

# **RIASSUNTI DEI POSTER**

# **INDICE**

<p><b>“Valutazione dell’azione antiossidante ed anti-infiammatoria del cacao (<i>Theobroma cacao L.</i>) e di clovamide in monociti umani”</b></p> <p>Huawu Zeng, Sandra Brunelleschi, Jean Daniel Coïsson, Fabiano Travaglia, Monica Locatelli, Aldo Martelli, <u>Marco Arlorio</u></p>	Pag. 5
<p><b>“Proprietà antiossidanti e contenuto proantocianidinico della cuticola di Nocciola Piemonte IGP”</b></p> <p><u>Monica Locatelli</u>, Fabiano Travaglia, Jean Daniel Coïsson, Matteo Bordiga, Aldo Martelli, Marco Arlorio</p>	Pag. 6
<p><b>“Messa a punto di un metodo HPLC per la valutazione dell’attività ACE-inibitoria di proteine vegetali”</b></p> <p><u>Giovanna Boschin</u>, Elena Sirtori, Graziana Scigliuolo, Donatella Resta, Anna Arnoldi</p>	Pag. 7
<p><b>“Approcci proteomici integrati per lo studio e la caratterizzazione delle proteine di lupino: una nuova risorsa per alimenti funzionali innovativi”</b></p> <p><u>Elena Sirtori</u>, Donatella Resta, Francesca Brambilla, Anna Arnoldi</p>	Pag. 8
<p><b>“Sviluppo di un metodo in HPLC-MS per la quantificazione di proteine bioattive di lupino in miscele proteiche complesse”</b></p> <p><u>Donatella Resta</u>, Francesca Brambilla, Marco Zanotti, Anna Arnoldi</p>	Pag. 9
<p><b>“Proteomica “shotgun” per l’analisi differenziale delle proteine bioattive di lupino”</b></p> <p>Donatella Resta, Francesca Brambilla, Marco Zanotti, <u>Anna Arnoldi</u></p>	Pag. 10
<p><b>“I legumi come fonte di tocoferoli”</b></p> <p><u>Giovanna Boschin</u>, Donatella Resta, Anna Arnoldi</p>	Pag. 11
<p><b>“Caratterizzazione dei componenti minori con potenziale attività nutraceutica della manna estratta da <i>Fraxinus excelsior</i>”</b></p> <p>Renato Bruni, <u>Augusta Caligiani</u>, Martina Cirlini, Gerardo Palla</p>	Pag. 12

<p><b>“Effetto di un nutraceutico combinato (Armoprev ®) sulla pressione arteriosa e sul rischio CV stimato in pazienti ipertesi e dislipidemici in monoterapia con ACE-inibitori (ACE-I) o calcio antagonisti (CCB)”</b></p> <p><u>Arrigo FG Cicero</u>, Beatrice Gerocarni, Ivo Setnikar, Claudio Benvenuti, Lucio Rovati</p>	Pag. 13
<p><b>“Efficacia antipertensiva dei lactotripeptidi VPP e IPP: una meta-analisi dei trials clinici disponibili”</b></p> <p><u>Arrigo FG Cicero</u>, Beatrice Gerocarni, Fabrizio Imola, Francesca Santi, Claudio Borghi</p>	Pag. 14
<p><b>“Effetti emodinamici di lactotripeptidi derivati idrolisati di caseina in soggetti normotesi e con pressione normale-alta: uno studio clinico in doppio cieco, randomizzato, con disegno cross-over”</b></p> <p><u>Arrigo FG Cicero</u>, Martina Rosticci, Maddalena Veronesi, Stefano Bacchelli, Enrico Strocchi, Camilla Melegari, Elisa Grandi, Claudio Borghi</p>	Pag. 15
<p><b>“Analisi quali-quantitativa dei metaboliti secondari presenti nei frutti di gelso (<i>Morus nigra</i>) coltivato in Sicilia”</b></p> <p><u>Stefano Dall’Acqua</u>, Patrizia Penzo, Gabriella Innocenti</p>	Pag. 16
<p><b>“Single oral dose of a nutraceutical formula (N-oleyl-phosphatidylethanolamine and epigallocatechin-3-gallate) inhibits hunger sensation in healthy volunteers”</b></p> <p><u>Enzo Grossi</u>, Giovanni Rivolta</p>	Pag. 17
<p><b>“Sovrappeso e obesita’: analisi degli indicatori principali atti a evidenziare fonti di rischio per la salute”</b></p> <p><u>Chiara Lisi</u>, Lisa Buzzoni, Viviana Avallone.</p>	Pag. 18
<p><b>“Caratterizzazione della composizione chimica dell’integratore alimentare “CATEG®”</b></p> <p>Davide Resnati, Elena Santucci, Fabrizio Ferrarini, <u>Sheila Morandi</u></p>	Pag. 19
<p><b>“Phenolic compounds in <i>Cichorium endivia</i> vegetables”</b></p> <p><u>Adele Papetti</u>, Maria Daglia, Dora Mascherpa, Gabriella Gazzani</p>	Pag. 20

<p><b>“Costituenti della dieta mediterranea: quantificazione delle soiasaponine I e <math>\beta</math>g in campioni di lenticchie italiane”</b></p> <p><u>Sauro Vittori</u>, Giovanni Caprioli, Gloria Cristalli, Dario Giardinà, Filippo Maggi, Laura Molin, Massimo Ricciutelli, Gianni Sagratini, Piero Traldi, Yanting Zuo</p>	<p>Pag. 21</p>
<p><b>“Effetti dei fitosteroli vs fitosteroli + psyllium sui parametri lipidici in pazienti dislipidemici in prevenzione primaria trattati per 1 anno”</b></p> <p><u>Giuliana Mombelli</u>, Stefania Frasson, Raffaella Bosisio, Cesare R. Sirtori</p>	<p>Pag. 22</p>
<p><b>“L’impregnazione sotto vuoto come tecnica di funzionalizzazione della frutta: studio sulle mele cotogne”</b></p> <p><u>Patrizia Comandini</u>, Mayra Cristina Soto Caballero, Hugo Mujica-Paz, Aurora Valdez Fragoso, Giampaolo Blanda e Tullia Gallina Toschi</p>	<p>Pag. 23</p>

## VALUTAZIONE DELL'AZIONE ANTIOSSIDANTE ED ANTI-INFIAMMATORIA DEL CACAO (*Theobroma cacao* L.) E DI CLOVAMIDE IN MONOCITI UMANI

Huawu Zeng<sup>1,2</sup>, Sandra Brunelleschi<sup>2</sup>, Jean Daniel Coïsson<sup>1</sup>, Fabiano Travaglia<sup>1</sup>, Monica Locatelli<sup>1</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

Numerose evidenze riportano per il cacao (ed i suoi derivati, in particolare il cioccolato amaro fondente) attività antiossidanti ed antiinfiammatorie<sup>1</sup>. Seppure alcune evidenze provino le proprietà funzionali degli estratti fenolici del cacao<sup>2</sup>, così pure come di composti fenolici in traccia quali clovamide<sup>2,3</sup>, non è mai stato investigato l'effetto antiinfiammatorio a livello molecolare su un sistema ex-vivo di monociti umani, una popolazione cellulare che svolge un ruolo chiave in molte condizioni patologiche, prima fra tutte l'aterosclerosi. In questo studio è stato possibile confermare alcuni nuovi aspetti concernenti le proprietà antiinfiammatorie di estratti di cacao e di clovamide.

E' stata verificata la capacità della clovamide di inibire la produzione di anione superossido nei monociti, la liberazione di TNF-alfa (importante citochina pro-infiammatoria, il cui ruolo in numerose patologie acute e croniche è assai ben documentato) e l'attivazione del fattore di trascrizione NF-kB nei monociti stimolati con forbole miristato acetato (PMA).

Nell'intervallo di concentrazione  $10^{-10}$ – $10^{-6}$  M, la clovamide inibisce, con un effetto massimo alla concentrazione di  $10^{-8}$  M (circa 70% di inibizione) la produzione di anione superossido, dimostrandosi significativamente più attiva dell'acido rosmarinico (altro noto antiossidante strettamente correlato a clovamide sotto il punto di vista molecolare). Anche gli estratti del cacao, alla concentrazione di  $10^{-6}$  M, inibiscono (40- 45% di inibizione) il "burst" respiratorio; gli estratti di cacao fermentato crudo si sono dimostrati significativamente più attivi di quelli ottenuti da cacao tostato. Estratti fenolici e 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 di  $10^{-8}$  M). Inoltre, la clovamide ( $10^{-9}$  –  $10^{-6}$  M) 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 del cacao ( $10^{-7}$  –  $10^{-5}$  M) si sono dimostrati in grado di inibire la traslocazione nucleare di NF-kB confermando le proprietà antiinfiammatorie.

