5 ml di esano del quale ne vengono depositi 8 μ L su lastrina, per raffronto con lo standard (8 μ L di una soluzione di standard ottenuta sciogliendo 90 mg di artemisinina in 5 ml di etil acetato danno 144 μ g di artemisinina sulla banda dello standard con area di 89398.

L'area della banda (primo picco a sinistra della fig. 27) ottenuta dalla deposizione di 8 μ L di estratto di 5 g di *Artemisia annua* ridotto a 3,5 ml è 29645, ottenendo 20,981 mg di artemisinina in 5g di parte aerea essiccata ed una percentuale di

0,418% di artemisinina.

6.3 METODO B

6.3.1 MATERIALI

Spettrofotometro Shimadzu 1204 e Thermo Acquamate Helios, bilancia a 3 decimali, programma per calcolare l'area dei picchi (IMAGEJ).

Cuvette in quarzo, pipette graduate, standard artemisinina.

6.3.2 ESECUZIONE DEL SAGGIO

Derivatizzazione standard: (standard 1) 5 mg di artemisinina vengono sciolti in 5 ml di Etanolo (come indicato nella monografia sull'Artemisia annua WHO, rif. 4), aggiunti 20 ml di NaOH (0,25 %), portati a 60°C per 1 ora e neutralizzati con 6,25 ml di acido acetico 0,2M, portando a temperatura ambiente.

Calibrazione con 4 campioni (fig. 29 A, B, C, D)

Standard 1;

Standard 2: 1 ml di standard 1 + 2 ml di soluzione 'bianco' (5 ml etanolo, 20 ml NaOH ,6,25 ml acido acetico);

standard 3: 1 ml di standard 1 +5 ml bianco;

standard 4: 1 ml di standard 1 + 10 ml bianco.

Eseguendo una lettura allo spettrofotometro dell'assorbanza a 295 nm, come indicato nella monografia WHO, non si ottiene una regressione lineare dovuta:

- alla soluzione di diluizione 'bianco' che, per effetto batocromo (o ipsocromico), varia la lunghezza massima di assorbimento dell'artemisinina derivatizzata.
- all'andamento del profilo dei picchi che risulta 'seghettato', per piccole interferenze, utilizzando l'area come parametro viene fatta una media dei singoli valori puntuali.

Utilizzando invece il rapporto area picco/area grafico dello spettro dell'artemisinina derivatizzata si ottiene un andamento lineare. L'area del picco di Q258 viene calcolata con 'IMAGEJ'

L'equazione della retta è: $Y=0,7087X +0,0549$, con Y = rapporto area picco/area grafico ed X = concentrazione dello standard

Il campione di Artemisia annua viene ottenuto da 5 g di parti aeree essiccate in forno a 50° C, ridotte in polvere e scaldate a ricadere per 4 ore in una soluzione di etere di petrolio/esano 2/1

(100 ml), evaporando i solventi con distillazione sotto vuoto, scaldando con bagno maria ed aggiungendo al residuo 3,5 ml di esano; da questa se ne prende 1 ml e vengono aggiunti 5 ml di etanolo, 20 ml NaOH 0.25% e 6,25 ml acido acetico.

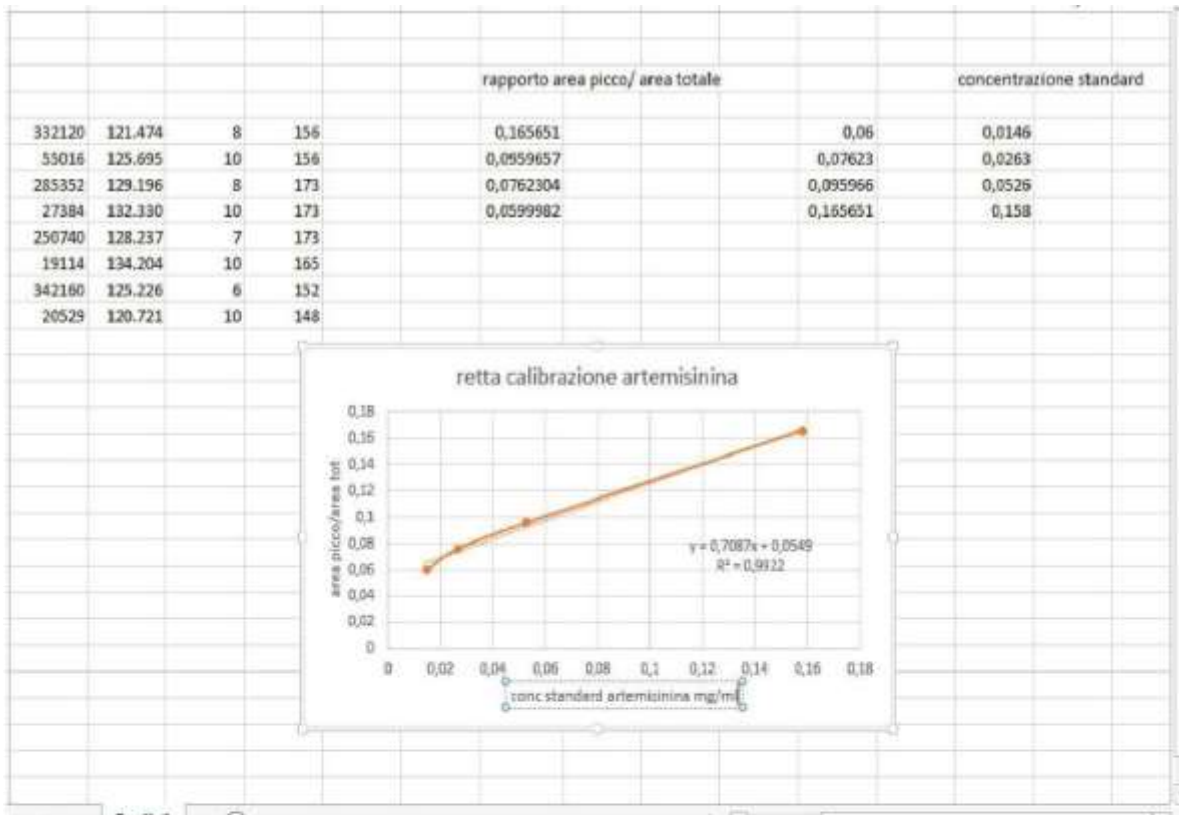


Fig. 46: retta di calibrazione standard 1-4.

