

# **RIASSUNTI DELLE COMUNICAZIONI SCELTE**

# INDICE

<b>“Nuove evidenze nutraceutiche sul cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.): proprietà antiossidanti, neuroprotettive, chemopreventive ed anti-infiammatorie”</b> Jean Daniel Coïsson, Fabiano Travaglia, Monica Locatelli, Matteo Bordiga, Sandra Brunelleschi, Huawu Zeng, Aldo Martelli, <u>Marco Arlorio</u>	Pag. 3
<b>“Exploitation of bergamot oil in neuroprotection studies”</b> Giacinto <u>Bagetta</u> , Diana Amantea, Rossella Russo, Laura Rombolà, Luigi Morrone, Maria Tiziana Corasaniti	Pag. 4
<b>“Attività nutraceutica dei <math>\beta</math>-glucani: l’orzo come alimento funzionale”</b> <u>Serena Benedetti</u> , Franco Canestrai	Pag. 5
<b>“Red wine and oral health”</b> <u>Maria Daglia</u> , Adele Papetti, Monica Stauder, Caterina Signoretto, Dora Mascherpa, Pietro Canepari, Carla Pruzzo, Gabriella Gazzani	Pag. 6
<b>“Riso rosso fermentato: ottimizzazione di metodi estrattivi in UAE, MAE, ed analisi HPLC-DAD ed HPLC-MS”</b> <u>Stefano Dall’Acqua</u> , Gabbriella Innocenti	Pag. 7
<b>“Importanza alimentare e nutraceutica del tamarindo (<i>Tamarindus indica</i> L.)”</b> <u>Lydia Ferrara</u> , Daniele Naviglio	Pag. 8
<b>“Effetti dell’assunzione combinata di fibre e proteine vegetali in pazienti con ipercolesterolemia moderata”</b> <u>Michela Triolo</u> , Laura Calabresi, Raffaella Bosisio, Viviana De Vergori, Anna Arnoldi, Giuliana Mombelli, Franco Pazzucconi, Alighiero Bondioli, Cesare R. Sirtori	Pag. 9
<b>“Studio dell’incorporazione di n-3 PUFA nei microdomini di membrana”</b> <u>Paola A. Corsetto</u> , Patrizia V. Berselli, Manuela Negroni, Gigliola Montorfano, Bruno Berra e Angela M. Rizzo	Pag. 10
<b>“Studio dei potenziali meccanismi alla base dell’effetto ipolipemizzante delle proteine di pisello “</b> Elena Rigamonti, Cinzia Parolini, Marta Marchesi, Erika Diani, Stefano Brambilla, Cesare R. Sirtori, <u>Giulia Chiesa</u>	Pag. 11

## **NUOVE EVIDENZE NUTRACEUTICHE SUL CACAO (*Theobroma cacao* L.): PROPRIETÀ ANTIOSSIDANTI, NEUROPROTETTIVE, CHEMOPREVENTIVE ED ANTI-INFIAMMATORIE**

Jean Daniel Coïsson<sup>1</sup>, Fabiano Travaglia<sup>1</sup>, Monica Locatelli<sup>1</sup>, Matteo Bordiga<sup>1</sup>, Sandra Brunelleschi<sup>2</sup>, Huawu Zeng<sup>1,2</sup>, Aldo Martelli<sup>1</sup>, Marco Arlorio<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Chimiche, Alimentari, Farmaceutiche e Farmacologiche & DFB Center, via Bovio 6, 28100 Novara (Italy)

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Mediche, via Solaroli 17 – 28100 Novara, Italy

Il cacao (*Theobroma cacao* L.) desta grande interesse sotto il profilo nutraceutico, in relazione alle sue numerose bioattività collegate alla ricca composizione polifenolica. Acidi fenolici, antociani, procianidine e melanoidine derivanti dalle reazioni di Maillard costituiscono un gruppo diversificato di molecole, spesso correlate agli effetti positivi osservati in numerosi studi, sia *in vitro* che *in vivo*. Cacao e derivati sono oggi considerati alimenti caratterizzati da attività protettive sul sistema cardiovascolare, nonché da attività di chemoprevenzione nei confronti di diverse patologie, fra cui alcune tipologie di tumori.

In questa comunicazione, si riporteranno alcune nuove evidenze sviluppate a supporto di alcuni aspetti nutraceutico-alimentari del cacao, in particolare volte a confermare le attività antiossidanti e antiradicaliche della matrice, alcuni aspetti legati alla neuroprotezione ed alla chemoprevenzione da danno farmacologico nonché a supporto della sua attività anti-infiammatoria. Sono stati valutati i) estratti fenolici totali da cacao (fermentato crudo e tostato) e da suoi sottoprodotti (buccia), anche ottenuti mediante tecniche di estrazione non convenzionali (CO<sub>2</sub> supercritica) e ii) clovamide, un composto bioattivo minore del cacao, di indubbio significato nutraceutico.