Secondo i dati ottenuti in questi nuovi studi, è possibile confermare una significativa proprietà antiinfiammatoria della frazione polifenolica del cacao e della clovamide, suggerendo nuove possibilità di utilizzo di cacao e derivati come fonte di ingredienti funzionali per integratori alimentari ed aprendo nuove prospettive sotto il profilo nutraceutico.

### Bibliografia

1. Selmi, C. et al. *J Cardiovasc Pharmacol*, **2006**, *47*, Supplement 2, S163-S171.
2. Arlorio, M. et al. *Food Chem*, **2008**, *106*, 967-975.
3. Arlorio, M. et al. *J Agric Food Chem*, **2009**, *57*, 10612-10618.

# PROPRIETÀ ANTIOSSIDANTI E CONTENUTO PROANTOCIANIDINICO DELLA CUTICOLA DI NOCCIOLA PIEMONTE IGP

Monica Locatelli, Fabiano Travaglia, Jean Daniel Coïsson, Matteo Bordiga, Aldo Martelli, Marco Arlorio

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

I composti polifenolici sono ampiamente distribuiti nel regno vegetale e sono ormai diventati parte integrante della dieta umana, essendo ormai da tutti considerati come nutrienti in grado di prevenire i disturbi correlati allo stress ossidativo. Numerose prove cliniche e vari studi epidemiologici hanno infatti permesso di dimostrare come gli antiossidanti provenienti dalla dieta, tra i quali anche i composti polifenolici, siano in grado di contrastare o prevenire l'insorgenza di una serie di patologie quali stati infiammatori, malattie cardiovascolari, cancro e tutti quei disturbi legati ai fenomeni dell'invecchiamento<sup>1</sup>. Tra i polifenoli, la classe delle proantocianidine è ampiamente rappresentata in numerosi alimenti e bevande, quali ad esempio uva, vino, tè, cacao e frutta a guscio. Considerando la frutta a guscio, la nocciola è risultata la più ricca in proantocianidine totali e polimeri oltre i decameri; nelle nocciole sono state determinate prevalentemente strutture di tipo procianidinico, ma anche prodelfinidine come componenti minori<sup>2</sup>. Anche il perisperma di nocciola (sottile cuticola di colore bruno che si stacca dal seme dopo tostatura) è risultato ricco in procianidine (prevalentemente di tipo B)<sup>3</sup> e caratterizzato da elevate proprietà antiossidanti<sup>4</sup>.

In questo lavoro è stata caratterizzata la frazione polifenolica della cuticola di Nocciola Piemonte IGP, considerando in particolare l'influenza del diverso grado di tostatura (media e forte) sulle sue proprietà antiossidanti e sul contenuto proantocianidinico. Sono stati impiegati diversi solventi di estrazione e diversi approcci (sistemi modello chimici *in vitro*) per la valutazione del potenziale antiossidante (attività scavenger verso i radicali DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup>, attività di chelazione del ferro e inibizione della perossidazione lipidica). L'identificazione di una serie di composti fenolici (acidi fenolici e flavonoidi) e proantocianidine a diverso grado di polimerizzazione è stata condotta mediante metodiche HPLC/MS. Infine, l'attività antiradicalica globale della cuticola di nocciola è stata determinata applicando una metodica di analisi diretta sul campione delipidizzato, evitando quindi la fase di estrazione dei composti polifenolici.

I risultati ottenuti hanno dimostrato come il meccanismo antiossidante degli estratti di cuticola sia prevalentemente di tipo antiradicalico, avendo anche osservato un'elevata correlazione con il contenuto in polifenoli totali.

Tale attività non è risultata influenzata dal diverso grado di tostatura del campione; al contrario, gli estratti ottenuti dalle cuticole a più elevato grado di tostatura hanno evidenziato maggiori proprietà di chelazione e di inibizione della perossidazione lipidica. Tempi di tostatura più prolungati hanno anche determinato una diminuzione della frazione proantocianidinica polimerica. La misura diretta dell'attività antiossidante dei campioni di cuticola ha infine dimostrato migliori proprietà antiradicaliche per la cuticola a media tostatura.

## Bibliografia

1. Huang, D. et al. *J Agric and Food Chem*, **2005**, *53*, 1841-1856.
2. Gu, L. et al. *J Nutr*, **2005**, *134*, 613-617.
3. Monagas, M. et al. *J Agric and Food Chem*, **2009**, *57*, 10590-10599.
4. Locatelli, M. et al. *Food Chem*, **2010**, *119*, 1647-1655.

# MESSA A PUNTO DI UN METODO HPLC PER LA VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ACE-INIBITORIA DI PROTEINE VEGETALI

Giovanna Boschin<sup>1</sup>, Elena Sirtori<sup>1</sup>, Graziana Scigliuolo<sup>2</sup>, Donatella Resta<sup>2</sup>, Anna Arnoldi<sup>1</sup>

<sup>1</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.

<sup>2</sup> HPF-Nutraceuticals, via Balzaretti 9, 20133 Milano.

Le patologie cardiovascolari rappresentano la prima causa di morte nei Paesi industrializzati. Per combattere tali patologie possono essere pianificate strategie preventive che tengono conto dei maggiori fattori di rischio, quali ipercolesterolemia e ipertensione. Questi fattori sono legati in parte allo stile di vita, comprese le abitudini alimentari, e possono quindi essere influenzati da opportuni interventi dietetici.

Molti studi condotti negli ultimi anni si sono focalizzati sulla produzione e sull'isolamento di peptidi ad azione antiipertensiva, partendo da differenti proteine vegetali e animali<sup>1,2</sup>. Studi *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato come questi peptidi svolgano un'azione diretta sull'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE), l'enzima chiave nella regolazione dei livelli pressori nell'organismo umano. Essi si legano, infatti, a livello del sito attivo dell'enzima competendo in modo diretto con l'angiotensina I ed esplicando un'azione inibitoria.

I peptidi ACE-inibitori, come parte integrante di un alimento nutraceutico, hanno un interesse funzionale nel mantenimento di un buono stato di salute. Infatti, questi "peptidi funzionali" non solo hanno un valore aggiunto nell'alimento in cui sono presenti, ma esplicano anche un effetto fisiologico nell'organismo umano<sup>3</sup>.

La valutazione dell'attività ACE-inibitoria di peptidi potenzialmente bioattivi viene effettuata, principalmente, mediante tecniche spettrofotometriche basate sull'utilizzo del tripeptide modello hippuryl-histidyl-leucina (HHL)<sup>4</sup>. Essendo la tecnica spettrofotometrica affetta da problemi di bassa specificità e sensibilità, è necessario sviluppare metodi più accurati per una determinazione non solo qualitativa, ma anche quantitativa del grado di inibizione dell'enzima ACE. Questo è soprattutto importante quando si testano peptidi o miscele peptidiche ottenute da fonti alimentari, che possono contenere degli interferenti.

Scopo del lavoro è stato quindi quello di sviluppare un metodo cromatografico sensibile, specifico e quantitativo per la valutazione dell'attività ACE-inibitoria di peptidi vegetali. Sono state messe a punto le condizioni sperimentali per analisi cromatografiche in HPLC con rivelatore DAD e analisi in cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (HPLC-Chip-Ion Trap). Il saggio *in vitro* è stato inizialmente validato utilizzando molecole note per l'attività ACE-inibitoria (captopril, enalapril e lisinopril); in seguito sono state analizzate miscele peptidiche provenienti dalla digestione enzimatica di differenti proteine vegetali. Sono in corso ulteriori valutazioni rispetto all'attività di singoli peptidi purificati.

## Bibliografia

1. Vermeirssen, V et al. *J Dairy Sci*, **2003**, 86, 429-438.
2. Rotimi, E et al. *J AOAC International*, **2008**, 91, 947-956.
3. Fujita, H et al. *J Food Sci*, **2000**, 65, 564-569.
4. Cushman, D et al. *Bio Pharm*, **1971**, 20, 1637-1648.

# APPROCCI PROTEOMICI INTEGRATI PER LO STUDIO E LA CARATTERIZZAZIONE DELLE PROTEINE DI LUPINO: UNA NUOVA RISORSA PER ALIMENTI FUNZIONALI INNOVATIVI

Elena Sirtori<sup>1</sup>, Donatella Resta<sup>2</sup>, Francesca Brambilla<sup>2</sup>, Anna Arnoldi<sup>1</sup>

<sup>1</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;

<sup>2</sup> HPF-Nutraceuticals, via Balzaretti 9, 20133 Milano.

In tempi recenti si è assistito, in campo alimentare, ad una notevole crescita dell'interesse nei confronti di nuovi ingredienti bioattivi per la preparazione di alimenti "funzionali" in grado di apportare sostanziali benefici alla salute dell'individuo. Il mercato dei nutraceutici è considerato oggi particolarmente profittabile ed il sottosectore dei prodotti per la prevenzione delle malattie cardiovascolari ha sicuramente enormi potenzialità. In tale ambito, è ormai ben conosciuta l'attività ipocolesterolemizzante delle proteine della soia, ampiamente dimostrata da numerosi studi.

