



# PROPRIETÀ ANTIVIRALI DEL MIRTILLO ROSSO AMERICANO

*(Vaccinium macrocarpon Aiton)  
contro Herpes simplex e Influenza (H1N1)*

*Il cranberry, piccolo frutto di origine americana, presenta un profilo fitochimico differente da quello del parente europeo *Vaccinium vitis-idea*, essendo caratterizzato da un alto contenuto di proantocianidine, sostanze in grado di bloccare l'adesione dei batteri alle cellule, impedendone così l'ingresso e il progredire dell'infezione. Questa proprietà, caratteristica peculiare del cranberry, si rivela un'ottima strategia anche nei confronti dei virus, in particolare l'Herpes simplex e quelli dell'influenza.*

**\*Massimo Maffei**

**I**l mirtillo rosso americano (*Vaccinium macrocarpon* Aiton, famiglia Ericaceae), e in particolare il suo succo, sono sicuramente una delle preparazioni botaniche più note per il trattamento e la prevenzione delle infezioni urinarie (Maffei, 2016). Tuttavia gli estratti di mirtillo rosso americano sono anche noti per le loro proprietà antivirali. Considerando l'incidenza globale significativa, la morbilità e il tasso di mortalità delle infezioni virali, lo sviluppo di nuovi e sicuri prodotti con attività antivirale è di alta priorità (Obiero *et al.*, 2012). Pertanto, gli inibitori di adesione/ingresso cellulare che bloccano la diffusione e la trasmissione del virus attraverso un contatto personale ravvicinato possono fornire un metodo realistico di intervento microbica. Inoltre, data la capacità di molti virus di stabilire la latenza e di riattivarsi frequentemente, risulta importante che per impedire la loro trasmissione il microbica ideale deve impedire l'insorgenza di infezioni. Da questo punto di vista, gli estratti naturali che impediscono l'attacco dei virus alle cellule bersaglio possono essere più vantaggiosi. Inoltre, diversi polianioni e dendrimeri caricati negativamente che, negli ultimi anni, sono stati selezionati per lo sviluppo come candidati microbicidi, a causa della loro capacità di bloccare l'adesione virale e l'ingresso nelle cellule bersaglio, testimoniano

l'idoneità di questa strategia per contrastare le infezioni virali (Luganini *et al.*, 2010; 2011).

### Virus influenzali e Herpes

I virus dell'influenza di tipo A e di tipo B (IAV, IBV) sono patogeni principali diffusi tra le popolazioni umane e sono responsabili di epidemie stagionali e pandemie (Paules e Subbarao, 2017). Attualmente, i vaccini stagionali rappresentano la misura più efficace per prevenire e controllare le infezioni da IV (Houser e Subbarao, 2015). Tuttavia, la profilassi e il trattamento delle infezioni da IV possono anche beneficiare di due classi di farmaci autorizzati: inibitori della matrice proteica e inibitori della neuraminidasi (Ison, 2015). Gli inibitori della matrice proteica, come amantadina e rimantadina, inibiscono il rivestimento virale degli endosomi interferendo con l'acidificazione mediata dal canale ionico M2 (Hay, 1992). Questi farmaci sono efficaci solo contro l'IAV e il loro uso è limitato dalla bassa efficacia, dagli effetti collaterali e dall'emergere di ceppi resistenti (Suzuki *et al.*, 2003). Gli inibitori della neuraminidasi (NAI), come l'oseltamivir e lo zanamivir, inibiscono il rilascio di progenie virale dalle cellule infette e rappresentano attualmente la terapia di prima linea contro le infezioni influenzali (Ison, 2015). Nonostante l'efficacia di questi farmaci antivirali nei confronti sia di IAV che di IBV, il numero di virus in circolazione resistenti alla NAI è notevolmente aumentato negli ultimi anni (McKimm-Breschkin,

2013). Più recentemente, due nuove NAI sono state approvate per il trattamento dell'influenza - peramivir e laninamivir ottanoato - che sono state proposte come terapia combinata per prevenire la comparsa di resistenza (Alame *et al.*, 2016). Tuttavia, diversi ceppi che sono resistenti a entrambe queste nuove NAI sono già stati isolati (Takashita *et al.*, 2016). Alla luce di questi fatti, il controllo delle infezioni da IV presenta ancora sfide importanti e quindi vi è un'urgente necessità di sviluppare composti anti-IV alternativi che siano efficaci contro virus antigenicamente diversi e caratterizzati da nuovi meccanismi di azione (Van de Wakker *et al.*, 2017).