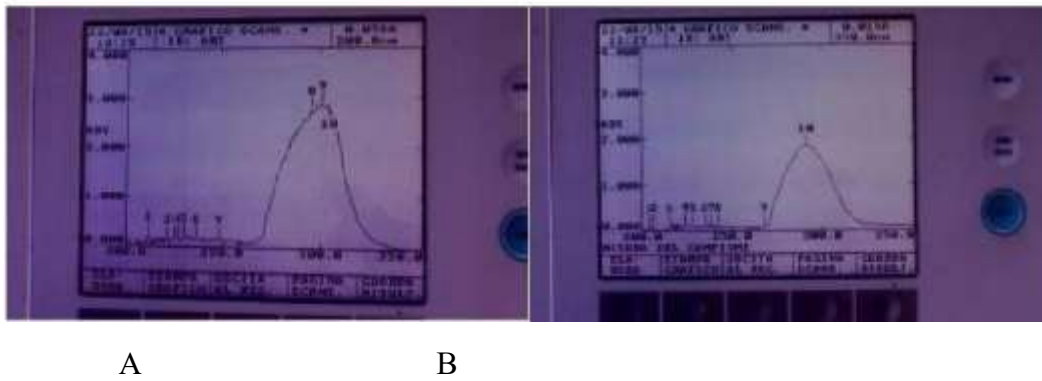


Fig. 47: standard 1 fig. A, standard 2 fig. B



C

D

Fig. 48, standard 3 fig. C, standard 4 fig. D

Dallo spettro dell'estratto di Artemisia annua derivatizzato (1 ml) si ottiene un rapporto area picco/area grafico di 0,0697, che, inserito nell'equazione della retta dà una concentrazione di 0,2096 mg/ml dalla soluzione derivatizzata di 31,25 ml.

Quindi 6,55 mg in 5 g di parte aerea essiccata riferiti a 3,5 ml di estratto=0,459 % di artemisinina

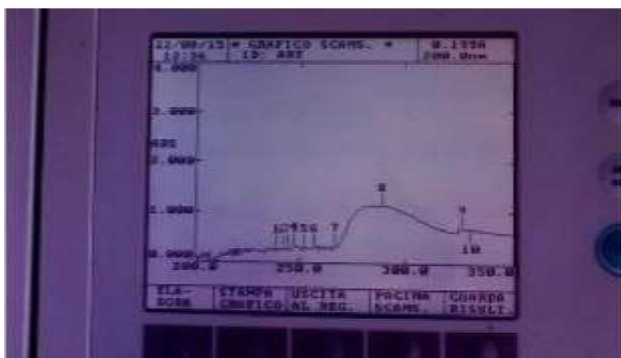


Fig. 49: spettro UV estratto Artemisia annua derivatizzato.

7. RISULTATI

Nelle due tecniche analitiche utilizzate (TLC densitometrica e con spettrofotometro) si ottengono risultati analoghi: 0,418% e 0,459% di artemisinina , tenendo conto che fluttuazioni del titolo si hanno nel vegetale in funzione della composizione del terreno e delle tecniche

culturali adottate e che la determinazione è stata fatta su piante non in antesi (la concentrazione massima di artemisinina si ha nel fiore, vedere fig. 50).

8. TITOLO IN ARTEMISININA IN ALCUNE SPECIE DEL GENERE ARTEMISIA

L'artemisinina è contenuta in quasi tutte le specie del genere Artemisia.

Nel grafico seguente ne è indicata la concentrazione. Lo studio eseguito nel Nord del Pakistan da Mannan et al (rif. 15) su diverse specie del genere Artemisia mostra che la quantità massima di artemisinina si ha nell' Artemisia annua, però utilizzando opportune tecniche estrattive può essere conveniente estrarla dall'assenzio

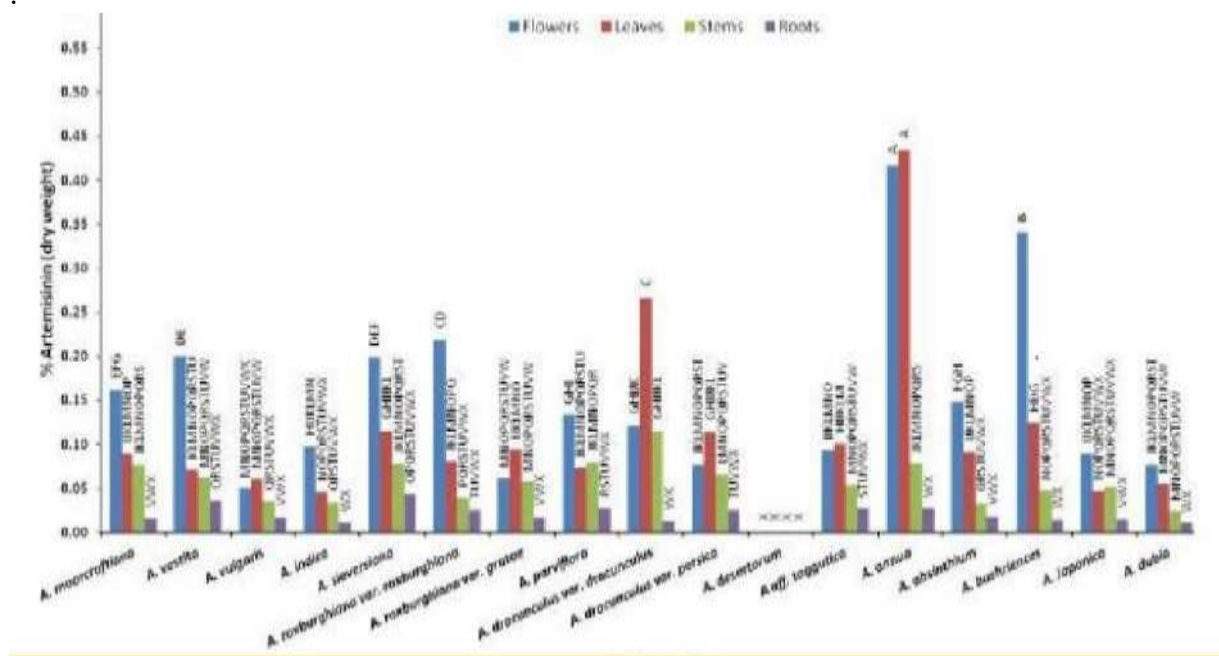


Fig.50: concentrazione di artemisinina in diverse specie del genere Artemisia, in fiore foglia, radici, steli (rif. 15)