Le proprietà antiossidanti degli estratti fenolici di cacao e della clovamide (sintetizzata ex-novo dopo essere stata identificata sia nel cacao crudo che torrefatto) sono state valutate mediante test radicalici (DPPH° test). E' stato quindi evidenziato un effetto di neuroprotezione sulle cellule SY-SY5Y (neuroblastoma umano) esposte a danno ischemico, in particolare per opera di estratti fenolici di buccia di cacao. Lo stesso effetto neuroprotettivo è stato in seguito dimostrato per clovamide. E' stato dimostrato che gli estratti polifenolici di cacao permettono di prevenire il danno cellulare indotto da Celecoxib in cellule epatiche MLP29. La morte cellulare, prevenuta dal cacao, ha mostrato tutte le tipiche riposte apoptotiche (picco sub G1 valutato in citofluorimetria, attivazione di Bax, down-regulation di Bcl2, rilascio di Citocromo C nel citosol, attivazione di Caspasi 3). L'effetto protettivo è probabilmente correlato all'induzione dell'autofagia, fatto confermato da una over-espressione di Beclin 1 e dall'accumulo di monodansilcadaverina negli autolisosomi. Infine, è stato possibile confermare alcuni nuovi aspetti concernenti le proprietà antiinfiammatorie di estratti di cacao e di clovamide, valutando il potenziale anti-infiammatorio ed antiossidante della clovamide nei monociti umani. E' stata verificata la capacità della clovamide di inibire la produzione di anione superossido, la liberazione di TNF-alfa (importante citochina pro-infiammatoria) e l'attivazione del fattore di trascrizione NF-kB nei monociti stimolati con forbolo miristato acetato (PMA). La clovamide inibisce la produzione di anione superossido (effetto massimo alla concentrazione di 10<sup>-8</sup> M), dimostrandosi più attiva dell'acido rosmarinico. Anche gli estratti del cacao inibiscono il "burst" respiratorio; il cacao crudo si è dimostrato significativamente più attivo di quello tostato. Gli estratti fenolici di cacao e la clovamide riducono significativamente la liberazione di TNF-alfa nei monociti stimolati con PMA: anche in questo caso, la clovamide si è dimostrata la molecola più attiva (circa 50% di inibizione alla concentrazione 10<sup>-8</sup> M). Inoltre la clovamide inibisce, in maniera dose-dipendente, l'attivazione del fattore di trascrizione NF-kB, con effetti simili a quelli evidenziati dall'acido rosmarinico. Anche i due estratti di cacao (10<sup>-7</sup> – 10<sup>-5</sup> M) si sono dimostrati in grado di inibire la traslocazione nucleare di NF-kB, confermando le proprietà antiinfiammatorie.

In conclusione, considerando questi nuovi studi, è possibile confermare numerose bioattività del cacao, confermando per questo tradizionale antico alimento nuove proprietà nutraceutiche.

## EXPLOITATION OF BERGAMOT OIL IN NEUROPROTECTION STUDIES

Giacinto Bagetta<sup>1</sup>, Diana Amantea<sup>1</sup>, Rossella Russo<sup>1</sup>, Laura Rombolà<sup>1</sup>, Luigi Morrone<sup>1</sup> and Maria Tiziana Corasaniti<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmacobiology and University Centre for Adaptive Disorders and Headache (UCADH), Section of Neuropharmacology of Normal and Pathological Neuronal Plasticity, University of Calabria, Arcavacata di Rende (CS) Italy;

<sup>2</sup> Department of Pharmacobiological Sciences, University Magna Graecia of Catanzaro, Catanzaro, Italy.

Bergamot (*Citrus bergamia* Risso et Poiteau) is a fruit growing almost exclusively in Calabria (Italy) whose essential oil (BEO) comprises a volatile fraction (93-96% of total) containing monoterpene and sesquiterpene hydrocarbons (such as limonene) and oxygenated derivatives (such as linalool) and a non-volatile fraction (4-7% of total) containing psoralens (such as 5-methoxypsoralen and 5-geranyloxypsoralen). BEO has been widely used in traditional food trade since centuries; in fact, the famous candy bergamotes Nancy, were invented in 1857 by a confectioner of the town of Lorraine and since 1830 the English Earl Gray began marketing tea flavored with BEO from Calabria, the Twinings Earl Gray Tea, still one of the most popular and appreciated tea.

Although evidence accounts for the use of BEO as traditional medicine for centuries (<http://www.bergamotoconsorzio.it>), reputed effective for anxiety, depression and, most recently in industrialized countries, in aromatherapy, there is very little verified scientific evidence to support this use. Recent behavioural and fast Fourier transformation analysis of EEG spectrum recorded from the hippocampus and cerebral cortex of rat demonstrate that BEO produces a dose-dependent sequence of sedation followed by increases in locomotor and exploratory activity correlating with a predominant increase in the energy of faster frequency bands of the EEG spectrum (Rombolà et al., 2009, *Functional Neurology*, 24, 107-112).