### Molecole naturali come antivirali

Molte sostanze fitochimiche come i fenoli, i polifenoli, i terpeni e i flavonoidi di molte specie vegetali esercitano attività antivirali. In particolare, è stato scoperto che i polifenoli interferiscono con le prime fasi del ciclo replicativo del virus *Herpes simplex* (HSV) e/o direttamente con le particelle virali. Dati sperimentali indicano che estratti di *Rumex acetosa* e *Myrothamnus flabellifolia* arricchiti di polifenoli esercitano attività antivirale contro HSV-1 attraverso l'inibizione della capacità del virus di aggredire le cellule bersaglio. L'effetto anti-adesivo dell'estratto di *R. acetosa* è principalmente dovuto alla presenza di proantocianidine con legame di tipo B (PAC-B), epicatechina-3-O-gallato-(4 $\beta$ -8)-epicatechi-

- Produzione saponette vegetali 100% personalizzate per erboristerie, profumerie, farmacie
- Saponette da Hotel
- Produzione di cosmetici
- Lavorazione c/o terzi





**Alchimia Soap Srl**  
Via Mantova, 5  
21057 Olgiate Olona (VA)  
Tel.: 0331631582  
Fax: 0331674574  
[www.alchimiasoap.it](http://www.alchimiasoap.it)  
[soap@alchimiasoap.it](mailto:soap@alchimiasoap.it)

na-3-O-gallato, dimostrando così un'associazione tra la perdita di infettività di HSV-1 e le alterazioni della glicoproteina dell'involucro, coerenti con l'interazione delle PAC di tipo B con la superficie del virione (Gescher *et al.*, 2011). Si è quindi concluso che il dimero PAC-B derivato da *R. acetosa* blocca l'adsorbimento di HSV-1 interagendo direttamente con le particelle virali e causando alterazioni delle glicoproteine dell'involucro, come gD, che mediano il legame delle particelle virali ai recettori cellulari.

Polifenoli, flavonoidi, glucosidi e alcaloidi estratti da diverse piante e frutti hanno anche mostrato attività anti-IV (Bahramsoltani *et al.*, 2016).

Tra gli estratti di piante contenenti polifenoli, quelli ricchi di proantocianidine di tipo A (PACs-A) ottenuti dal mirtillo rosso americano esercitano attività antimicrobiche sulla base della loro riconosciuta attività antiadesiva (Krueger *et al.*, 2013).

Pertanto, gli estratti di mirtillo rosso americano possono anche rappresentare una fonte di potenziali composti per impedire l'adesione virale sulle cellule bersaglio. In effetti, le attività antivirali degli estratti di mirtillo sono efficaci contro Reovirus (Lipson *et al.*, 2007), Enterovirus (Su *et al.*,

2010), e persino contro IV (Sekizawa *et al.*, 2013).

Tuttavia, la mancanza di studi meccanicistici e la standardizzazione dei processi produttivi per mantenere concentrazioni comparabili di componenti bioattivi, hanno limitato lo sviluppo di prodotti a base di mirtillo rosso americano come antivirali contro le infezioni da IV.

Recentemente, si è dimostrato che il nuovo estratto di mirtillo rosso americano Oximacro®, che è caratterizzato da un elevato contenuto di PAC di tipo A, è efficace nella prevenzione delle infezioni del tratto urinario (Occhipinti *et al.*, 2016). Studi recenti hanno anche dimostrato l'efficacia di questo estratto come potente antivirale naturale.