Ho eseguito la titolazione dell'artemisinina in su:

- *Artemisia absintium*: semi acquistati on line da seedsgarden.com.
- *Artemisia vulgaris*: piante spontanee cresciute in un frutteto di mele a S. Maria di La Morra (CN).
- *Tanacetum vulgare*: piante acquistate da Anna Negro (vivaio Roagna Matteo, Canove di Govone (CN) ad Aprile 2014
- *Artemisia annua*
- Soluzione idroalcolica di *A. annua*: estrazione con alcool/acqua (60/40), 10 g di droga in 100 ml di miscela, all'ebollizione con raffreddamento a ricadere per un'ora.

La titolazione dell'artemisinina viene eseguita seguendo 2 metodi:

METODO 1

Derivatizzazione di 2 g dell'estratto (5 g di pianta secca estratta con esano/ etere di petrolio 2/1, privato di parte del solvente fino ad arrivare a 5 ml) delle diverse specie con NaOH (0.25 %, 20 ml).

Aggiunta di 5 ml di etanolo al 96%, neutralizzazione con acido acetico (0.2 M, 6.25 ml), filtrazione, quando la soluzione non è limpida con carta da filtro, oppure inserendo del cotone in una pipetta di vetro, se non è sufficiente il primo modo ed eseguendo la misura allo spettrofotometro a 282 nm.

METODO 2

Deposizione su lastrina TLC degli estratti delle diverse specie e dello standard, (Fig. 52), con miscela eluente esano/etil acetato/acetone/acido acetico (33/4/3/5ggt), derivatizzazione dell'intera lastrina attraverso l'esposizione ai vapori di ammoniaca per un'ora e riscaldando in forno a 120°C per un'ora, asportando le bande con un fattore di ritenzione prossimo a quello dello standard ed inserendole in un provettone da 20 ml ed aggiungendo 3 ml di soluzione di bianco (20 ml NaOH 0,25% 6,25 ml acido acetico 0,2 M, alcool etilico al 96% 5 ml), filtrazione.

Scaldando la provetta direttamente su fiamma e raffreddando a temperatura ambiente, filtrando e successiva misura allo spettrofotometro a 280 nm in cuvetta (di quarzo).



Fig. 51: estrazione a caldo con raffreddamento a ricader



METODO 1

- 8
- microlitri, corsa T1 a sinistra
- Lampada di Wood a 254 nm
- T1: standard artemisinina in esano
- T2 :
artemisia volgare
- T3:
tanaceto volgare
- T4:
idroalcolica
- T5:
standard artemisinina in et-acetato
- T6:
artemisia annuale
- T7:
assenzio
- T8: residuo dell'estrazione da
idroalcolica
riestratto con esano/etere di
petrolio

T1 T2 T3 T4 T5 T6 T7 T8



Fig. 53: artemisinina 10 mg in 31,5 ml derivatizzata con metodo1, spettro e altezza picchi



Fig. 54: assenza spettro e altezza picchi
...



Fig. 55: artemisia volgare spettro e altezza picchi

RISULTATI:

Assenzio romano 0,79% di artemisinina

Artemisia volgare 0,45% di artemisinina

Tanaceto volgare 0,63% di artemisinina

METODO 2

Deposizione di 8 μ l di standard artemisinina che corrispondono a 2,53 μ g (10 mg di artemisinina derivatizzati con NaOH, 20 ml, acido acetico 6,5 ml e 5 ml etanolo, quindi 0,317 mg/ml), sciolti in 3 ml di bianco e misura allo spettrofotometro a 280 nm (0,846 mg/ml).



Fig. 56: banda dell'artemisinina standard estratta.

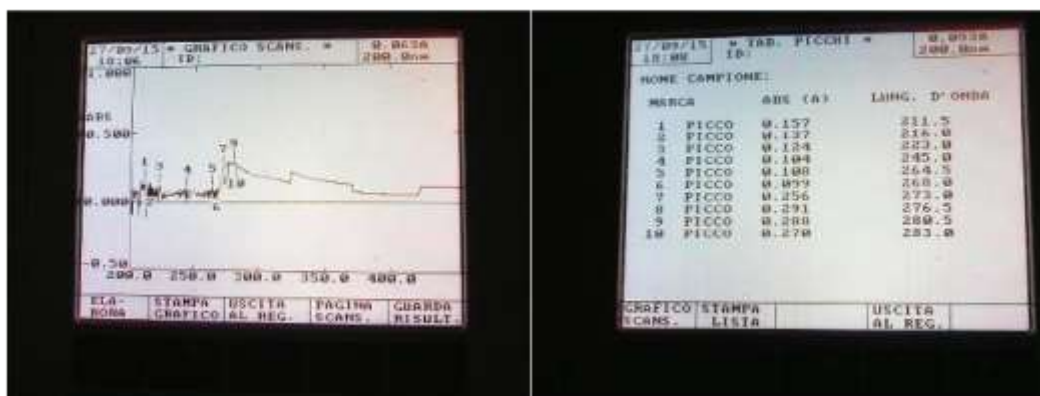


Fig. 57 assorbanza della banda di artemisinina dall'estratto di artemisia annuale

1 ml dell'estratto di artemisia annuale (5 g di estratto ridotte a 5 ml) viene derivatizzato e 8 μ l depositi su lastrina la cui assorbanza a 280 nm è 0,288, per confronto con lo standard danno 0,45% di artemisinina nella pianta essiccata.