Under similar circumstances, neurochemical evidence demonstrate that, as yet unidentified, components of the volatile fraction of BEO transiently affect extracellular levels of neurotransmitter amino acids in the hippocampus of rat by interfering with mechanisms relevant to both synaptic plasticity and neurodegeneration (Morrone et al., 2007, *Pharmacol Res.*, 55: 255-262). According to the latter observation, it has been recently shown that both in vitro (Corasaniti et al., 2007, *Br. J. Pharmacol.* 151: 518–529) and in vivo (Amantea et al., 2009, *Int Rev Neurobiol.* 85: 389-405) paradigms BEO protects against excitotoxic injury. The underlying mechanism implicates minimization of abnormal excitatory amino acid efflux induced by permanent focal brain ischemia in the rat cortex and elevation of the active, phosphorylated, form of the pro-survival gene product Akt and of the phosphorylated, inactive, form of the death gene product GSK-3beta in the ischemic penumbra and in SH-SY5Y neuroblastoma cell cultures exposed to NMDA .

Altogether, these data provide the rational basis for further investigating the use of BEO as neuroprotectant under excitotoxic conditions in humans.

Financial support from the Ministry of University and Research (PRIN 2004055288\_1) and from Calabria Region (POR Calabria 2000–2006) to MTC is gratefully acknowledged.

# ATTIVITA' NUTRACEUTICA DEI BETA-GLUCANI: L'ORZO COME ALIMENTO FUNZIONALE

Serena Benedetti, Franco Canestrari

Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Sezione di Biochimica Clinica, Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo", via Ubaldini 7, 61029 Urbino, Italia.

L'orzo è un cereale ricco in beta-glucani, fibre solubili in grado di ridurre l'indice glicemico con effetti positivi sulla glicemia e sulla insulinemia postprandiale<sup>1</sup>. La riduzione della glicemia conduce a sua volta ad un minor accumulo di molecole ossidanti nel sangue dopo il pasto; infatti, l'aumento postprandiale dei livelli ematici di carboidrati porta ad uno stress biochimico, noto come stress ossidativo<sup>2</sup>, caratterizzato da un danno ossidativo a carico delle lipoproteine circolanti (LDL), con conseguente aumento del rischio aterosclerotico e cardiovascolare<sup>3</sup>. In questo contesto, l'impiego di alimenti a base d'orzo (come pane e prodotti da forno) potrebbe avere importanti effetti protettivi nei confronti di malattie degenerative caratterizzate da stress ossidativo e complicanze vascolari, come il diabete<sup>4</sup>.

Scopo di questo lavoro è stato proprio quello di valutare in pazienti diabetici l'effetto del consumo di pane all'orzo sulla glicemia postprandiale, monitorando allo stesso tempo lo stato ossidativo ed il profilo antiossidante plasmatico. A tal fine, sono stati arruolati nello studio 12 soggetti diabetici di tipo II aventi un valore di emoglobina glicata compreso tra 6 e 8%, ciascuno controllo di se stesso. Ogni soggetto ha assunto la mattina a digiuno, in 2 giorni diversi, un pasto standard costituito da: caffè (1), latte parzialmente scremato (150 ml) e pane comune bianco raffinato (60 g) il 1° giorno, e la stessa colazione ma con pane all'orzo, nella stessa quantità, il 2° giorno. Nei due giorni, da ciascun paziente sono stati effettuati prelievi di sangue sia a digiuno che dopo 1, 2 e 3 ore dal pasto. Come parametri metabolici sono stati dosati i livelli di glucosio e insulina; come marcatori di danno ossidativo, sono stati valutati i livelli plasmatici di malondialdeide (MDA, un sottoprodotto dell'ossidazione lipidica) e di AOPP (prodotti di ossidazione avanzata delle proteine plasmatiche). Per il monitoraggio dello stato antiossidante sono stati dosati i livelli plasmatici di vitamina E (alfa-tocoferolo), vitamina A (retinolo), carotenoidi (luteina, beta-carotene) e tioli totali.

I risultati evidenziano che il picco glicemico che si osserva a 60 minuti dopo il consumo di un pasto a base di carboidrati (pane bianco) è associato ad un aumento (+8/+9%) dei livelli plasmatici di sottoprodotti dell'ossidazione lipidica (MDA) e proteica (AOPP) con contemporanea riduzione (-5/-10%) dei livelli dei principali antiossidanti plasmatici quali tioli, vitamine A ed E, carotenoidi. Il quadro biochimico si modifica sensibilmente dopo il consumo di un pasto a base di pane all'orzo: sotto il profilo metabolico, dopo 60 minuti dal pasto si registra un minor picco glicemico (-10%) e insulinemico (-36%) rispetto a quanto osservato con il pane bianco; in secondo luogo, non si evidenzia nel plasma un accumulo di prodotti dell'ossidazione lipidica e proteica, al contrario i livelli di MDA e AOPP si riducono, rispettivamente del 13-20%, rispetto al corrispondente valore pre-pasto. Inoltre, il sistema antiossidante plasmatico viene preservato e, a 60 minuti, non si osservano riduzioni significative dei livelli delle molecole antiossidanti circolanti, sia idrosolubili che liposolubili.