## Il mirtillo rosso americano agisce da potente antivirale contro Herpes virus

L'estratto di mirtillo rosso americano agisce come agente anti-influenzale ad azione diretta. La sua attività antivirale è stata valutata *in vitro* sulla replicazione di HSV-1 e HSV-2 (Terlizzi *et al.*, 2016). Il pretrattamento di cellule Vero con l'estratto 1 h prima dell'infezione ha prodotto una significativa inibizione concentrazione-dipendente dei due isolati clinici di HSV-1 e HSV-2 (vedi Figura X). L'analisi della modalità d'azione ha rivelato che l'estratto di mirtillo rosso americano impedisce l'adesione di HSV-1 e HSV-2 alle cellule bersaglio. Cellule Vero congelate sono state trattate con

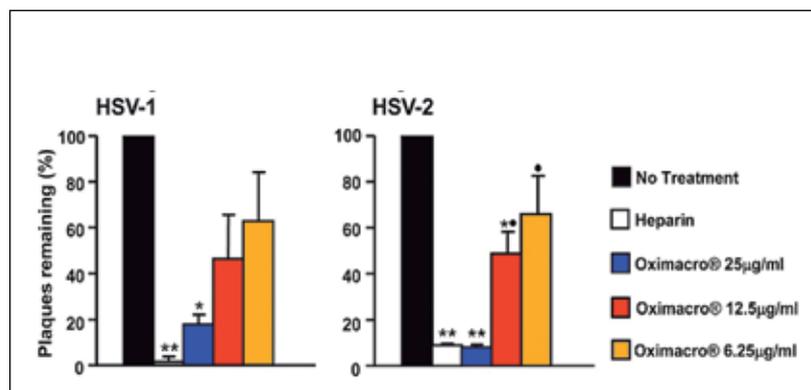
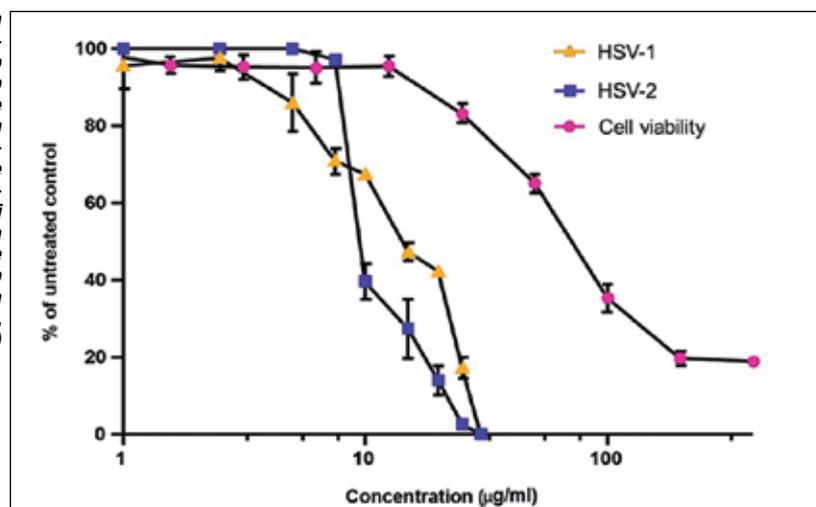


Figura Y. L'estratto di mirtillo rosso americano impedisce l'attacco HSV e inibisce l'adsorbimento di HSV alle cellule bersaglio. (Da Terlizzi *et al.*, 2016).

Figura X. Attività antivirale dell'estratto di mirtillo rosso americano sulla replicazione HSV-1 e HSV-2 in monostrati di cellule Vero trattate con concentrazioni crescenti di estratto 1 ora prima e durante l'adsorbimento del virus. (Da Terlizzi *et al.*, 2016)



varie concentrazioni di estratto, o eparina a 4 °C per 30 min e poi l'infezione è stata effettuata con HSV-1 oppure HSV-2 preraffreddati a una MOI di 0,002 per 3 ore a 4 °C in presenza di composti come indicato nella Figura Y. L'estratto compromette l'adesione di HSV in modo concentrazione-dipendente e in misura simile a quella osservata nella resa dei virus.