Fig. 58: banda dell'artemisinina nella soluzione idroalcolica

2 ml di estratto con esano/etere dietilico da soluzione idroalcolica (50 ml ridotti a 5 ml), rapportato al bianco danno lo 0,89% di artemisinina riferito alla pianta essiccata.

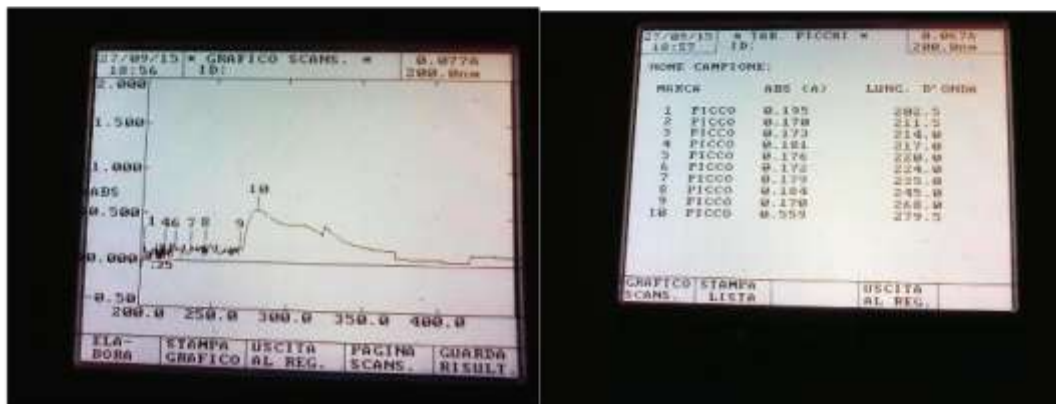


Fig. 59: artemisia volgare

Titolo dell'artemisinina nell'artemisia volgare 0,43%

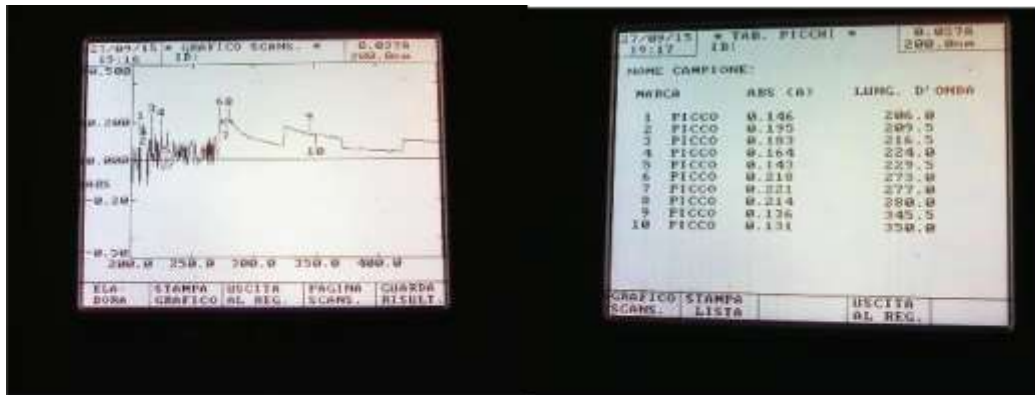


Fig. 60: tanaceto volgare

Titolo in artemisinina del tanaceto 0,16%



Fig. 61: assenzio romano

Titolo in artemisinina dell'assenzio romano 0,18%

7.1 CONSIDERAZIONI SUI RISULTATI:

L'estrazione attraverso una soluzione idroalcolica al 60 % e la ri-estrazione dei composti più apolari attraverso una miscela esano/etere di petrolio (2/1) è risultato il migliore rispetto agli altri considerati in questo studio. Nell'analisi spettrofotometrica dell'estratto derivatizzato la percentuale di artemisinina risulta maggiore al metodo TLC-spettofotometrico, perché alcuni composti analoghi all'artemisinina (aventi lo stesso effetto biologico ma potenza fino a cinque volte superiore all'artemisinina) vengono derivatizzati come l'artemisinina dando una assorbanza aumenta

9. TIROCINIO

Il tirocinio è stato svolto nell'azienda agricola Bonetto di Piero Ferrero, nella quale ho avuto la mansione di aiuto alle attività produttive, in particolare coltivazione, essiccazione e trasformazione di specie di piante aromatiche ed officinali. Questa azienda fa parte della Cooperativa 'Erbe aromatiche ed officinali' di Pancalieri (TO).

Fasi principali delle produzioni:

COLTIVAZIONE:

- Preparazione del terreno (vedere cap. 4.5),
- Semina o trapianto
- Diserbo meccanico con frese interfila, o chimico con erbicidi consentiti
- Sarchiature con zappa
- Rincalzo per le specie che lo richiedono
- Trattamenti con agro farmaci contro le patologie vegetali
- Irrigazione in caso di assenza di precipitazioni per lunghi periodi
- Eradicazione delle erbe infestanti
- Raccolta con falcia caricante semovente per le parti aeree



Fig. 62 falcia caricante semovente in un campo di Mentha piperita

ESSICCAZIONE:

Riempimento dei cassoni con il materiale vegetale fresco

Insufflazione di aria calda, riscaldata con bruciatori a gasolio, GPL, o residui di legna cippati, la temperatura dell'aria varia con le specie essiccate

Scarico

Immagazzinamento in attesa di lavorazione



Fig. 63: operazioni di carico di Passiflora



Fig. 64 sistemazione del materiale nel cassone

di aria calda

per avere un uniforme passaggio

LAVORAZIONI

Separazione delle foglie dai gambi per alcune specie

Macinazione con appositi mulini in modo da ottenere il giusto taglio a seconda delle esigenze dell'acquirente

Separazione tramite vibrovaglio o setacci a tamburo rotante in modo da ottenere esclusivamente taglio tisana, taglio filtro, tagli adatti all'estrazione e separare parti indesiderate come gambi o polvere.

Confezionamento dei prodotti in sacchi, scatoloni, big-bag, messi su pallet e preparati per la spedizione ed immagazzinati in attesa del vettore.