In conclusione, grazie al contenuto in beta-glucani, il pane all'orzo può considerarsi un cibo funzionale che può portare benefici nel contrastare le complicanze diabetiche soprattutto a livello cardiovascolare. Tenuto conto che il pane è un alimento base della nostra dieta di cui si fa largo uso, l'assunzione regolare di pane all'orzo e di altri prodotti similari sarebbe auspicabile.

## Bibliografia

1. Casiraghi, MC et al. *J Am Coll Nutr.* **2006**, 25:313-320.
2. Ursini, F et al. *Biol Chem.* **2002**, 383:599-605.
3. Bowen, PE et al. *Curr Atheroscler Rep.* **2004**, 6:477-484.
4. Dierckx, N et al. *Eur J Clin Nutr.* **2003**, 57 :999-1008.

## RED WINE AND ORAL HEALTH

Maria Daglia<sup>1</sup>, Adele Papetti<sup>1</sup>, Monica Stauder<sup>2</sup>, Caterina Signoretto<sup>3</sup>, Dora Mascherpa<sup>1</sup>, Pietro Canepari<sup>3</sup>, Carla Pruzzo<sup>4</sup>, Gabriella Gazzani<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Pavia University, Via Taramelli 12, 27100 Pavia, Italy

<sup>2</sup> Istituto di Microbiologia e Scienze Biomediche, Marche Polytechnic University, 60020, Ancona, Italy

<sup>3</sup> Dipartimento di Patologia, Sezione di Microbiologia, Verona University, Strada Le Grazie 8, 37134 Verona, Italy

<sup>4</sup> DIBIO, Genova University, Corso Europa 26, 16123 Genova, Italy

Dental caries, together with gingivitis, is one of the most prevalent infectious diseases of humans and is due to the accumulation of dental plaque (a biofilm produced by oral bacteria) on the tooth surface. Caries can be prevented with daily prophylactic measures that allowed to remove dental plaque, however such measures are often not correctly applied. Consequently, professional treatment is often required to remove or restore teeth affected by caries and this places a great burden on health care budgets, so that in 2000, the cost of oral healthcare in the European Union was approximately EUR 54 billion. Over the past three decades several studies have described the anticaries effect of foods and beverages, such as coffee, tea, cranberry juice<sup>1-3</sup>, whose consumption could help to maintain oral health. Our in progress research activities are focused on wine.

The health benefits of moderate wine consumption are well documented, and have been associated with increased longevity and a diminished risk of cardiovascular and neurological diseases<sup>4</sup>. The protective effects of wine may be related to the combined effects of ethanol and non-alcoholic components, above all polyphenols, that are associated with beneficial physiologic effects, such as free radical scavenging, intracellular metal chelation, inhibition of transcription factors, and enzyme modulation ability<sup>5-6</sup>.

The present study was undertaken 1) to explore the antibacterial activity of red wine against several strains of oral streptococci responsible for dental plaque formation and caries development, 2) to study the effect of the beverage on *S. mutans* adhesion to and detachment from hydroxyapatite (HA) beads and 3) to evaluate the *in vitro* and *ex vivo* inhibition of biofilm formation. The results showed that red wine exerts *in vitro* antibacterial activity against the tested pathogenic oral streptococci and induces postcontact effects against *S. mutans*. Succinic, malic, lactic, tartaric, citric, and acetic acid, which are found in grapes or are produced during malolactic fermentation, all exhibited antibacterial and postcontact activities and can therefore be collectively considered responsible for documented red wine antibacterial activity. Moreover, red wine strongly interferes with *S. mutans* adhesion to substrates such as HA beads, natural human teeth and plastic, promotes its detachment from HA, and powerfully inhibits *in vitro* biofilm formation revealable *ex vivo* by rare bacterial microcolonies.

In conclusion, our data indicates that protection of the oral cavity from the cariogenic action of *S. mutans* may be another beneficial effect of the moderate consumption of red wine.

### Bibliografia

1. Yamanaka, A et al. *J Periodontal Res.* **2007**, 42:589-592.
2. Daglia, M et al. *J Agric Food Chem.* **2002**, 50:1225- 1229.
3. Okamoto, M et al. *Oral Microbiol Immunol.* **2008**, 19:118-120.
4. Saremi, A et al. *Am J Ther.* **2008**, 15, 265-277.
5. Rodrigo, R et al. *Comp Biochem Physiol, Part C.* **2006**, 142:317-327.
6. Singh, M et al. *J Agric Food Chem.* **2008**, 56:4855-4873.