La ricerca e la caratterizzazione di fonti proteiche vegetali, alternative alla soia, ha assunto sempre maggiore importanza e ha spostato l'attenzione verso colture tradizionali quali il lupino. Tale legume risulta essere particolarmente interessante per la qualità nutrizionale (elevato contenuto proteico) e per le proprietà tecnologiche.

La potenzialità dell'utilizzo del lupino nei prodotti alimentari è elevata, in quanto ottimo ingrediente per migliorare le caratteristiche dei prodotti dietoterapici destinati a: celiaci (prodotti gluten-free), soggetti allergici e/o intolleranti al latte, soggetti affetti da ipercolesterolemia e diabete. Negli ultimi anni sono state, infatti, evidenziate proprietà ipocolesterolemizzanti dei semi di lupino, riconducibili alla presenza di proteine e/o peptidi biologicamente attivi<sup>1-3</sup>.

Con l'obiettivo di utilizzare il lupino come ingrediente per la produzione di alimenti funzionali innovativi, è stato necessario effettuare uno studio approfondito per la caratterizzazione qualitativa di tale fonte proteica.

L'utilizzo di tecniche analitiche complementari, quali cromatografia, elettroforesi bidimensionale e spettrometria di massa, ha permesso di separare, identificare e purificare ciascuna delle principali proteine di riserva del seme di lupino:  $\alpha$ -conglutina (legumin-like protein, 11S),  $\beta$ -conglutina (vicilin-like protein, 7S),  $\gamma$ -conglutina (7S basic) e  $\delta$ -conglutina (2S). Quest'analisi ha messo in evidenza importanti differenze nel contenuto proteico di due specie di lupino, *Lupinus albus* e *Lupinus angustifolius*, ampiamente utilizzate dall'industria alimentare Europea. Tali differenze potrebbero riflettersi in una differente bioattività da parte delle due specie. Un secondo obiettivo del lavoro di ricerca è stato quello di valutare l'integrità proteica delle proteine di lupino a seguito di trattamenti termici e meccanici, normalmente utilizzati dall'industria alimentare per la produzione di alimenti nutraceutici. La processazione industriale altera, infatti, le proprietà nutrizionali delle proteine, causando una sostanziale perdita di integrità proteica e aumentando il grado di insolubilizzazione, che si riflette in ultima analisi nella formazione di aggregati.

Mediante spettrometria di massa è stato possibile identificare peptidi ancora integri e quindi stabili, anche a seguito di drastiche condizioni di processazione<sup>4</sup>. Tali peptidi appartengono alla classe della  $\beta$ - e  $\delta$ -conglutina e mostrano elevate omologia di sequenza con peptidi bioattivi di soia recentemente identificati. Tali analogie potrebbero suggerire un'azione simile anche da parte delle proteine di lupino, in particolare per quanto riguarda l'attività ipocolesterolemica.

## Bibliografia

1. Sirtori, CR et al. *J Nutr*, **2004**, *134*, 18-23.
2. Bettzieche, A et al. *Br J Nutr*, **2008**, *99*, 952-962.
3. Sirtori, CR et al. *Atherosclerosis*, **2009**, *203*, 8-17.
4. Sirtori, E et al. *Food Chem*, **2010**, *120*, 496-504

# SVILUPPO DI UN METODO IN HPLC-MS PER LA QUANTIFICAZIONE DI PROTEINE BIOATTIVE DI LUPINO IN MISCELE PROTEICHE COMPLESSE

Donatella Resta<sup>2</sup>, Francesca Brambilla<sup>2</sup>, Marco Zanotti<sup>3</sup>, Anna Arnoldi<sup>1</sup>

<sup>1</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.

<sup>2</sup> HPF-Nutraceuticals SRL, via Balzaretti 9, 20133 Milano

<sup>3</sup> Agilent Technologies Italia SpA, via Godetti 2/C, 20063 Cernusco sul Naviglio, Milano

Una delle componenti nutraceutiche più interessanti del lupino è la conglutina-gamma, una proteina matura composta da una catena pesante e una leggera collegate da legami disolfuro, dotata di un'interessante attività ipoglicemica<sup>1</sup>. Parallelamente questa proteina è considerata anche uno dei principali allergeni del lupino, anche in base ad alcune sue proprietà peculiari come la stabilità termica e la resistenza alla proteolisi che sono considerate importanti caratteristiche comuni della maggior parte degli allergeni alimentari<sup>2</sup>.

La quantificazione delle proteine biologicamente attive negli alimenti è basata principalmente su saggi immunologici che hanno tuttavia alcuni limiti tecnici, come la cross-reattività con altre proteine alimentari e risultati falsi-positivi. In alternativa si stanno affermando metodi basati sulla spettrometria di massa<sup>3</sup>.

Lo scopo del nostro lavoro è stato lo sviluppo di un metodo analitico "label-free" per la quantificazione assoluta della conglutina-gamma, da utilizzare per la valutazione della qualità nutraceutica di alimenti e ingredienti alimentari.

Il metodo è basato sulla separazione degli idrolizzati triptici per mezzo della HPLC-Chip, una tecnica cromatografica che consente di ottenere separazioni particolarmente efficienti. L'analisi quantitativa della proteina è stata effettuata in Multiple Reaction Monitoring (MRM), per avere una maggiore sensibilità e selettività rispetto al metodo full scan. Per la quantificazione selettiva della conglutina-gamma sono stati selezionati cinque peptidi proteotipici, cioè specifici della proteina bersaglio. La quantificazione assoluta è stata condotta mediante l'aggiunta standard di conglutina-gamma ad un grado elevato di purezza. L'effetto matrice è stato ovviato mediante l'aggiunta di quantità note di una proteina esogena (nel nostro caso albumina di siero bovino, BSA) come standard interno. L'elaborazione dei dati mediante l'uso di sistemi informatici avanzati ha permesso di ottenere rette di taratura adeguate per una quantificazione assoluta ottimale in campioni incogniti.

## Bibliografia

1. Magni, C et al. *J Nutr Biochem*, **2004**,*15*, 646-50.
2. Breiteneder, H et al. *J Allergy Clin Immunol*, **2005**, 14-22
3. Carbonaro, M et al. *Trends in Food & Technology*, **2004**, *15*, 209-216

## PROTEOMICA “SHOTGUN” PER L’ANALISI DIFFERENZIALE DELLE PROTEINE BIOATTIVE DI LUPINO

Donatella Resta<sup>2</sup>, Francesca Brambilla<sup>2</sup>, Marco Zanotti<sup>3</sup>, Anna Arnoldi<sup>1</sup>.

<sup>1</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;

<sup>2</sup> HPF Nutraceutics SRL, via Balzaretti 9, 20133 Milano;

<sup>3</sup> Agilent Technologies Italia SpA, via Godetti 2/C, 20063 Cernusco sul Naviglio, Milano

Nel campo del controllo di qualità degli alimenti funzionali stanno assumendo sempre più importanza le metodiche basate sulla proteomica differenziale che consente, ad esempio, di comparare proteine biologicamente attive in diversi ingredienti alimentari. Questa tecnica si basa su metodi avanzati in spettrometria di massa e sistemi informatici dedicati.

Dal punto di vista quantitativo, sono riportati in letteratura due principali approcci sperimentali: le tecniche di marcatura con isotopi stabili (SIL, Stable Isotope Labeling)<sup>1</sup> e tecniche senza marcatura (SIF, Stable Isotope Free)<sup>2</sup>. Sebbene le tecniche SIL rimangano le più utilizzate nel settore biomedico, nel settore alimentare crescenti sforzi sono stati diretti verso lo sviluppo di approcci “label free”, nettamente più economici. Le tecniche senza marcatura consentono di fare l’analisi differenziale delle proteine in un illimitato numero di campioni, mediante l’acquisizione di dati indipendenti e la comparazione di ogni gruppo di dati con ciascun altro gruppo. Inoltre, l’approccio senza marcatura ha una maggiore semplicità sperimentale e non richiede l’utilizzo di reagenti costosi.

Lo scopo di questo lavoro è stato lo sviluppo di un metodo senza marcatura isotopica basato sulla proteomica “shotgun” per la simultanea identificazione e quantificazione relativa di proteine bioattive in estratti proteici totali di diverse cultivar di *Lupinus albus*, un legume che sta guadagnando crescente interesse presso l’industria alimentare per le sue proprietà nutraceutiche.

Dal punto di vista cromatografico, il metodo è basato sull’utilizzo della HPLC-Chip, un sistema a nano-flussi caratterizzato da un’ottima sensibilità e riproducibilità.

L’introduzione di una proteina esogena come standard interno nelle miscele proteiche soggette a digestione enzimatica, è risultato essere una soluzione interessante sia per la valutazione dell’effetto matrice, sia per la normalizzazione dei parametri quantitativi delle proteine target<sup>4</sup>.