Fig. 65 setaccio a tamburo rotante



Fig. 66: vibrovaglio

ALTRE LAVORAZIONI

Distillazione eseguita su *Menta piperita*, *Chamaemelum nobile* (camomilla romana),
Lavandula officinalis



Fig. 67: alambicchi per la distillazione, il vapore viene generato da un'apposita caldaia.

9.1 APPROFONDIMENTO SULL'ESSICCAZIONE

L'azienda è dotata di 3 impianti di essiccazione che trattano materiale proveniente dall'azienda stessa o da altri soci della cooperativa 'erbe aromatiche ed officinali'.

L'essiccamento è l'operazione unitaria dell'ingegneria chimica che corrisponde alla separazione solido-liquido, la cui caratteristica principale è il rapporto particolarmente alto tra il contenuto di solido e di liquido nel prodotto ottenuto, rapporto che può variare tra circa 5 e in teoria fino a infinito. In questo caso, il liquido da separare è l'acqua.

Vi sono diversi tipi di essiccazione, e per le erbe officinali solitamente viene usato l'essiccamento in corrente di gas che è la forma più comune di essiccamento. Un gas (aria) viene scaldato e, quindi, posto a contatto della miscela solido-liquido. Il gas riscalda il materiale vegetale e l'acqua evapora; la corrente di alimentazione deve essere possibilmente secca e si carica di umidità dovuta al liquido evaporato. L'aria in entrata (se proveniente dal ricircolo) viene raffreddata per officinali quali la melissa che richiede una temperatura di essiccazione bassa per l'alta volatilità di alcuni principi attivi (come il limonene).

In questo tipo di essiccamento è importante conoscere la quantità di liquido che il gas può trascinare senza arrivare alla condensazione. Questo aspetto è studiato dalla psicrometria; la temperatura a cui il gas comincia a rilasciare il liquido in esso disperso in forma liquida è detta punto di rugiada del gas ad una data concentrazione di liquido.

Parametri impianto essiccazione:

Acqua eliminabile dall'impianto:

$$Q = V * q * T$$

$V = \text{m}^3/\text{h}$ portata del ventilatore

$q = \text{g}/\text{m}^3$ capacità specifica d'evaporazione

$T = \text{h}$ tempo utile per l'essiccazione (dalle 75 alle 100 h)

Capacità specifica d'evaporazione:

$$Q = (X_2 - X_1) * \gamma_a \text{ (espressa come g}/\text{m}^3\text{)}$$

$X = \text{g}/\text{kg}$ grammi di vapore acqueo in un kg di aria alla percentuale di umidità in entrata ed in uscita dal cumulo di prodotto da essiccare

$\gamma_a = \text{kg}/\text{m}^3$ peso in kg dell'aria secca in 1 m di aria

Il diagramma di Mollier serve a calcolare i parametri essenziali degli impianti di essiccazione dal quale si ricava l'acqua asportata dalla corrente d'aria alle varie temperature.

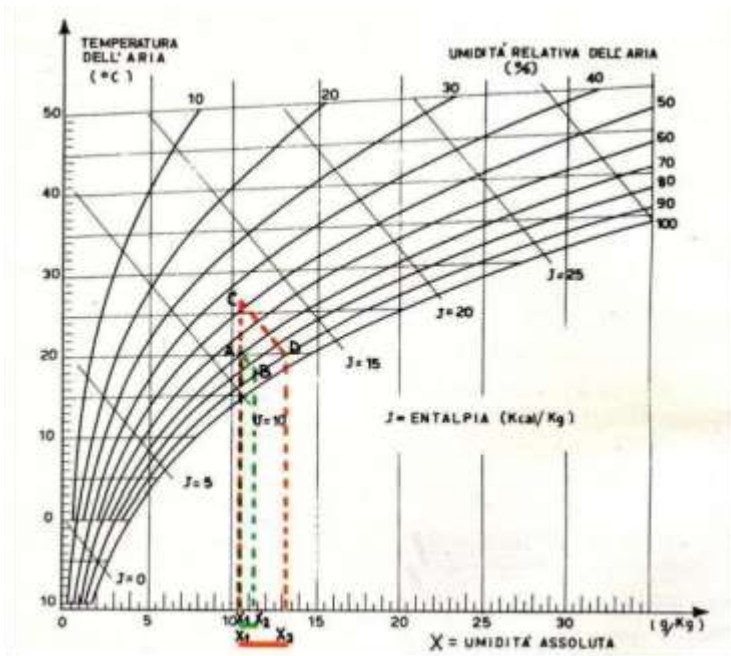


Fig. 68: diagramma di Mollier



Fig. 69 essiccatoio N° 1



Fig.70: essiccatoio N° 3

I bruciatori per la generazione di aria calda sono alimentati a cippato di legna (essiccatoi n° 1 e 2) e GPL (n° 3)



Fig. 71: bruciatore a cippato di legna

Nel bruciatore di fig. 41 si ha la generazione di acqua calda che viene inviata agli essiccatori 1 e 2 dove uno scambiatore aria/acqua ed una ventola provvedono a generare in flusso d'aria alla temperatura impostata.

Sonde per la rilevazione della temperatura e della temperatura del 'bulbo umido' permettono di mantenere le condizioni ideali per una corretta essiccazione.

La temperatura del flusso d'aria deve essere la più bassa possibile perché non si modifichino i principi attivi del materiale, ma sufficientemente alte in modo che i funghi che creano micotossine non si possano sviluppare. Il pericolo maggiore ad esempio per la passiflora è il formarsi di colonie di funghi del genere *Penicillium*, che generano aflatossine e se la temperatura è superiore ai 42,5 °C non si ha crescita.

C'è però da considerare che le piante essiccate contengono acqua che passando allo stato di vapore assorbe il calore latente di evaporazione, abbassando la temperatura, che rientra nel range di crescita dei funghi che generano micotossine. Le sonde a bulbo umido risolvono questo problema, mantenendo una temperatura dell'aria in ingresso sufficientemente alta in modo che le piante durante il processo superino i 42,5 °C.