## RISO ROSSO FERMENTATO: OTTIMIZZAZIONE DI METODI ESTRATTIVI IN UAE, MAE ED ANALISI HPLC-DAD ED HPLC-MS

Stefano Dall'Acqua, Gabriella Innocenti

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche Università degli Studi di Padova, via Marzolo 5, 35131 Padova.

Vi è un'alta incidenza, nei paesi occidentali, di soggetti con livelli di colesterolo sierico elevato. Tale condizione è considerata rischiosa nei confronti di patologie cardiovascolari. La dieta rappresenta il punto di partenza per il trattamento di una elevata colesterolemia e risulta spesso efficace soprattutto se associata ad esercizio fisico, a limitazione del consumo di alcolici e al controllo di altri fattori di rischio quali fumo, ipertensione o diabete. Oltre ad aspetti di nutrizione ci possono essere interventi di tipo farmacologico con specialità medicinali. I farmaci più utilizzati sono le statine, una famiglia di composti sviluppati da una molecola di origine naturale, la mevinolina, prodotta da alcuni ceppi di *Monascus*. Una alternativa è l'utilizzo di integratori alimentari con sostanze note per i loro effetti sul colesterolo.

Il Riso Rosso fermentato (RYR) è un esempio di cibo tradizionale diffuso, con qualche variante, in tutta l'Asia. Nella Medicina Tradizionale Cinese esso era consigliato per la sua capacità di "migliorare la digestione e la circolazione del sangue". Si tratta di riso fermentato con ceppi di miceti del genere *Monascus* (e.s. *M. purpureus*), la particolare pigmentazione dei microorganismi rende il prodotto finale colorato in rosso<sup>1</sup>. Durante la fermentazione il riso si arricchisce di un gruppo di sostanze, denominate monacoline, a cui è stata scientificamente attribuita una spiccata attività ipocolesterolemizzante. Tra queste, spicca la monacolina K, che rispecchia la struttura chimica e l'azione farmacologica della lovastatina (un farmaco appartenente alla categoria delle statine)<sup>2,3,4</sup>.

Nel mercato degli integratori sono presenti diversi prodotti. Attualmente l'impiego di RYR è ammesso nella produzione di integratori alimentari, a patto che la concentrazione di monacolina K sia inferiore ai 3 mg/dose. Nonostante l'ampia diffusione sul mercato nutraceutico di prodotti a base di riso rosso fermentato, ad oggi non è presente un protocollo estrattivo unitario per l'analisi di questi prodotti, diversi sono infatti i solventi e le metodologie proposte in vari lavori pubblicati<sup>1,3,5</sup>.

In questo lavoro sono stati validati due protocolli per l'estrazione degli attivi, impiegando due differenti tecniche, le microonde (MAE) e gli ultrasuoni (UAE); gli estratti ottenuti sono stati analizzati via HPLC-DAD. Entrambi i protocolli permettono un recupero dei metaboliti di interesse molto vicino al 100% con procedure semplici e rapide rispetto ai metodi precedentemente pubblicati<sup>1,3,5</sup>.

Sono state analizzate differenti materie prime utilizzate per la realizzazione di prodotti presenti sul mercato. Alcuni campioni sono stati analizzati mediante HPLC-MS/MS per l'identificazione delle differenti monacoline presenti. In tutti i prodotti considerati il composto prevalente risulta essere monacolina K. Alcuni fra i campioni analizzati presentano titoli difformi da quanto indicato nelle specifiche tecniche, alcuni in difetto altri in eccesso. Oltre all'analisi del contenuto in attivi viene proposto un metodo in HPLC-MS per il controllo del contenuto in citrinina, pigmento tossico, normato per i prodotti a base di RYR nel mercato giapponese a 200 ppb come massimo livello. In nessuno dei prodotti analizzati citrinina risulta rilevabile.

### Bibliografia

1. Ma, J et al. *J Agric Food Chem.* **2000**, 48:5220-5225.
2. Li, Y et al. *J Pharm Biomed Anal.* **2004**, 35:1101-1112.
3. Li, Y et al. *J Pharm Biomed Anal.* **2005**, 39:82-90.
4. Lin, C et al. *Eur J Endocr.* **2005**, 153:679-686.
5. Huang, H et al. *Chem Pharm Bull.* **2006**, 54:687-689.