Per valutare se sia l'estratto totale di mirtillo rosso americano o se invece siano solo le PAC-A a esercitare l'attività biologica sul virus Herpes è stata analizzata l'attività anti-HSV delle frazioni purifica-

te dall'estratto. Gli studi hanno rivelato che solo le frazioni corrispondenti a dimeri e trimeri di PAC-A sono responsabili dell'attività inibitoria. Ulteriori studi meccanicistici hanno confermato che l'estratto di mirtillo rosso americano e le sue PAC-A hanno come target le glicoproteine gD e gB dell'involucro virale, con conseguente perdita dell'infettività delle particelle di HSV. Inoltre, l'estratto ha mantenuto completamente la sua attività anti-HSV anche a pH acidi (3.0 e 4.0) e in presenza di proteine del siero umano al 10%; condizioni che imitano le proprietà fisiologiche della vagina, un potenziale target terapeutico dell'estratto. Presi insieme, questi risultati indicano che questo estratto di mirtillo rosso americano è un candidato attraente per lo sviluppo di nuovi microbici di origine naturale per la prevenzione delle infezioni da HSV.

La rappresentazione schematica mostrata nella Figura Z mostra l'interazione tra le PAC di tipo A presenti nell'estratto di mirtillo rosso americano e le glicoproteine dell'involucro esterno del virus HSV. Oximacro® lega l'ectodominio delle glicoproteine di HSV (gD e gB) in modo dipendente sia dalla concentrazione che dal tempo, inibendo quindi le loro funzioni di adesione e ingresso virus nelle cellule. Tuttavia, allo stato attuale, non è ancora chiaro se le interazioni tra le PAC di tipo A e le glicoproteine che rivestono HSV provochino alterazioni dei domini di proteine specifiche, o se le PAC di tipo A "avvolgono" semplicemente le glicoproteine (come mostrato nella Figura Y), impedendo di fatto l'accesso ai loro normali partner di legame sulle cellule bersaglio

### Le PAC-A del cranberry sono potenti antivirali contro Influenza A e B

L'estratto di mirtillo rosso americano oggetto dello studio inibisce anche la replicazione dei virus

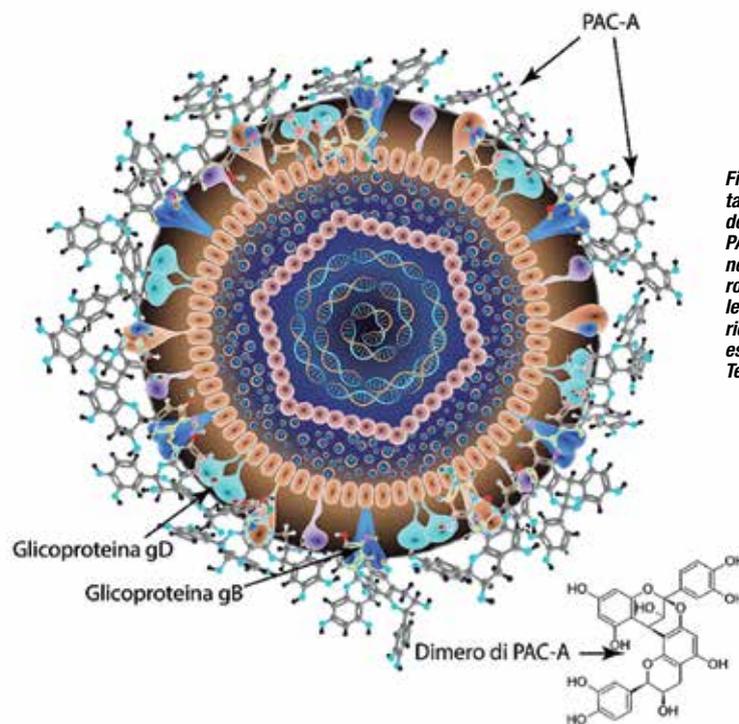


Figura Z. Rappresentazione schematica dell'interazione tra le PAC di tipo A presenti nell'estratto di mirtillo rosso americano e le glicoproteine che ricoprono l'involucro esterno di HSV. (Da Terlizzi et al., 2016)