La temperatura del bulbo umido è quella di un termometro avvolta da un tampone bagnato d'acqua, che è funzione dell'umidità dell'aria, se l'umidità relativa dell'aria è del 100% la

temperatura del bulbo umido sarà uguale a quella dell'aria non avendosi evaporazione e non venendo assorbito il calore latente di evaporazione dell'acqua.



Fig. 72: Quadro comandi dell'essiccatore n° 3, la freccia indica la programmazione della temperatura del bulbo umido.

9.2 ALCUNE IMMAGINI DELLE SPECIE COLTIVATE NELL'AZIENDA:



Fig. 73: *Passiflora incarnata*



Fig.74 H *yssopus officinalis*



Fig. 75: *Hypericum perforatum*



Fig. 76: *Santureja ortensis* (erba cerea)

10. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La coltivazione di Artemisia annua ricopre piccolissime superfici di terreno, nonostante attualmente sia molto richiesta, fornendo una resa in artemisinina minore rispetto alle zone dove viene usualmente coltivata e dove il clima è più favorevole.

Nel 2009 il titolare dell'azienda aveva seminato un terreno delle dimensioni di una giornata (piemontese) con ottimi risultati dal punto di vista produttivo, ma non riuscendo a collocare il prodotto sul mercato, perché non si conosceva l'utilizzo della pianta contro le neoplasie.

Il contenuto di artemisinina riscontrato è risultato essere di circa 0,4 % (prima dell'antesi) e 0,89 % in fioritura. I risultati variano con il metodo estrattivo ed il tipo di titolazione in quanto i solventi apolari come esano ed etere di petrolio sono selettivi nei confronti di artemisinina ed analoghi ma richiedono l'estrattore Soxhlet anziché un pallone come io ho utilizzato. Inoltre nella derivatizzazione degli estratti subiscono derivatizzazione anche gli analoghi dell'artemisinina (che hanno azione biologica simile all'artemisinina) e l'assorbanza risulta essere la somma di ognuno di essi.

La coltivazione potrebbe essere economicamente vantaggiosa, considerando che in Italia non si trova in commercio (neppure in farmacia) ed è richiesta come antitumorale, confortata da numerosi studi favorevoli in vitro, nei quali l'artemisinina agirebbe assieme al ferro con un'azione selettiva contro le cellule tumorali. (Jung et al rif. 8, Singh et al rif. 9).

Degno di citazione il caso di un italiano (Amedeo Gioia) a cui è stato diagnosticato un cancro alla prostata con metastasi e prospettive di vita di qualche mese, che, in base agli studi in vitro, ha tentato un rimedio con soluzione idroalcolica di Artemisia annua, ferro (e dieta vegana), con esiti decisamente positivi (rif. Sitografia N° 4). Gioia ha divulgato questo suo metodo su un blog ('quelli dell'artemisia annua'). Altre persone con problemi analoghi hanno provato la medesima cura e vi sono ad oggi un centinaio di testimonianze positive in Italia. Ad oggi l'associazione di prodotti di estrazione dell'Artemisia annua con la dieta vegana non è suffragata da alcuno studio, però l'attività contro molteplici tipologie di neoplasie è dimostrata in vitro (ne sono pubblicati centinaia di studi) ed in vivo (alcune decine di studi). In appendice

ho riportato alcuni abstract di lavori sul 'attività (positiva, ed in alcuni casi risolutiva) contro le neoplasie dei composti e dei derivati dell'artemisinina in vivo. In tutti gli studi viene evidenziata la bassissima incidenza di eventi avversi.

Da notare che l'estrazione con una soluzione contenente acqua non è ideale per portare in soluzione l'artemisinina perché se aggiunta anche in quantità del 5-10 % causa la quasi totale precipitazione del principio attivo, da una soluzione di artemisinina con solvente anidro come indicato dallo studio di Nti-Gyabaah et al 2010, che però non trova riscontro dalle determinazioni eseguite nel capitolo 8.

Seppure in Italia non vi sia una tradizione d'uso dell'*Artemisia annua*, i principi attivi sono gli stessi contenuti in altre specie del genere *Artemisia*, come ad esempio *Artemisia absinthium* (var. romano e gentile), *Artemisia dracunculoides* (dragoncello), presenti nella maggior parte dei vini aromatizzati e di molti liquori, ed assunti da ampie fasce di popolazione.

L'artemisinina in queste specie può arrivare fino a concentrazioni dello 0,3-0,5%, come indicato in fig. 50.

Inoltre l'*Artemisia annua* è utilizzata per produrre vermouth (Rif. Sitografia N° 1).

11. ABSTRACT

In this study on *Artemisia annua* agronomic aspects and title in artemisinin (one of the most important active components of the species) have been considered.

In the first part of the work some botanical characteristics of the plant are reported, as well as aspects on pharmacognosy.

Then, analytical determinations on artemisinin title performed with two different methods are described: TLC-densitometry and using a spectrophotometer. Two types of derivatization (with ammonia and NaOH) have been tested, in order to increase the absorption in the UV (moving it to 250-300nm), where the absorbance is the most adequate.

The methods are suitable for a practical use, applicable to production. In fact, it is essential to know the title in artemisinin of the variety under cultivation, in order to obtain results that allow a pharmaceutical use of the product and to adopt appropriate methods to this end.