# IMPORTANZA ALIMENTARE E NUTRACEUTICA DEL TAMARINDO (TAMARINDUS INDICA L.)

Lydia Ferrara<sup>1</sup>, Daniele Naviglio<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Chimica Farmaceutica e Tossicologia, Facoltà di Farmacia, Università di Napoli “Federico II”, Via Domenico Montesano 49, 80131 Napoli

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienza degli Alimenti, Facoltà di Agraria, Università di Napoli “Federico II”, Via Università 100, 80555 Portici

I vegetali di natura diversa dai cereali costituiscono alimenti importanti per le popolazioni africane ed in modo significativo entrano nella loro dieta giornaliera soprattutto durante i periodi di carestia del grano. Tali popolazioni hanno scoperto non solo il valore nutrizionale dei diversi vegetali e frutta locali, ma anche il potere terapeutico, per cui molte specie sono utilizzate nella medicina popolare con risultati positivi. La polpa del frutto del tamarindo viene usata nell'industria farmaceutica per la sua azione di blando lassativo; sotto forma di estratto o di sciroppo viene utilizzato nell'industria alimentare per la preparazione di bibite dissetanti. L'estratto della polpa del frutto contiene zuccheri, protidi, acidi organici ed un olio essenziale. La buccia dei semi del frutto contiene polifenoli, principalmente proantocianidine in varie forme: epicatechina, procianidine oligomeriche, taxifolina, apigenina, eriodictyolo, luteolina e naringina, che mostrano una potente azione antiossidante riducendo in vitro la perossidazione dei lipidi ed attività antimicrobica.

Nei semi è stata identificata una sostanza di natura polisaccaridica che forma un gel e viene utilizzata come stabilizzante in gelati, maionese, formaggio ed anche in alcune preparazioni farmaceutiche. A differenza della pectina della frutta tale polisaccaride gelifica in ampio intervallo di pH e non subisce alterazione in seguito a prolungata ebollizione delle soluzioni.

I semi decorticati e tostati hanno un sapore simile alle arachidi: possono essere mangiati tal quale o ridotti in farina per la preparazione di pane e focacce; sono utilizzati inoltre come sostituto del caffè. Dai semi si estrae un olio privo di odore e di sapore dolce usato sia nell'alimentazione che nell'industria delle vernici o per illuminazione.

I semi del tamarindo hanno una composizione favorevole di proteine ed amminoacidi, in particolare metionina e cisteina, per cui potrebbero essere utilizzati come fonte economica di proteine per alleviare la malnutrizione proteica diffusa in molti paesi in via di sviluppo.

Considerando l'importanza dei semi nell'alimentazione, abbiamo analizzato la frazione lipidica ottenuta dopo estrazione con cloroformio in apparecchio di Soxhlet. I semi di tamarindo provenienti da una varietà indiana sono stati finemente triturati ed estratti con solvente; dopo allontanamento del solvente, il residuo dopo reazione di metilazione è stato analizzato mediante gascromatografia capillare. L'identificazione dei trigliceridi e degli acidi grassi è stata eseguita utilizzando campioni standard di riferimento.

Gli usi medicinali del tamarindo sono numerosi: la polpa è considerata un efficace digestivo e rimedio per i disturbi biliari; viene applicata in forma di cataplasmo contro le infiammazioni o come pomata per i reumatismi; è usata nei gargarismi per le infiammazioni della gola. Le foglie ed i fiori sono bolliti ed utilizzati come impacchi per le articolazioni gonfie, distorsioni e bolle; lozioni ed estratti sono utilizzate nel trattamento delle congiuntiviti; essi sono, inoltre, antisettici, vermifughi e sono usati per il trattamento della dissenteria. La corteccia degli alberi è considerata un efficace astringente, tonico e febbrifugo.

## Bibliografia

1. Sudjaroen, Y et al. *Food Chem Toxicol.* **2005**, 43:1673-82.
2. Kumar, CS et al. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **2008**, 48:1-20. Review
3. Sreelekha, TT et al. *Anticancer Drugs.* **1993**, 4:209-12.
4. Savur, GR et al. *J Biol Chem.* **1948**, 172:501-9.

## **EFFETTI DELL'ASSUNZIONE COMBINATA DI FIBRE E PROTEINE VEGETALI IN PAZIENTI CON IPERCOLESTEROLEMIA MODERATA**

Michela Triolo<sup>1</sup>, Laura Calabresi<sup>1</sup>, Raffaella Bosisio<sup>1</sup>, Viviana De Vergori<sup>1</sup>, Anna Arnoldi<sup>2</sup>, Giuliana Mombelli<sup>1</sup>, Franco Pazzucconi<sup>1</sup>, Alighiero Bondioli<sup>1</sup>, Cesare R. Sirtori<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro Universitario per le Dislipidemie, Ospedale Niguarda Ca' Granda, piazza Ospedale Maggiore 3, 20133 Milano, Italia

<sup>2</sup> Dipartimento di Endocrinologia Fisiopatologia e Biologia Applicata, Laboratorio di Chimica degli Alimenti e Spettrometria di Massa, Università degli Studi di Milano, via Balzaretti 9, 20133 Milano, Italia