dell'influenza A e B (IAV, IBV ceppo H1N1) *in vitro* sempre a causa del suo alto contenuto di dimeri e trimeri di proantocianidine di tipo A (PAC-A) (Luganini *et al.*, 2018). L'analisi della modalità d'azione ha rivelato che previene l'adsorbimento e l'ingresso di IAV e IBV nelle cellule bersaglio ed esercita un'attività virucida. L'estratto interagisce con l'ectodominio della glicoproteina di emoaagglutina (HA), con la conseguente perdita di infettività delle particelle di IV. La spettroscopia a fluorescenza ha rivelato una riduzione della fluorescenza intrinseca della proteina HA dopo incubazione con PAC-A dimerica purificata (PAC-A2), confermando così un'interazione diretta tra HA e i dimeri di PAC-A presenti nell'estratto (Figura K).

Le simulazioni di ancoraggio *in silico* hanno ulteriormente supportato i risultati *in vitro* e indicato che, tra i diversi componenti del profilo chimico dell'estratto di mirtillo rosso americano, sono esclusivamente le PAC-A2 che mostrano la migliore propensione al legame con un'affinità inferiore a 10 nM (Figura W).

Il ruolo delle PAC-A2 nell'attività anti-IV è stato ulteriormente

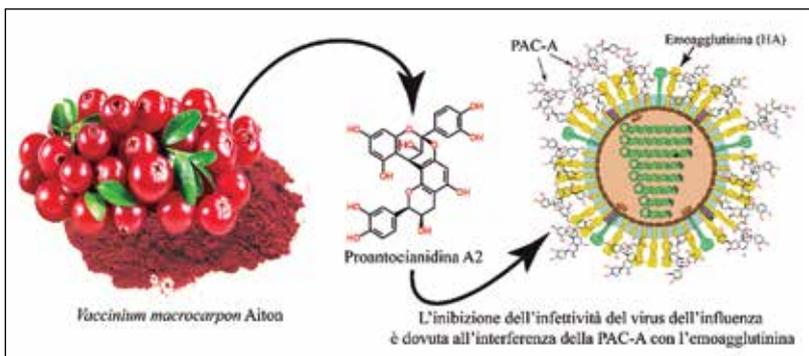
## Erbe ed estratti da agricoltura biologica

# BIOPLANTA

Tradizione e scienza  
*per un BIO sicuro*

[www.bioplanta.it](http://www.bioplanta.it)

**Figura K.** Interazione fra le PAC-A dell'estratto di mirtillo rosso americano e l'emoagglutina presente nell'involucro esterno del virus dell'influenza.



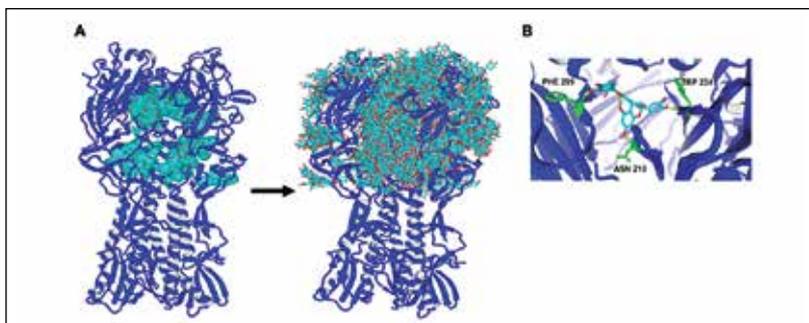
confermato dall'osservazione che l'estratto di mirtillo rosso americano ha impedito la replicazione di IAV e IVB e causato la perdita di infettività delle particelle di IV, indicando quindi nelle PAC-A2 il suo principale componente attivo. Considerati insieme, questi risultati dimostrano che questo estratto di *Vaccinium macrocarpon* è un candidato attraente per lo sviluppo di nuovi antivirali di origine naturale per la prevenzione delle infezioni da virus dell'influenza.