In the last part a new way to use *Artemisia annua* is described

PAROLE CHIAVE

Italiano: artemisia annua, artemisinina, coltivazione, TLC, spettrofotometria

Inglese: Artemisia annua, artemisinin, cultivation, TLC, spectrophotometry

12. BIBLIOGRAFIA

1. Jean Brunetton Pharmacognosie Lavoisier. IV ed. 2009
2. THONGCHAI KOOBKOKKRUAD, ARAYA CHOCHAI, CHALERMPOL KERDMANEE and WANCHAI DE-EKNAMKUL: TLC-Densitometric Analysis of Artemisinin for the Rapid Screening of High-producing Plantlets of Artemisia annua L Phytochemical Analysis 18: 229–234 (2007)

3. GHAFUORI A , R. SARIRI: ANALYSIS OF ARTEMISININ ISOLATED FROM *Artemisia Annua L.* BY TLC AND HPLCH. *Journal of Liquid Chromatography* Apr 2013.
4. WHO monograph on good agricultural and collection practices (GACP) for *Artemisia annua L.* ISBN 978 92 4 159443 1, (2006)
5. ABDUL MANNAN, IBRAR AHMED: . Survey of artemisinin production by diverse *Artemisia* species in northern Pakistan- *Malaria journal* 2010 9:310
6. ICEI-*Artemisia annua L.* Stato dell'arte 2007
7. PROF. FRANCO CHIALVA: Materiale didattico attività libera 'LA MENTA' (2012)
8. Jung M et al. Recent advances in artemisinin and its derivatives as antimalarial and antitumor agents. *Current Medical Chemistry*, 2004, 11:1265–1284.
9. Singh NP, Lai HC. Synergistic cytotoxicity of artemisinin and sodium butyrate on human cancer cells. *Anticancer Research*, 2005, 25:4325–4331.
30. Lee J, Zhou HJ, Wu XH. Dihydroartemisinin downregulates vascular endothelial growth factor expression and induces apoptosis in chronic myeloid leukemia K562 cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2005, 2:1–8.
10. Romero MR et al. Effect of artemisinin/artesunate as inhibitors of hepatitis B virus production in an in vitro replicative system. *Antiviral Research*, 2005, 68:75–83.
11. Dewick: *Chimica, biosintesi e bioattività delle sostanze naturali.* Pag. 172-179 PICCIN editore
12. Ferreira, J., J. Laughlin, N. Delabays, and P. Magalhaes. 2005. Cultivation and Genetics of *Artemisia annua L.* for the Increased Production of the Antimalarial

Artemisinin. *Plant Genetic Resources*, 3(2):206-229.13.(2005)

13. Interlandi G., D'Amore R., Raimo F., Leone V., Cozzolino E., Piro F., Zeno G., Vatore R. Introduzione della coltivazione di *artemisia (Artemisia annua L.)* nelle aree

14. Blanc B.1*, Weniger B.1, Nicolas J.-P.2 Réflexions autour de la culture d'Artemisia annua et de la production d'artémisinine Ethnopharmacologia, n°41, juin 2008

15. Abdul Mannan^{1,3*}, Ibrar Ahmed^{1,4}, Waheed Arshad¹, Muhammad F Asim¹, Rizwana A Qureshi², Izhar Hussain³. Survey of artemisinin production by diverse Artemisia species in northern Pakistan. Malaria journal 2010 9-310

16. Chandrakant R. MALWADE, Haiyan QU, Ben-Guang RONG, Lars P. CHRISTENSEN: Purification of artemisinin from quercetin by anti-solvent crystallization, Front. Chem. Sci. Eng. 2013, 7(1): 72–78

17. Joseph Nti-Gyabaah,, Kodzo Gbewonyo and Yee C. Chiew: Solubility of Artemisinin in Different Single and Binary Solvent Mixtures Between (284.15 and 323.15) K and NRTL Interaction Parameters: J. Chem. Eng. Data 2010, 55, 3356–3363

SITOGRAFIA

- [1]. www.actaplantarum.it [Artemisia annua]
[<http://www.actaplantarum.org/acta/galleria1.php?id=1025>]

- [2]. WIKIPEDIA [Artemisia annua]
[https://it.wikipedia.org/wiki/Artemisia_annua]

- [3]. E-bay [piantedellavita]
[<http://www.ebay.it/>]

- [4]. Pagina facebook: quelli dell'Artemisia annua
[<https://www.facebook.com/groups/340030199488811/>]

- [5]. IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori

[<http://www.istitutotumori.mi.it/modules.php?name=News&file=article&sid=174>]

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare i docenti del corso di laurea di Tecniche Erboristiche per i preziosi insegnamenti durante i tre anni di studio,

il Prof. Belletti e la Prof. Colombo

mia madre, per i vari sostegni,

Piero Ferrero, che mi ha ospitato nel tirocinio

il Dott. Moruzzi che ha allestito il laboratorio e

La segreteria didattica di Tecniche erboristiche per le preziose indicazioni

ALCUNI STUDI IN VIVO SULL'ARTEMISININA E DERIVATI INERENTI
PATOLOGIE NEOPLASTICHE

1) Biomaterials. 2015 Sep;62:35-46. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.05.036. Epub 2015 May 19.

Dihydroartemisinin and transferrin dual-dressed nano-graphene oxide for a pH-triggered chemotherapy.

Liu , Wei , Zhai , Chen , Xing

Abstract

Dihydroartemisinin (DHA) is a unique anti-malarial drug isolated from the plant *Artemisia annua*. Recently, it has been studied as an alternative modality for cancer therapy, utilizing its reactive oxygen species (ROS) yielding mechanism from interacting with Ferrous ion (Fe (II)). In this work, a novel nanodrug (DHA-GO-Tf) is constructed based on nanoscale Graphene oxide (GO) dual-dressed with DHA and Transferrin (Tf). Tf dually functions as a pilot for the nanoparticle to target tumor cell with over expressed Transferrin receptor (TfR) and a ferric ion carrier. Upon tumor cellular endocytosis, Ferric ion (Fe(III)) is released from the Tf, triggered by the low pH in the lysosomes of the tumor cell. The intracellular Fe (III) is reduced to Fe (II) and interacts with DHA to increase its cytotoxicity. The potential of this alternative anti-tumor modality is demonstrated both in vitro and in vivo. Comparing with DHA alone, the nanodrug DHA-GO-Tf resulted in a significantly enhanced tumor delivery specificity and cytotoxicity, and achieved a complete tumor cure in mice with minimal sideeffects.

Elsevier Ltd.

- 2) Nat Prod Bioprospect. 2014 Apr;4(2):113-8. doi: 10.1007/s13659-014-0013-7. Epub 2014 Apr 12.

Treatment of Iron-Loaded Veterinary Sarcoma by *Artemisia annua*.