La gestione dei pazienti con ipercolesterolemia moderata in prevenzione primaria pone notevoli interrogativi sull'effettiva necessità di una terapia farmacologica, principalmente con statine, non scevra da effetti collaterali. Obiettivo del presente studio è la valutazione dell'efficacia di specifici supplementi dietetici, in particolare barrette alimentari contenenti differenti combinazioni di proteine vegetali e fibre solubili, come valida alternativa al trattamento farmacologico in pazienti a basso rischio. In tal modo sono state testate due differenti proteine vegetali, la proteina di lupino, già nota per gli effetti ipolipemizzanti, e la proteina di pisello, di cui non si hanno ancora sufficienti dati clinici. Le due proteine, confrontate con una proteina animale (caseina), sono state differenziate combinate con una fibra presumibilmente inattiva (cellulosa) e con fibre verosimilmente efficaci sul profilo lipidico, quali fibra d'avena e pectina di mela. Centosettantacinque pazienti con livelli di TC > 220 mg/dl in prevenzione primaria sono stati suddivisi in 7 gruppi di trattamento, a ciascuno dei quali è stata somministrata una particolare tipologia di barretta. Il trial clinico, randomizzato, in doppio cieco, ha avuto una durata complessiva di 8 settimane comprendenti un'iniziale fase di run-in di 4 settimane. Si sono osservate riduzioni statisticamente significative nei livelli plasmatici di TC, nel gruppo trattato con proteina di lupino e cellulosa (-11.6 mg/dl) e ancor più in quello trattato con proteina di pisello associata a fibra d'avena (-13.8 mg/dl); quest'ultima combinazione si è dimostrata particolarmente efficace anche sulla riduzione dei livelli di LDL-C (-11.8 mg/dl). Le variazioni di HDL-C e TG sono risultate di minimo impatto. Nel corso dello studio sono stati valutati anche parametri metabolici (glucosio, insulina ed adiponectina) e infiammatori (sICAM-1, CRP e IL-6), che non hanno comunque subito sostanziali modifiche.

### **Bibliografia**

1. Mathè, D et al. *J Nutr.* **1977**, 107:466-74.
2. Geleva, D et al. *J Nutr.* **2003**, 133:2194-203.
3. Aprikian, O et al. *J Nutr.* **2003**, 133:1860-5.
4. Schwandt, P et al. *Atherosclerosis.* **1982**, 44:379-83.
5. Spiller, RC *Pharmacol Ther.* **1994**, 62:407-27.
6. Mortensen, LS et al. *Am J Clin Nutr.* **2009**, 90:41-8.

## STUDIO DELL'INCORPORAZIONE DI N-3 PUFA NEI MICRODOMINI DI MEMBRANA

Paola A. Corsetto, Patrizia V. Berselli, Manuela Negroni, Gigliola Montorfano, Bruno Berra e Angela M. Rizzo.

Dipartimento di Scienze Molecolari Applicate ai Biosistemi, Università degli Studi di Milano, via Trentacoste 2, 20134 Milano, Italia

Studi in vitro e in vivo suggeriscono che l'assunzione di acidi grassi poliinsaturi a lunga catena n-3 (LCPUFA) oltre ad avere effetti favorevoli sul benessere psico-fisico, contribuisce alla prevenzione di svariate patologie cronico-degenerative<sup>1</sup>. Il meccanismo con il quale agiscono questi acidi grassi non è stato ancora del tutto chiarito. E' stato ipotizzato che gli n-3 PUFA, una volta incorporati nei fosfolipidi della membrana plasmatica influenzino l'architettura e la funzionalità di quest'ultima<sup>2</sup>.

Ad oggi, il modello della membrana plasmatica non può esulare dal concetto della presenza di "raft lipidici". I raft lipidici costituiscono microdomini liquido-ordinati ricchi principalmente in sfingolipidi, colesterolo e fosfolipidi saturi strettamente impaccati circondati da una fase liquido-disordinata. I raft lipidici fungono da piattaforma per l'ancoraggio di numerose proteine deputate alla trasduzione del segnale, incluse la famiglia delle chinasi Src, e sono coinvolti nel traffico intracellulare, ingresso di patogeni e organizzazione del citoscheletro<sup>3</sup>.

Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare l'incorporazione degli acidi grassi poliinsaturi n-3 nei raft lipidici, e gli effetti indotti da questo arricchimento.

I modelli sperimentali utilizzati sono state le linee cellulari MDA-MB-231(ER-) e MCF-7 (ER+), entrambe ottenute da adenocarcinoma mammario umano. Da studi di vitalità cellulare (MTT) e dell'espressione di marker apoptotici (Bcl-2 e Caspase8) è risultato che l'incorporazione di EPA (acido eicosapentaenoico) e DHA (acido docosaesaenoico) riduce la proliferazione cellulare e induce il processo apoptotico in entrambe le linee cellulari. I risultati ottenuti mediante analisi in HPLC/GC hanno evidenziato che sia l'EPA che il DHA sono incorporati nei raft lipidici, in maniera fosfolipide-specifica, e in parte immediatamente metabolizzati. Infatti EPA è convertito in DPA e, in tracce, anche in DHA, mentre il DHA è retroconvertito in EPA. L'analisi del contenuto di colesterolo mediante HPTLC nei raft lipidici ha mostrato una riduzione del suo contenuto, in seguito al trattamento con DHA, in entrambe le linee cellulari. In base ai dati ottenuti abbiamo ipotizzato che la riduzione della concentrazione di colesterolo e l'aumento del grado di insaturazione nei raft potrebbero alterare la trasduzione del segnale. Una prima analisi dell'espressione di EGFR e della sua forma fosforilata attiva (p-EGFR) nelle cellule MDA-MB-231 ha evidenziato che EPA e DHA riducono i livelli di p-EGFR, e che DHA riduce, anche se in minima parte, i livelli di EGFR.