### Bibliografia

1. Frohlich, T et al. *J Neural Transmission*, **2006**, *113*, 973-994
2. Tang, H et al. *Bioinformatics*, **2006**, *22*, 481-488
3. Arnoldi, A et al. *Mol Nutr Food Res*, **2007**, *51*, 431-436
4. Brambilla, F et al. *Proteomics*, **2009**, *9*, 272-286

## I LEGUMI COME FONTE DI TOCOFEROLI

Giovanna Boschin<sup>1</sup>, Donatella Resta<sup>2</sup>, Anna Arnoldi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio di Chimica degli Alimenti e Spettrometria di Massa, Dipartimento di Endocrinologia Fisiopatologia e Biologia Applicata, Università degli Studi di Milano, via Balzaretti 9, 20133 Milano;

<sup>2</sup> HPF-Nutraceuticals, Via Balzaretti 9, 20133 Milano.

Le leguminose da granella, grazie alla loro composizione chimica, sono una potenziale fonte di componenti bioattivi.<sup>1</sup> In particolare tra i vari fitonutrienti destano un grande interesse i tocoferoli, in grado di ridurre lo stress ossidativo e contrastare alcune patologie croniche come le malattie cardiovascolari, alcuni tipi di cancro e le retinopatie<sup>1</sup>.

Da un punto di vista chimico, i tocoferoli (T) sono una classe di quattro isomeri, alfa-T, beta-T, gamma-T e delta-T, che si differenziano per il numero e la posizione dei gruppi metilici presenti sull'anello benzenico. Questi isomeri presentano diversa attività: l'isomero alfa è il principale imputato per gli effetti benefici sulla salute, mentre l'isomero gamma ha un ruolo rilevante nella protezione della frazione lipidica del seme<sup>2</sup>.

Obiettivo di questo lavoro è stata la valutazione del contenuto di tocoferoli di alcuni dei principali legumi da granella: soia (*Glycine max*), lupino (*Lupinus albus*, *L. angustifolius*, *L. mutabilis*), ceci (*Cicer arietinum*), lenticchie (*Lens culinaria*), fagioli (*Phaseolus vulgaris*), piselli (*Pisum sativum*), e fave (*Vicia faba*). In particolare, è stato condotto un lavoro più approfondito sul lupino bianco (*L. albus*): otto cultivar sono state seminate in due diversi areali aventi caratteristiche climatiche differenti, e nel corso di due annate agrarie successive, allo scopo di evidenziare le differenze nel contenuto in tocoferoli dovute a parametri genetici e/o pedo-climatici.

La procedura sperimentale ha previsto la decorticazione e macinazione dei semi e l'estrazione dell'olio con esano tramite soxhlet. L'analisi dell'olio è stata effettuata in HPLC con rivelatore fluorimetrico, utilizzando una colonna a fase diretta Lichrosorb Si60. La quantificazione è stata effettuata tramite il metodo dello standard esterno (rette di taratura dei singoli isomeri standard).

In tutti i campioni analizzati, l'isomero gamma è risultato essere il più abbondante, mentre l'isomero beta non è mai stato rilevato. Gli isomeri alfa e delta presentano un'elevata specificità per le singole specie, ad esempio l'isomero alfa è assente in tutti i campioni di fagiolo, mentre l'isomero delta è assente in tutti i campioni di *L. angustifolius*.

Il contenuto totale medio di tocoferoli nei semi di soia è di 14 mg/100 g, seguito da lupino e ceci con 8-10 mg/100 g, da fave e lenticchie 4-6 mg/100 g, e infine dai fagioli circa 2-4 mg/100 g.<sup>3-5</sup>

Per quanto riguarda il lupino, i contenuti medi delle tre specie analizzate sono i seguenti: *L. mutabilis* 10.2 mg/100 g, *L. albus* 9.7 mg/100 g e *L. angustifolius* 8.6 mg/100 g di semi, con significative differenze tra le varie cultivar di *L. albus* e maggiore omogeneità tra quelle di *L. angustifolius*.

In conclusione, il contributo dei legumi da granella all'apporto giornaliero di tocoferoli nella dieta appare molto significativo. Considerando, inoltre, che essi contengono anche buone quantità di polifenoli, il consumo di questi vegetali contribuisce in modo significativo al nostro intake quotidiano di sostanze antiossidanti.

### Bibliografia

1. Bramley et al. *J Sci Food Agric*, **2000**, *80*, 913-938.
2. Cho et al. *J Sci Food Agric*, **2007**, *87*, 1096-1107.
3. Yoshida et al. *J Am Oil Chem*, **2007**, *84*, 1031-1038.
4. Wyatt et al. *J Agric Food Chem*, **1998**, *46*, 4657-4661.
5. Yoshida et al. *J Food Lipids*, **2005**, *12*, 169-180.

## CARATTERIZZAZIONE DEI COMPONENTI MINORI CON POTENZIALE ATTIVITA' NUTRACEUTICA DELLA MANNA ESTRATTA DA *FRAXINUS EXCELSIOR*

Renato Bruni<sup>1</sup>, Augusta Caligiani<sup>2</sup>, Martina Cirlini<sup>2</sup>, Gerardo Palla<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Biologia Evolutiva e Funzionale – Sezione di Biologia Vegetale, Università degli Studi di Parma, Via Usberti 11A, 43100 Parma, Italia

<sup>2</sup> Dipartimento di Chimica Organica e Industriale, Università degli Studi di Parma, Via Usberti 17A, 43100 Parma, Italia

La manna è il prodotto ottenuto dalla solidificazione della linfa che fuoriesce da alcune specie del genere *Fraxinus* L. come risposta a incisioni praticate sul fusto secondo precise metodologie consolidate da una tradizione secolare. La coltivazione dei frassini da manna è oggi limitata solo a poche zone della Sicilia. La composizione chimica della manna, per molti aspetti ancora sconosciuta, è molto complessa e variabile in funzione della specie da cui si estrae e dalla metodologia estrattiva. Il componente predominante è il mannitolo, conosciuto anche come mannite o zucchero di manna, principale responsabile delle proprietà lassative e purganti. La manna viene infatti utilizzata principalmente come lassativo, ma anche come disintossicante, espettorante, dolcificante. Le sue proprietà non sembrano ascrivibili al solo mannitolo ma ad una sinergia tra componenti minori non ancora del tutto caratterizzati.

In questo lavoro sono state prese in esame diverse tipologie di manna siciliana estratta da *Fraxinus excelsior* allo scopo di individuare e caratterizzare, oltre alla frazione glucidica, i componenti minori potenziali responsabili delle attività benefiche della manna. In particolare è stata caratterizzata la frazione azotata (amminoacidi liberi e proteici) e la componente lipidica (acidi grassi e frazione insaponificabile). Infine si è spostata l'attenzione sulla componente aromatica, identificando alcune sostanze appartenenti alla classe delle cumarine.

### Bibliografia

1. Schicchi, R et al. *Quad Bot Amb Appl*, **2006**, 17/2, 151-174

## **EFFETTO DI UN NUTRACEUTICO COMBINATO (ARMOPREV®) SULLA PRESSIONE ARTERIOSA E SUL RISCHIO CV STIMATO IN PAZIENTI IPERTESI E DISLIPIDEMICI IN MONOTERAPIA CON ACE-INIBITORI (ACE-I) O CALCIO ANTAGONISTI (CCB).**

Arrigo FG Cicero<sup>1</sup>, Beatrice Gerocarni<sup>1</sup>, Ivo Setnikar<sup>2</sup>, Claudio Benvenuti<sup>2</sup>, Lucio Rovati<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Dip. di Medicina Interna, dell'Invecchiamento e Malattie nefrologiche, Università di Bologna, Italia

<sup>2</sup> Rottapharm-Madaus SpA, Monza, Italia

In precedenza abbiamo dimostrato l'efficacia ipocolesterolemizzante di un nutraceutico combinato contenente Berberina 500 mg e Monakoline 3 mg (1).

Abbiamo quindi valutato l'efficacia e la tollerabilità di un nutraceutico combinato (Armoprev®) contenente un estratto standardizzato di *Ortosiphon stamineus* 100 mg, associato a Berberina 500 mg e Monakoline 3 mg, su pazienti ipertesi e dislipidemici non a target per la loro pressione arteriosa (PA) nonostante trattamento con ACE-I o CCB.

Abbiamo arruolato 40 pazienti ipertesi dislipidemici, 20 in trattamento stabile con ACE-I da almeno 6 mesi e 20 con CCB diidropiridinici. Alla baseline i due gruppi erano comparabili per quanto riguarda sesso, età, PA e valori lipidici. Tutti venivano trattati con Armoprev<sup>(R)</sup> e rivalutati dopo 4 settimane di terapia. Il cambiamento del livello di rischio CV stimato a 10 anni è stato stimato applicando l'algoritmo del Progetto Cuore.