Breuer , Efferth Abstract

Artemisinin, a constituent of *Artemisia annua* L., is a well-known antimalarial drug. Artemisinin-type drugs also inhibit cancer growth in vitro and in vivo. Herbal extracts of *A. annua* inhibit the growth of cancer cell lines. Here, we report on the use of capsules containing powder of *Herba Artemisiae annuae* to treat pet sarcoma. The surgical tumor removal as standard treatment was supplemented by adjuvant therapy with *A. annua*. One cat and one dog with fibrosarcoma survived 40 and 37 months, respectively, without tumor relapse. Two other dogs suffering from fibrosarcoma and hemangioendothelial sarcoma also showed complete remission and are still alive after 39 and 26 months, respectively. *A. annua* was well tolerated without noticeable side effects. These four cases indicate that *A. annua* may be a promising herbal drug for cancer therapy.

- 3) Evid Based Complement Alternat Med. 2013;2013:454783. doi: 10.1155/2013/454783. Epub 2013 Oct 8.

Synergistic inhibition of angiogenesis by artesunate and captopril in vitro and in vivo.

Krusche B1, Arend J, Efferth T.

Abstract

Inhibition of angiogenesis represents one major strategy of cancer chemotherapy. In the present investigation, we investigated the synergism of artesunate and captopril to inhibit angiogenesis. Artesunate is an antimalarial derivative of artemisinin from the Chinese medicinal plant, *Artemisia annua* L., which also reveals profound anticancer activity in vitro and in vivo. Captopril is an angiotensin I-converting (ACE) inhibitor, which is well established in Western academic medicine. Both compounds inhibited migration of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in vitro. The combination of both drugs resulted in synergistically inhibited migration. Whereas artesunate inhibited HUVEC growth in the XTT assay, captopril did not, indicating independent modes of action. We established a chorioallantoic membrane (CAM) assay of quail embryos (*Coturnix coturnix* L.) and a computer-based evaluation routine for quantitative studies on vascularization processes in vivo. Artesunate and captopril inhibited blood vessel formation and growth. For the first time, we demonstrated that both drugs revealed synergistic effects when combined. These results may also have clinical impact, since cardiovascular diseases and cancer frequently occur together in older cancer patients. Therefore, comorbid patients may take advantage, if they take captopril to treat cardiovascular symptoms and artesunate to treat cancer. Asian Pac J Cancer Prev. 2013;14(8):4615-9.

4) The synergistic anticancer effect of artesunate combined with allicin in osteosarcoma cell line in vitro and in vivo.

Jiang , Huang, Wang , Yu , Zhang

Abstract

BACKGROUND:

Artesunate, extracted from *Artemisia annua*, has been proven to have anti-cancer potential. Allicin, diallyl thiosulfinate, the main biologically active compound derived from garlic, is also of interest in cancer treatment research. This object of this report was to document synergistic effects of artesunate combined with allicin on osteosarcoma cell lines in vitro and in vivo.

METHODS:

After treatment with artesunate and allicin at various concentrations, the viability of osteosarcoma cells was analyzed by MTT method, with assessment of invasion and motility, colony formation and apoptosis. Western Blotting was performed to determine the expression of caspase-3/9, and activity was also detected after drug treatment. Moreover, in a nude mouse model established with orthotopic xenograft tumors, tumor weight and volume were monitored after drug administration via the intraperitoneal (i.p.) route.

RESULTS:

The viability of osteosarcoma cells in the combination group was significantly decreased in a concentration and time dependent manner; moreover, invasion, motility and colony formation ability were significantly suppressed and the apoptotic rate was significantly increased through caspase-3/9 expression and activity enhancement in the combination group. Furthermore, suppression of tumor growth was evident in vivo.

CONCLUSION:

Our results indicated that artesunate and allicin in combination exert synergistic effects on osteosarcoma cell proliferation and apoptosis.

5) Arteether exerts antitumor activity and reduces CD4+CD25+FOXP3+ T-reg cells in vivo.

Azimi Mohamadabadi M, Hassan ZM, Zavaran Hosseini A, Gholamzad M, Noori S, Mahdavi M, Maroof H.

Iran J Immunol. 2013 Sep;10(3):139-49. doi: IJiv10i3A2.

PMID: 24076591

6) Drug Deliv. 2013 Apr-May;20(3-4):127-33. doi: 10.3109/10717544.2013.801047. Epub 2013 Jun 3.

In vivo study of effects of artesunate nanoliposomes on human hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice.

Jin , Shen , Zhao C Qin X Liu H Huang , Qiu , Liu .

Abstract

To investigate the effect of artesunate nanoliposomes on cultured cells in vitro and hepatocellular carcinoma xenografts in BALB/c-nu mice. Fluorescence polarization was applied for measurement of mitochondrial membrane fluidities; inhibition test of tumor cell proliferation in vitro was performed and nude mice xenograft model from human hepatocellular carcinoma (HCC) was established. Cytotoxicity of these compounds was evaluated by MTT assay on hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice. Anisotropy (rvalue) of blank nanoliposomes didn't change, it had no statistically significance between the blank nanoliposomes group and the control group, it indicated that artesunate had no obvious effect on L-O2 human normal liver cells. IC₅₀ values of artesunate nanoliposomes and artesunate API (active pharmaceutical ingredient) against HepG-2 cells were 15.997 and 19.706 µg/ml; IC₅₀ values of the same drugs against L-O2 normal human liver cells were 100.23 and 105.54 µg/ml, respectively. Tumor growth inhibitory effect of artesunate nanoliposomes was 32.7%, and artesunate API was 20.5%, respectively. HepG-2 cells treated with artesunate nanoliposomes showed dose-dependent apoptosis. The antitumor effect of artesunate nanoliposomes on human hepatoma HepG2 cells were stronger than that of artesunate API at the same concentration.

PMID: 23731485 [PubMed - indexed for MEDLINE]

7) Interruption of the MEK/ERK signaling cascade promotes dihydroartemisinin-induced apoptosis in vitro and in vivo.

Gao , Budhraj , Cheng , Liu E, Huang , Chen , Yang , Chen , Zhang , Shi Apoptosis.

2011 May;16(5):511-23. doi: 10.1007/s10495-011-0580-6.

PMID: 21336837