## Conclusioni

Complessivamente, i meccanismi di azione descritti per l'estratto di cranberry oggetto dello studio contro IV e HSV sostengono la potenziale applicazione di estratti di mirtillo rosso americano a elevato contenuto standardizzato di PAC-A nella prevenzione delle infezioni virali. È quindi possibile prevedere che un'applicazione locale di tali estratti nel tratto respiratorio superiore consentirebbe alle PAC-A attive di inattivare il virus infettante dell'influenza,

prevenendo così il verificarsi di un'infezione. Allo stesso modo, applicazioni topiche o per os, sfruttando la capacità delle PAC-A del mirtillo rosso americano di impedire l'attacco HSV-1 e HSV-2, potrebbero essere utilizzate per prevenire l'insorgenza di infezioni da Herpes virus. Queste proposte sono sostenute anche dall'elevato profilo di sicurezza che molte formulazioni di estratti secchi di mirtillo rosso americano hanno dimostrato nel loro uso diffuso per prevenire le infezioni del tratto urinario (UTI) (Blumberg *et al.*, 2013). Tuttavia, lo sviluppo di estratti di *Vaccinium macrocarpon* come aiuto antivirale richiede la valutazione in modelli *in vivo* di infezione acuta per determinare se debba essere proposto come un nuovo principio attivo di agenti antivirali ad ampio spettro di origine naturale idonei a prevenire le infezioni sia da IV che da Herpes virus.

**\*UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO**  
Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi



**Figura W.** Le PAC-A2 interagiscono con l'emoagglutina. (A) La struttura cristallina dell'emoagglutina e l'analisi *in silico* ha rivelato che la PAC-A2 si lega prima nelle scanalature interne della struttura della proteina (pannello sinistro) e successivamente alla superficie della struttura (pannello destro). (B) Sito di legame a livello molecolare fra PAC-A2 e i residui amminoacidici che formano legami di idrogeno con il ligando. (Da Luganini *et al.*, 2018).

## Bibliografia

- Alame, M. M., Massaad, E., and Zakaret, H. Peramivir: a novel intravenous neuraminidase inhibitor for treatment of acute influenza infections. *Front. Microbiol.* 7, 2016:450.
- Bahramsoltani, R., Sodağari, H. R., Farzaei, M. H., Abdolghaffari, A. H., Gooshe, M., and Rezaei, N. The preventive and therapeutic potential of natural polyphenols on influenza. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 14, 2016:57-80.
- Blumberg, J. B., Camesano, T. A., Cassidy, A., Kris-Etherton, P., Howell, A., Manach, C., *et al.* Cranberries and their bioactive constituents in human health. *Adv. Nutr.* 4, 2013:618-632.
- Gescher, K., Kühn, J., Lorentzen, E., Hafezi, W., Derksen, A., Deters, A., Hensel, A., Proanthocyanidin-enriched extract from *Myrothamnus flabellifolia* Welw. exerts antiviral activity against herpes simplex virus type 1 by inhibition of viral adsorption and penetration. *J. Ethnopharmacol.* 134, 2011:468-474.
- Hay, A. J. The action of adamantanamines against influenza A viruses: inhibition of the M2 ion channel protein. *Semin. Virol.* 3, 1992:21-30.
- Houser, K., and Subbarao, K. Influenza vaccines: challenges and solutions. *Cell Host Microbe* 17, 2015:295-300.
- Ison, M. G. Optimizing antiviral therapy for influenza: understanding the evidence. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 13, 2015:417-425.
- Krueger, C.G., Reed, J.D., Feliciano, R.P., and Howell, A.B. Quantifying and characterizing proanthocyanidins in cranberries in relation to urinary tract health. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 2013:4385-4395.
- Lipson, S. M., Cohen, P., Zhou, J., Burdowski, A., and Stotzky, G. Cranberry cocktail juice, cranberry concentrates and proanthocyanidins reduce reovirus infectivity titers in African green monkey kidney epithelial cell cultures. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 2007:752-758.
- Luganini, A., Fabiole Nicoletto, S., Pizzuto, L., Pirri, G., Giuliani, A., Landolfo, S., Gribaudo, G. Inhibition of herpes simplex virus type 1 and type 2 infections by peptide-derivatized dendrimers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 2011:3231-3239.
- Luganini, A., Giuliani, A., Pirri, G., Pizzuto, L., Landolfo, S., and Gribaudo, G. Peptide-derivatized dendrimers in-