Tutti i pazienti hanno ottenuto un miglioramento dei parametri lipidici senza differenze significative fra gruppi (LDL-C:  $-60\pm 17$  mg/dL, TG:  $30\pm 20$  mg/dL, HDL-C:  $+4\pm 4$  mg/dL). L'assunzione di Armoprev<sup>(R)</sup> è stata anche associata ad un miglioramento significativo della PA sia nei pazienti trattati con ACE-I che in quelli con CCB, senza differenze significative fra gruppi di trattamento (salvo un trend per una maggiore efficacia nell'associazione con l'ACE-I): PAS=  $-4.7\pm 1.8$  mmHg ( $p<0.001$ ), PAD:  $-2.4\pm 2.3$  mmHg ( $p<0.001$ ). La riduzione della PA ottenuta con Armoprev<sup>(R)</sup> è stata proporzionale ai valori di PA alla baseline (la correlazione è più evidente nel gruppo trattato con ACE-I). Il rischio CV stimato è significativamente ridotto dopo assunzione di Armoprev<sup>(R)</sup>, specie negli uomini (che partivano da più alti livelli di rischio alla baseline: M=  $-5.8\pm 3.2\%$ , F=  $-1.6\pm 1.5\%$ ). Non si sono osservate variazioni significative di transaminasi, CPK e creatinina.

Un approccio nutraceutico combinato può migliorare il controllo pressorio ed il profilo di rischio CV stimato in pazienti già trattati con ACE-I o CCB.

### **Bibliografia**

1. Cicero, AFG et al. *Curr Topics Nutraceut Res*, **2009**, In press
2. Calmieri, L et al. *Ann Ist Super Sanità*, **2004**, *40*, 393-9.

## **EFFICACIA ANTIIPERTENSIVA DEI LACTOTRIPEPTIDI VPP E IPP: UNA META-ANALISI DEI TRIALS CLINICI DISPONIBILI**

Arrigo F.G. Cicero, Beatrice Gerocarni, Fabrizio Imola, Francesca Santi, Claudio Borghi

Dip. di Medicina Interna, dell'Invecchiamento e Malattie nefrologiche, Università di Bologna, Italia

Dati di letteratura suggeriscono che i lactotripeptidi Valina-Prolina-Prolina (VPP) e Isoleucina-Prolina-Prolina (IPP) assunti come nutraceutici o alimenti funzionali possano svolgere azione antipertensiva via inibizione dell'enzima di conversione dell'angiotensinogeno. Tuttavia i dati derivanti dai trials clinici sembrano contrastanti.

Abbiamo quindi condotto una meta-analisi dei trials clinici controllati contro placebo finora condotti per verificare l'efficacia clinica di questi peptidi.

I trials sono stati identificati tramite un'attenta ricerca bibliografica su Pub-Med ed Embase e crociati con le voci bibliografiche riportate negli stessi. L'effetto globale è stato stimato con un modello per effetti random.

Sono stati quindi identificati 18 trials che riportavano chiaramente tutti i dati necessari per essere inclusi nella metanalisi. La maggior parte dei trials inclusi è stato condotto su casistiche relativamente piccole ma abbastanza omogenee per quanto riguarda tipologia di soggetti studiati e metodologia applicata.

L'effetto globale dei peptidi è stato quantificato con -3.88 mmHg (95% CI: -6.12, -1.54) per la pressione sistolica (PAS), e -1.97 mmHg (95% CI: -3.85, -0.64) per la diastolica (PAD).

L'effetto è risultato molto più evidente nei pazienti asiatici [PAS = -7.88 mmHg (95% CI: -9.97, -4.18); PAD= -3.98 mmHg (95% CI: -5.38, -2.44)] che nei caucasici [PAS = -1.41 mmHg (95% CI: -3.04, 0.62); PAD= -0.41 mmHg (95% CI: -1.39, 0.59)], e non chiaramente correlate ai livelli pressori basali, all'età dei pazienti, né alla dose testate o alla durata dello studio.

In conclusione, i lactotripeptidi VPP e IPP assunti come nutraceutico o alimento funzionale possono ridurre significativamente la PAS, specie in soggetti asiatici. La rilevanza di questa osservazione in altre etnie o associata a pattern dietetici differenti richiede ulteriore ricerca.

### **Bibliografia**

1. Murray, BA *J Curr Pharm Des*, **2007**, *13*, 773–791
2. Boelsma, E et al. *Br J Nutr*, **2009**, *101*, 776–786

# EFFETTI EMODINAMICI DI LACTOTRIPEPTIDI DERIVATI IDROLISATI DI CASEINA IN SOGGETTI NORMOTESI E CON PRESSIONE NORMALE-ALTA: UNO STUDIO CLINICO IN DOPPIO CIECO, RANDOMIZZATO, CON DISEGNO CROSS-OVER

Arrigo FG Cicero<sup>1</sup>, Martina Rosticci<sup>1</sup>, Maddalena Veronesi<sup>1</sup>, Stefano Bacchelli<sup>1</sup>, Enrico Strocchi<sup>1</sup>, Camilla Melegari<sup>2</sup>, Elisa Grandi<sup>1</sup>, Claudio Borghi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dip. di Medicina Interna, dell'Invecchiamento e Malattie nefrologiche, Università di Bologna, Italia

<sup>2</sup> Unità di nutrizione, Dipartimento di R&D, Barilla SpA, Parma, Italia

Dati contrastanti su diverse popolazioni supportano una certa attività antipertensiva dei lactotripeptidi Ile-Pro-Pro / Val-Pro-Pro derivati dal trattamento enzimatico degli idrolisati di caseina (1,2).

Abbiamo quindi condotto uno studio randomizzato in doppio cieco con disegno cross-over per studiare l'efficacia antipertensiva di un trattamento a breve termine con tali lactotripeptidi in soggetti con pressione arteriosa (PA) normale o normale-alta, in termini di riduzione della pressione media ambulatoriale delle 24 ore (ABPM) e di attività reninica.

Sono stati consecutivamente arruolati 55 soggetti adulti non trattati per ipertensione (M: F = 30 : 25) con PA normale o normale-alta. Dopo 4 settimane di dieta di stabilizzazione sono stati randomizzati ad assumere un succo di frutta contenente 3 mg di lactotripeptidi o placebo. Dopo 4 settimane di wash-out, i soggetti sono stati poi assegnati al trattamento alternative per ulteriori 4 settimane.

Non si sono osservate variazioni significative di peso corporeo, BMI e circonferenza vita in entrambi i gruppi di trattamento. Globalmente rispetto al basale non si sono osservate variazioni significative della pressione sistolica, diastolica e di polso ambulatoriali. Ripetendo l'analisi per livelli di PA basale, una lieve si è osservata una lieve ma significativa riduzione della pressione sistolica ( $-1.7 \pm 2.3$  mmHg;  $p=0.002$ ) solo nei soggetti con pressione normale-alta dopo trattamento con lactotripeptidi. Per quanto riguarda la pressione misurata sulle 24 ore, solo nei soggetti trattati con lactotripeptidi si è osservata una significativa riduzione della pressione diastolica diurna ( $-1.6 \pm 5.4$  mmHg,  $p=0.042$ ), media diurna ( $-2.1 \pm 5.9$  mmHg,  $p=0.19$ ), della percentuale di valori di diastolica sopra la norma sulle 24 ore ( $-5.4 \pm 14.2$  mmHg,  $p=0.011$ ) e sulle misurazioni diurne ( $-7.1 \pm 19.2$  mmHg,  $p=0.014$ ). Non si sono osservate variazioni di attività reninica ed aldosteronemia in entrambi i gruppi di trattamento.

In conclusione la pressione diastolica diurna viene significativamente a ridursi in soggetti con pressione normale o normale alta trattati con lactotripeptidi.

## Bibliografia

1. Van Mierlo, LA et al. *Am J Clin Nutr*, **2009**, 89, 617-23.
2. Boelsma, E et al. *Br J Nutr*, **2009**, 101, 776-86.

## ANALISI QUALI-QUANTITATIVA DEI METABOLITI SECONDARI PRESENTI NEI FRUTTI DI GELSO (*MORUS NIGRA*) COLTIVATO IN SICILIA.

Stefano Dall'Acqua, Patrizia Penzo, Gabriella Innocenti.