Sono in corso nel nostro laboratorio ulteriori ricerche per confermare questi dati e validare le nostre ipotesi di lavoro.

### Bibliografia

1. Fetterman, JW et al. *Am J Health Syst Pharm.* **2009**, 66:1169-79.
2. Jump, DB. *J Biol Chem.* **2002**, 277: 8755-8758.
3. Stillwell, W. *Curr Org Chem.* **2000**, 4:1169-1183

## STUDIO DEI POTENZIALI MECCANISMI ALLA BASE DELL'EFFETTO IPOLIPEMIZZANTE DELLE PROTEINE DI PISELLO

Elena Rigamonti, Cinzia Parolini, Marta Marchesi, Erika Diani, Stefano Brambilla, Cesare R. Sirtori, Giulia Chiesa

Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Laboratorio per lo studio dell'arteriosclerosi, Università degli Studi di Milano, via Balzaretti 9, 20133 Milano, Italia

L'effetto ipolipemizzante di diete contenenti proteine di pisello è stato oggetto di numerosi studi che non sempre hanno fornito risultati concordanti. Inoltre, i meccanismi alla base del potenziale effetto ipolipemizzante di questa componente dietetica non sono stati ancora chiariti. Scopo dello studio è stato quello di valutare, in un modello animale, la potenziale efficacia di un isolato proteico di pisello nel modulare i livelli dei lipidi plasmatici e di determinare se le proteine di pisello potessero esercitare un impatto sul metabolismo lipidico in sede epatica, attraverso la regolazione di geni coinvolti nell'omeostasi del colesterolo e degli acidi grassi.

Lo studio è stato condotto in ratti maschi Sprague Dawley, alimentati *ad libitum*, per 28 giorni con una dieta ricca in acidi grassi saturi e colesterolo nella quale la fonte proteica era caseina (gruppo controllo) o un isolato proteico di pisello (*Pisum sativum*). I livelli lipidici plasmatici sono stati misurati prima del trattamento dietetico, dopo 14 giorni e dopo 28 giorni di trattamento dietetico. Sia a 14 giorni che a 28 giorni di trattamento, i livelli plasmatici di colesterolo e trigliceridi sono risultati significativamente più bassi nel gruppo alimentato con proteine di pisello rispetto al gruppo alimentato con caseina ( $p < 0,05$ ). Queste evidenze hanno quindi avvalorato l'ipotesi che un isolato proteico di pisello possa esercitare un effetto benefico sui livelli lipidici circolanti. Sulla base di questi risultati, è stata indagata, mediante real-time RT-PCR, l'eventuale influenza del trattamento dietetico contenente proteine di pisello sull'espressione epatica dei principali geni coinvolti nel metabolismo del colesterolo. In particolare sono stati presi in esame la sterol regulatory element-binding protein-2 o SREBP-2 e i suoi geni bersaglio quali HMG-CoA reduttasi e il recettore per le LDL, oltre alla 7alfa-idrossilasi (CYP7A1). I risultati hanno evidenziato livelli epatici di mRNA del recettore LDL significativamente più elevati nei ratti alimentati con proteine di pisello rispetto ai ratti alimentati con caseina ( $p < 0,05$ ). Infine, per individuare potenziali meccanismi attraverso i quali le proteine di pisello potessero esercitare un effetto ipotrigliceridemizzante, è stata valutata l'espressione genica di SREBP-1c e dei suoi geni bersaglio coinvolti nella biosintesi degli acidi grassi, quali la glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PDH), la acido grasso sintasi (FAS), le steroil-CoA desaturasi 1 e 2 (SDC-1, SDC-2) e la acyl-CoA:glycerolo-3-fosfato aciltransferasi (GPAT). La concentrazione epatica di mRNA di FAS, SCD-1 e SCD-2 è risultata significativamente ridotta nei ratti alimentati con proteine di pisello rispetto ai ratti alimentati con caseina ( $p < 0,05$ ).

In conclusione, lo studio ha dimostrato, in un modello animale, che le proteine di pisello sono in grado di esercitare una marcata attività ipocolesterolemizzante e ipotrigliceridemizzante. Inoltre, il trattamento dietetico con proteine di pisello è risultato influenzare l'omeostasi lipidica epatica, aumentando l'espressione di geni coinvolti nella captazione di colesterolo e riducendo l'espressione di geni coinvolti nella sintesi degli acidi grassi.