hibit human cytomegalovirus infection by blocking virus binding to cell surface heparan sulfate. *Antiviral Res.* 85, 2010:532–540.

Luganini, A., Terlizzi, M.E., Catucci, G., Gilardi, G., Maffei, M.E., Gribaudo, G. The cranberry extract Oximacro® exerts in vitro virucidal activity against influenza virus by interfering with hemagglutinin. *Front. Microbiol.* 9, 2018:1826.

Maffei, M. *Vaccinium macrocarpon*. Caratterizzazione e quantificazione delle proantocianidine negli estratti di cranberry. *Naturali* 16(154), 2016:26-32.

McKimm-Breschkin, J. L. Management of influenza virus infections with neuraminidase inhibitors: detection, incidence, and implications of drug resistance. *Treat. Respir. Med.* 4, 2005:107–116.

Obiero, J., Mwethera, P.G., Wiysonge, C.S. Topical microbicides for prevention of sexually transmitted infections. *Cochrane Database Syst. Rev.* 6, 2012:1-93.

Occhipinti, A., Germano, A., and Maffei, M. E. Prevention of urinary tract infection with Oximacro®, a cranberry extract with a high content of A-type proanthocyanidins (PAC-A). A pre-clinical double-blind controlled study. *Urol. J.* 13, 2016:2640–2649.

Paules, C., Subbarao, K. Influenza. *Lancet* 390, 2017:697–708.

Sekizawa, H., Ikuta, K., Mizuta, K., Takechi, S., and Suzutani, T. Relationships between polyphenol content and anti-influenza viral effects of berries. *J. Sci. Food Agric.* 93, 2013:2239–2241.

Su, A., Amy, X., Howell, B., Doris, B., and D'Souza, H. The effect of cranberry juice and cranberry proanthocyanidins on the infectivity of human enteric viral surrogates. *Food Microbiol.* 27, 2010:535–540.

Suzuki, H., Saito, R., Masuda, H., Oshitani, H., Sato, M., and Sato, I. Emergence of amantadine-resistant influenza A viruses: epidemiological study. *J. Infect. Chemother.* 9, 2003:195–200.

Takashita, E., Fujisaki, S., Shirakura, M., Nakamura, K., Kishida, N., Kuwahara, T., et al. Influenza A (H1N1) pdm09 virus exhibiting enhanced crossresistance to oseltamivir and peramivir due to a dual H275Y/G147R substitution. *Euro Surveill.* 21, 2016:30258.

Terlizzi, M.E., Occhipinti, A., Luganini, A., Maffei, M.E., Gribaudo, G. Inhibition of herpes simplex type 1 and type 2 infections by Oximacro®, a cranberry extract with a high content of A-type proanthocyanidins (PACs-A). *Antiviral Res.* 132, 2016:154-164.

Van de Wakker, S. I., Fischer, M. J. E., and Oosting, R. S. New drug strategies to tackle viral-host interactions for the treatment of influenza virus infections. *Eur. J. Pharmacol.* 809, 2017:178–190.

**A. MINARDI & FIGLI S.R.L.**

Via Boncellino 32 - 48012 Bagnacavallo (Ra) - Tel. 0545 61460 - Fax 0545 60686

**DAL 1930 LAVORAZIONE E COMMERCIO PIANTE OFFICINALI**

www.minardierbe.it

info@minardierbe.it