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

*Morus nigra* L. (gelso) è una pianta appartenente alla famiglia delle Moraceae che cresce a tutte le latitudini ed è diffusa dalle regioni temperate alle tropicali. L'uso del gelso sia a scopi medicinali e nutrizionali risale a tempi antichi, e questo ha facilitato la sua diffusione, soprattutto in Oriente, Medio Oriente e in Europa. In Cina la sua coltivazione era inoltre legata allo sfruttamento delle larve dei bachi da seta ed è tutt'oggi molto comune. Nella medicina tradizionale cinese sono utilizzate varie parti della pianta (frutti, corteccia, foglie) e viene considerato epatoprotettore, rinforzante delle cartilagini, diuretico e normalizzatore della pressione sanguigna<sup>1,2</sup>. Il frutto del gelso oggi è utilizzato nella preparazione di sciroppi, dolci, granite e nella realizzazione di aromi o coloranti per l'industria alimentare o farmaceutica. La diffusione, la produzione ed il consumo di questi frutti risulta abbastanza ridotto ma i frutti di *Morus* sono molto ricchi di antocianine, composti con molteplici azioni fra cui spicca l'attività antiossidante<sup>3,4</sup>.

In questo lavoro è stata analizzata la composizione fitochimica di frutti di *Morus nigra* L. raccolti in Sicilia (Marsala); sono stati considerati il contenuto di antocianine e di altri composti fenolici mediante HPLC-MS ed HPLC-DAD. I dati ottenuti sono stati confrontati con quanto riportato in letteratura per frutti di *M. nigra* L. di altra provenienza. I metaboliti secondari presenti sono risultati simili a quelli riportati da altri autori<sup>5,6,7</sup>. Le principali antocianine identificate nel campione siciliano sono la cianidina-3-glucoside e la cianidina-3-rutinoside. Differentemente da quanto riportato in precedenza<sup>5,6</sup>, nel campione siciliano sono state rilevate, seppure in piccola quantità, cianidina-3-soforoside e malvidina-3-glucoside.

Il contenuto nei frutti freschi in antocianine (18,9 mg/10 g) e in flavonoidi (1,25 mg/10 g) risultato mediamente più basso nel campione siciliano rispetto a quello di un campione campano<sup>5</sup>, ma comunque in linea con altri dati presenti in letteratura<sup>7</sup>. Per contro il contenuto in acidi caffeici risulta più elevato di quanto riportato in letteratura<sup>1,7</sup>. Bisogna considerare che il contenuto in metaboliti secondari può essere fortemente influenzato dal grado di maturazione, da fattori climatici, ed ambientali e quindi potrebbe essere interessante valutare eventuali variazioni di tali titoli nel corso della maturazione dei frutti. Sono state inoltre effettuate analisi di confronto con estratti di mirtillo e si è osservato che il pattern in antocianine è differente e potrebbe essere considerato "complementare" e quindi giustificare una associazione fra questi due frutti rossi.

I dati ottenuti permettono di considerare i frutti di gelso come un potenziale nuovo ingrediente per il settore nutraceutico ed erboristico, dotato di peculiare composizione in metaboliti secondari quali antocianine, flavonoidi e derivati dell'acido clorogenico.

### Bibliografia

1. Zhang, W et al. *J Food Sci*, **2008**, *73*, 512-518.
2. Ercisli, S and Orhan, E. *Food Chem*, **2007**, *103*, 1380-1384.
3. Liu, K et al. *J Food Sci*, **2008**, *73*, 82-90.
4. Song, W et al. *J Agric Food Chem*, **2009**, *57*, 9133-9140.
5. Pawlowska, A et al. *J Agric Food Chem*, **2008**, *56*, 3377-3380.
6. Dugo, P et al. *J Agric Food Chem*, **2001**, *49*, 3972-3992.
7. Lee, J et al. *Food Sci and Biotech*, **2004**, *13*, 176-184

# **SINGLE ORAL DOSE OF A NUTRACEUTICAL FORMULA (N-OLEYL-PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE AND EPIGALLOCATECHIN-3-GALLATE) INHIBITS HUNGER SENSATION IN HEALTHY VOLUNTEERS**

Enzo Grossi, Giovanni Rivolta

Medical Department Bracco SpA, Milan, Italy

Many studies have found that N-oleyl-ethanolamine (NOE), a metabolite of N-oleyl phosphatidylethanolamine (NOPE), and epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibit food intake through complementary complex mechanisms of action. NOPE is a phospholipid present in many foods of animal and plant origin and, in particular, it is plentiful in foods such as soya, eggs and chocolate; moreover, it is normally produced and metabolized in human beings.

EGCG is a well known catechin extracted from green tea, known for many activities among which the control of weight homeostasis. NOPE-EGCG complex is a patented dietary supplement commercially available from Bracco SpA ( Nopesil<sup>®</sup> ). EGCG complexed with NOPE has been shown to be more active than only NOPE in exerting useful biological activities like reducing food intake. Since most of available evidences derive from animal studies, we have performed a clinical trial on the effect of this nutraceutical on satiety sensation.

Twelve healthy volunteers ( 4 males; 8 females; age range 35-58) underwent a randomized crossover trial versus placebo on the acute effect of a single capsule of Nopesil ( containing 85 mg NOPE and 60 mg EGC ) on perceived hunger sensation after an overnight fasting. The hunger sensation was assessed in two separate experiments through a validated 100 mm chromatic visual analogue scale at noon and 30 minutes apart at day 1 and day 15.

In the Nopesil group the hunger sensation decreased from 38 to 24 mm ( Delta 14 mm;  $P < 0.02$ ) while the hunger sensation recorded in placebo remained unchanged ( 29 mm N.S).

The degree of anorexic effect in Nopesil group was directly proportional to the baseline hunger sensation value. In particular in the seven subjects with high hunger sensation ( above 40 mm) the average reduction was equal to - 40%; far below the percent change in the other five subjects with lower hunger sensation value ( -11%).

This randomized trial shows that a single oral dose of NOPE- EGCG complex is able to influence very rapidly the hunger sensation in healthy volunteers. The effect size is related to the baseline hunger sensation magnitude.

## SOVRAPPESO E OBESITA': ANALISI DEGLI INDICATORI PRINCIPALI ATTI A EVIDENZIARE FONTI DI RISCHIO PER LA SALUTE

Chiara Lisi<sup>1</sup>, Lisa Buzzoni<sup>1</sup>, Viviana Avallone<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>NATURHOUSE srl, via Caselli 11/f, 44100 Ferrara, Italia

Il sovrappeso e l'obesità rappresentano importanti fattori di rischio per la salute di un individuo. Un eccesso di peso, con conseguente accumulo di grasso corporeo, può comportare complicazioni soprattutto a livello cardiovascolare e a carico dell'apparato muscolo-scheletrico, ma forte è anche l'associazione fra obesità e diabete, malattie del fegato, cancro, ed ipertensione. Parlare genericamente di peso corporeo, tuttavia, può non essere sufficiente. Assume infatti importanza sempre maggiore la distribuzione del grasso all'interno dell'organismo, tanto che questo parametro appare oggi la vera "chiave" dei rischi legati all'eccessivo accumulo adiposo. Oggi, in particolare, è accertato che il grasso viscerale, che si accumula soprattutto all'interno dell'addome, rappresenta un fattore di rischio specifico per le malattie cardiovascolari, inducendo effetti negativi specifici sul metabolismo dell'organismo<sup>1,2</sup>.

In linea con quanto appena riportato lo scopo di questo lavoro è stata un'analisi approfondita della tipologia di clienti che si rivolgono ai nostri centri di rieducazione alimentare, presenti su tutto il territorio nazionale, ed una successiva comparazione dei risultati ottenuti con studi trasversali effettuati sull'intera popolazione italiana. I dati raccolti vengono presentati ed analizzati in base a sesso, età, IMC (Indice di Massa Corporea), obesità addominale e distribuzione geografica dei soggetti presi in analisi.

In totale sono stati analizzati i dati inerenti a 9000 soggetti circa, in prevalenza di sesso femminile, ed i risultati ottenuti si sono mostrati in linea con indagini statistiche effettuate sull'intera popolazione italiana ed hanno messo in evidenza un elevato grado di obesità addominale anche nel sesso femminile che sembra stia cambiando dalla classica conformazione ginoide tipica delle donne mediterranee a una struttura più simile a quella androide.

### **Bibliografia**

1. Assmann, G et al. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, **1998**, 8, 205-71.
2. Hayden, MR et al. *JAMA*, **2001**, 285, 2486-97.

## CARATTERIZZAZIONE DELLA COMPOSIZIONE CHIMICA DELL'INTEGRATORE ALIMENTARE "CATEG<sup>®</sup>"

Davide Resnati<sup>1</sup>, Elena Santucci<sup>2</sup>, Fabrizio Ferrarini<sup>2</sup>, Sheila Morandi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio chimico di Controllo Qualità Sofar Farmaceutici SpA, via Firenze 40, Trezzano Rosa, 20060, Milano, Italia

<sup>2</sup> Laboratorio chimico di Ricerca e Sviluppo Sofar Farmaceutici SpA, via Firenze 40, TrezzanoRosa, 20060, Milano, Italia

Le proprietà benefiche dell'infuso di tè verde (*Camelia sinensis*) ed i suoi effetti salutari descritti in libri di medicina tradizionale che risalgono a oltre 2000 anni fa, stanno ultimamente risvegliando grande interesse tra i ricercatori per gli effetti benefici sulla salute umana attribuibili a numerose classi di molecole ad azione antiossidante, in particolare le catechine. Le catechine contenute nel tè verde sono flavan-3-oli appartenenti alla più grande famiglia dei flavonoidi. I principali rappresentanti di questa categoria presenti nel tè verde sono: (-)-epigallocatechina [EGC], (-)-epigallocatechina-3-gallato [EGCG], (-)-epicatechina-3-gallato [ECG], (-)-epicatechina [EC], (-)-gallocatechina [GC], (-)-gallocatechina-3-gallato [GGC], (-)-catechina-3-gallato [CG] e catechina. L'(-)-epigallocatechina-3-gallato [EGCG] è il polifenolo più abbondantemente contenuto nel tè verde, oltre ad esserne la molecola più bioattiva, probabilmente grazie alla sua elevata attività antiossidante (1). L'interesse scientifico per le proprietà benefiche del tè verde nasce anni fa, in seguito a studi epidemiologici effettuati nella regione cinese dello Zhejiang, dove da secoli la popolazione locale fa un largo uso quotidiano dell'infuso di tè verde. Tali indagini avevano evidenziato un'incidenza di malattie degenerative, cardiocircolatorie, infiammatorie, metaboliche e neoplastiche, infinitamente più bassa rispetto alla popolazione dei Paesi occidentali. Ad oggi numerosi autori descrivono diverse proprietà del tè verde tra cui le principali sono l'azione anticarcinogenica (2-4), anti-infiammatoria (5), anti-aterogenica (6) ed antimicrobica (7). Inoltre, Bettuzzi e coll. (2) hanno recentemente dimostrato l'efficacia del trattamento orale con catechine del tè verde nella prevenzione dell'insorgenza del tumore prostatico in soggetti con lesioni pre-maligne.

Dall'osservazione delle numerose evidenze è stato sviluppato l'integratore alimentare Categ<sup>®</sup> contenente un estratto di tè verde decaffeinato, titolato min. al 50 % in EGCG, appositamente studiato per la prevenzione dell'invecchiamento cellulare e dei danni causati dai radicali liberi. All'integratore alimentare CATEG<sup>®</sup> viene riconosciuta non solo una particolare attività contro l'insorgenza e lo sviluppo del cancro prostatico (8), ma anche una significativa efficacia nella prevenzione oncologica di altre malattie degenerative (9).

Scopo di questo lavoro è stata la caratterizzazione della composizione chimica di CATEG<sup>®</sup>; in particolare si sono analizzate la composizione in catechine, xantine e altre molecole antiossidanti come l'acido gallico e galloilchinico, il contenuto in polifenoli totali e l'attività antiossidante del prodotto confrontandola con quella di alcuni infusi di tè verdi, neri e semifermentati, sia in foglie che in buste.

### Bibliografia

1. Wang, H et al., *Food Res. Int*, **2001**, *34*, 223-227.
2. Bettuzzi, S et al. *Cancer Res*, **2006**, *15*, 1234-40.
3. Cooper, R et al. *J. Altern. Complement. Med*, **2005**, *11*, 521-8 e 639-52.
4. Kim, M et al. *Carcinogenesis*, **2005**, *26*, 1553-62.
5. Huang, MT et al. *Carcinogenesis*, **1992**, *13*, 947-954.
6. Lorenz, M et al. *J. Biol. Chem*, **2004**, *13*, 6190-5.
7. Yanagawa, Y et al. *Curr. Microbiol*, **2003**, *47*, 244-9.
8. Chung, LI et al. *Life Sci*, **2001**, *68*, 1207-14.
9. Ju, J et al. *Cancer Res*, **2005**, *65*, 10623-31.

## PHENOLIC COMPOUNDS IN *CICHORIUM ENDIVIA* VEGETABLES

Adele Papetti, Maria Daglia, Dora Mascherpa, Gabriella Gazzani

Department of Pharmaceutical Chemistry, University of Pavia, V.le Taramelli 12, Pavia – Italy

Polyphenols are biologically active compounds widely distributed in the plant kingdom and so present in plant-derived foods and intrinsic components of human diets. They have been shown to possess a range of biological activities that are consistent with them contributing to the protection afforded by a diet rich in fruit and vegetables against degenerative diseases<sup>1-2</sup>. In particular, caffeic acid derivatives act as anti-inflammatory<sup>3</sup>, skin photo damage protectors and recently chicoric acid showed anti HIV-1 activity<sup>4-5</sup>. The levels and chemical forms of these compounds vary markedly depending on the plant source. It is known that endive is a rich source of hydroxycinnamic acids and flavonols<sup>6-8</sup>, in particular kaempferol derivatives, but until now, the qualitative evaluation of flavonoids and phenolic acids in different commercial endive samples, commonly used as food, is far to be complete.

In this work we analyzed the methanolic extract of different commercial endive varieties largely consumed in Italian diet. The investigation was carried out using HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup>. The obtained results indicated the presence of different mono- and di-caffeoylquinic acid isomers, of *cis*-caftaric acid, and of different flavonol conjugates (kaempferol and quercetin derivatives).

### Bibliografia

1. Knekt, P et al. *Am J Clin Nutr*, **2002**, 76, 560-568.
2. Rice-Evans, C. *Curr Med Chem*, **2001**, 8, 797-807.
3. Speroni, E et al. *J Ethnopharmacol*, **2002**, 79, 265-272.
4. Maffei Facino, R et al. *Planta Med*, **1995**, 61, 510-514.
5. Li net, Z et al. *J Med Chem*, **1999**, 42, 1401-1414.
6. Innocenti, M et al. *J Agric Food Chem*, **2005**, 53, 6497-6502.
7. Dupont, MS et al. *Eur J Clin Nutr*, **2004**, 56, 947-954.
8. Papetti, A et al. *J Pharm Biomed Anal*, **2008**, 48, 472-476.

# COSTITUENTI DELLA DIETA MEDITERRANEA: QUANTIFICAZIONE DELLE SOIASAPONINE I E $\beta$ g IN CAMPIONI DI LENTICCHIE ITALIANE

Sauro Vittori, Giovanni Caprioli, Gloria Cristalli, Dario Giardinà, Filippo Maggi, Laura Molin<sup>2</sup>, Massimo Ricciutelli, Gianni Sgratini, Piero Traldi<sup>3</sup>, Yanting Zuo

<sup>1</sup> Scuola di Scienze del Farmaco e dei Prodotti della Salute, Università di Camerino, Via Sant'Agostino 1, 62032 Camerino, Italy

<sup>2</sup> ISB-Ion Source & Biotechnologies, Via Fantoli 16/15, 20138 Milano, Italy

<sup>3</sup> CNR-ISTM, C.so Stati Uniti 4, 35127 Padova, Italy

E' noto che la Dieta Mediterranea è uno dei regimi alimentari più salutari conosciuti, con conseguenze molto positive sulla salute del consumatore. Tra i costituenti di tale Dieta, un posto importante è occupato dai legumi. E' stato riportato in letteratura che il consumo regolare di legumi aiuta a controllare e prevenire numerose malattie metaboliche, tra cui il diabete mellito e le disfunzioni coronariche<sup>1</sup>. I legumi nella dieta sono una fonte primaria di saponine, composti naturalmente presenti in numerosi vegetali, in particolare nella soia. E' stato riportato da molti autori che il regolare consumo di soia, o suoi derivati, ha un evidente effetto ipocolesterolemizzante<sup>2</sup>; questo effetto è messo in relazione sia alle proteine della soia, sia alle saponine suddette, che vedono nella soia il legume che ne contiene il livello più alto (fino a 6500 mg kg<sup>-1</sup>). Le lenticchie sono uno dei legumi con il miglior bilanciamento tra nutrienti e, tra quelle qualitativamente più apprezzate, vi sono alcune cultivar prodotte in Italia; in particolare, le lenticchie di Castelluccio (prodotte sui monti Sibillini, tra Marche ed Umbria), sono le uniche a potersi fregiare del marchio di qualità IGP (Indicazione Geografica Protetta). Per promuovere le lenticchie come cibo salutare, è importante determinarne non solo i livelli di nutrienti e fibre, ma anche quelli di sostanze bioattive, quali le soiasaponine, importante valore aggiunto alle già note proprietà alimentari di questo legume. In letteratura sono presenti solo pochi lavori che descrivono metodi di analisi delle soiasaponine nelle lenticchie<sup>3,4</sup>.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di isolare le soiasaponine I e  $\beta$ g come standard puri dalla soia tramite HPLC semipreparativo e di sviluppare una nuova procedura analitica per la quantificazione delle suddette soiasaponine in varie cultivar di lenticchie Italiane tramite analisi SPE-HPLC-MS.

La spettrometria di massa è stata usata sia per confermare la struttura delle saponine estratte dalla soia (ion trap), sia per la determinazione quantitativa delle saponine nelle lenticchie. Come conferma dei risultati analitici ottenuti con l'approccio LC/MS, sono stati effettuati esperimenti MALDI/MS sui campioni di lenticchie analizzati.

Il processo analitico per la determinazione delle soiasaponine nelle lenticchie si è svolto attraverso le seguenti fasi: 1) macinazione dei semi; 2) estrazione con etanolo acquoso; 3) purificazione con SPE; 4) analisi in LC-ESI-MS. Conferma della struttura delle molecole ottenute ha visto l'utilizzo di uno strumento Ultraflex II MALDI-TOF, operante in modalità ioni negativi con reflectron.

Sono stati studiati complessivamente 32 campioni di lenticchie di diversa origine; il contenuto di soiasaponina I va da 28 a 407 mg kg<sup>-1</sup>, mentre le concentrazioni delle  $\beta$ g sono nel range 110-1242 mg kg<sup>-1</sup>. Le lenticchie di Castelluccio di Norcia hanno presentato il più alto contenuto totale in soiasaponine (1600 mg kg<sup>-1</sup>) ed in soiasaponina  $\beta$ g (1242 mg kg<sup>-1</sup>).

Dall'analisi dei risultati si può trarre qualche interessante deduzione generale sul rapporto tra caratteristiche climatiche della zona di produzione e contenuto in soiasaponine.

## Bibliografia

1. Chung, HJ et al. *Food Chem*, **2008**, *111*, 316-321.
2. Sirtori, CR et al. *Br J Nutr*, **1999**, *82*, 91-96
3. Ruiz, RG et al. *Food Chem*, **1997**, *58*, 223-226.
4. Ruiz, RG et al. *J Agric and Food Chem*, **1996**, *44*, 1526-1530.

# EFFETTI DEI FITOSTEROLI VS FITOSTEROLI + PSYLLIUM SUI PARAMETRI LIPIDICI IN PAZIENTI DISLIPIDEMICI IN PREVENZIONE PRIMARIA TRATTATI PER 1 ANNO

Giuliana Mombelli<sup>1</sup>, Stefania Frasson<sup>1</sup>, Raffaella Bosisio<sup>1</sup>, Cesare R. Sirtori<sup>1-2</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitario Dislipidemie, Azienda Ospedaliera Niguarda Ca' Granda, Piazza Ospedale Maggiore 3, 20162 Milano, Italia.

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi Milano, Via Balzaretti 9, 20133 Milano, Italia.

L'associazione tra i livelli di LDL-colesterolo (LDL-C) e gli eventi coronarici è ormai nota. La diminuzione ottenuta con regimi dietetici ipolipidizzanti non porta sempre al raggiungimento di valori accettabili di colesterolo totale (CT) o LDL-C tale da ridurre in modo adeguato il rischio cardiovascolare. Nelle forme non corrette dalla sola dieta, l'utilizzo di sostanze naturali come i fitosteroli può potenziare questo effetto. Numerosi studi hanno dimostrato l'efficacia nel trattamento delle ipercolesterolemie di modesta entità, attraverso il solo utilizzo di fitosteroli, descrivendo una riduzione del LDL-C di circa il 4-7%.<sup>1</sup> L'aggiunta ai fitosteroli di fibre come lo psyllium<sup>2-3</sup> può produrre un effetto superiore a quello dei singoli costituenti<sup>2-3</sup>.

Scopo del presente studio è stato quello di valutare in un gruppo di pazienti dislipidemici in prevenzione primaria gli effetti di fitosteroli 1.6 grammi/die (Danacol<sup>R</sup>) vs fitosteroli 1.6 g+psyllium 7 g/die (Lipidyum<sup>R</sup>). I parametri in studio sono stati determinati al basale e dopo 6-12 mesi.

Sono stati analizzati 100 pazienti (52 maschi e 48 femmine), di età media rispettivamente 51.7±13.6 per i maschi e 58.3±13.1 per le femmine. I soggetti che hanno assunto il trattamento combinato (fitosteroli+psyllium) sono risultati essere 45 (22 maschi e 23 femmine).

Dopo 6 mesi si è osservata una riduzione statisticamente significativa di LDL-C nei pazienti trattati con solo fitosteroli (-7.0± 23.9%), ma nettamente superiore nei trattati con fitosteroli+psyllium (-16.3± 10.3%, p<0.05 vs solo fitosteroli). A 12 mesi la riduzione è stata: CT -6.7±12.2% e LDL-C -9.8±18.0% nel gruppo fitosteroli, contro CT -11.7± 9.4% e LDL-C -18.0±12.3% nel gruppo fitosteroli+ psyllium (p<0.05 fra i due trattamenti). La differenza di riduzione di CT e LDL-C fra i due gruppi è rimasta quindi statisticamente significativa dopo un anno di trattamento, in maggior modo nei pazienti che hanno registrato un calo ponderale o il cui peso si è mantenuto stabile.

L'utilizzo di fitosteroli+psyllium nella riduzione di LDL-C appare più vantaggioso rispetto al solo utilizzo di fitosteroli, qualora il peso corporeo dei pazienti sia ben controllato con un attento monitoraggio dietetico.

## Bibliografia

1. Demonty, I et al. *J Nutr*, **2008**, *139*,271-284.
2. Shrestha, S et al. *J Nutr*, **2006**,*136*, 2492-7.
3. Shrestha, S et al. *J Nutr*, **2007**,*137*,1165-70.

# L'IMPREGNAZIONE SOTTO VUOTO COME TECNICA DI FUNZIONALIZZAZIONE DELLA FRUTTA: STUDIO SULLE MELE COTOGNE

Patrizia Comandini<sup>1</sup>, Mayra Cristina Soto Caballero<sup>2</sup>, Hugo Mujica-Paz<sup>2</sup>, Aurora Valdez Fragoso<sup>2</sup>, Giampaolo Blanda<sup>1</sup> e Tullia Gallina Toschi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Facoltà di Agraria, Università di Bologna  
P.zza Goidanich 60 - 47023, Cesena (FC), Italia

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua  
Av. Universidad s/n, Ciudad Universitaria  
31125, Chihuahua, Chih. México

Gli alimenti funzionali sono prodotti capaci di fornire un beneficio salutistico superiore a quello dovuto ai nutrienti tradizionali che contengono. Ad ora non esiste una definizione univoca di alimenti funzionali, ma tra quelle impiegate in passato e sicuramente comprese in questa categoria si possono citare gli alimenti arricchiti e quelli fortificati. I primi sono addizionati di nutrienti naturalmente presenti nel prodotto stesso, gli alimenti arricchiti, invece, sono addizionati di componenti non presenti nell'alimento originario<sup>1-2</sup>.

L'impregnazione sottovuoto è una tecnologia ampiamente impiegata nella produzione di alimenti arricchiti e fortificati. Tale tecnica consiste nell'immersione dell'alimento in una soluzione contenente il componente del quale lo si vuole arricchire e, grazie all'applicazione del vuoto, viene facilitato l'ingresso della soluzione all'interno della matrice alimentare. Due sono i meccanismi coinvolti nell'impregnazione sottovuoto, la deformazione dei pori dovuta all'applicazione del vuoto ed il rilassamento che si instaura a partire dal momento della rottura del vuoto. L'ingresso della soluzione all'interno della matrice alimentare è dovuto anche al meccanismo idrodinamico, generato dal differenziale di pressione osmotica esistente tra l'interno e l'esterno del prodotto.

L'efficienza dell'impregnazione è influenzata da numerose variabili, legate sia alle proprietà della soluzione, quali viscosità, densità, tensione superficiale, sia alla microstruttura del prodotto, come porosità e deformabilità, ed infine alle variabili di processo quali la pressione di vuoto, il tempo di applicazione del vuoto e quello di rilassamento.

La mela cotogna (*Cidonia oblonga* Miller), grazie all'elevato contenuto di composti fenolici, presenta già un valore salutistico elevato, ma è scarsamente consumata fresca a causa della significativa astringenza legata all'elevato contenuto di tannini.

In questo studio preliminare sono state valutate le proprietà di impregnazione della mela cotogna, con soluzioni di glucosio, con la finalità di ridurre la percezione dell'astringenza, incrementandone l'impiego fresco, oggi poco rilevante, in prodotti *ready to eat*, a base di frutta.

La stessa metodica può essere utilizzata impiegando sciroppi di glucosio arricchiti di sostanze, a polarità simile, dotate di proprietà nutraceutiche, come calcio e zinco<sup>3</sup>, allo scopo di associare il miglioramento delle caratteristiche organolettiche del prodotto all'arricchimento in sostanze fisiologicamente attive.

## Bibliografia

1. Gras ML et al., *Journal of Engineering*, **2003**, 56, 279-284.
2. Siro, J et al., *Appetite*, **2008**, 51, 456-467.
3. Xie J e Zhao Y, *Int J Food Sci Nutr* **2003**, 54, 387-398.