

**UNIVERSITA DEGLI STUDI
DELLA TUSCIA DI VITERBO**
Dipartimento di Produzione Vegetale

DOTTORATO DI RICERCA IN

“ORTOFLOROFRUTTICOLTURA”

XX CICLO

***VALORIZZAZIONE DEI PRODOTTI ORTOFRUTTICOLI TRADIZIONALI:
EFFETTI DELL’EFFICACIA ANTIOSSIDANTE SU MODELLI IN VITRO,
EX VIVO ED IN VIVO***

Codice: AGR/04

Coordinatore:

Prof. A. Graifenberg

Tutor:

Dott. G. Maiani

Dottoranda:

Eugenia Venneria

Indice

	<i>pagin</i>
	<i>a</i>
Premessa	1
1.0.0 Introduzione	7
1.1.0 Stato red-ox, ossidanti, antiossidanti	8
1.1.1 Gli ossidanti	8
1.1.2 Gli antiossidanti	9
1.2.0 Stress ossidativo, danno ossidativo e patologie	11
1.3.0 Modulazione nutrizionale dello stress ossidativo	11
1.3.1 Ipotesi lipidica	12
1.3.2 Ipotesi antiossidante	13
1.3.3 Il paradosso francese	13
1.4.0 I composti fenolici (CF)	14
1.4.1 I polifenoli: struttura, classificazione e vie biosintetiche	14
1.4.2 Attività biologica	17
1.4.3 Attività antiossidante	18
1.4.4 Gli acidi idrossicinnamici	20
1.4.5 Biocinetica degli acidi idrossicinnamici	23
1.4.6 Assorbimento e metabolismo intestinale	23
1.4.7 Escrezione urinaria degli acidi idrossicinnamici	25
1.4.8 Biodisponibilità degli acidi idrossicinnamici	26
2.0.0 Ipotesi e scopi	33
3.0.0 Materiali e metodi	37
3.1.0 Matrice alimentare	37
3.2.0 Metodi studio <i>in vitro</i>	37
3.2.1 Estrazione dall'alimento per l'analisi dellaTAC	37
3.2.2 Misura del Potere Antiossidante Totale (TRAP Total Radical-trapping Antioxidant Paramiter)	38
3.2.3 Misura del Potere Riducente Totale (FRAP Ferric reducing/antioxidant power)	40

3.2.4	Misura dei composti fenolici	42
3.2.6	Misura della vitamina C	42
3.3.0		44
	Disegno di Studio in vivo	
3.4.0	Metodi per lo studio <i>in vivo</i>	45
3.4.1	Estrazione da plasma di acido clorogenico	45
3.4.2	Metodo di identificazione e quantificazione	46
3.5.0	Studio <i>ex vivo</i> su cellule	48
3.5.1	Colture cellulari	48
3.5.2	Vitalità cellulare, misurazione del GSH intracellulare e perossidazione lipidica	49
3.5.3	Determinazione dell'apoptosi tramite Annessina V-FITC	51
3.6.0	Modello in vitro del plasma ossidato studio <i>in vitro</i>	52
3.7.0	Sostanze chimiche	54
4.0.0	<i>Risultati</i>	52
4.1.0	Carotenoidi	57
4.2.0	Vitamina C	57
4.3.0	Capacità antiossidante totale	58
4.4.0	Composti fenolici	59
4.5.0	Identificazione, calibrazione e limite di rivelabilità dell'acido clorogenico	62
4.6.0	Analisi del contenuto di polifenoli nel plasma	62
4.7.0	Potenziale antiossidante del carciofo <i>in vivo</i>	67
4.8.0	Misura della citotossicità negli epatociti	69
4.9.0	Induzione di morte cellulare H₂O₂	69
4.11.0	Misura dei valori di GSH e MDA	71
4.12.0	Citotossicità indotta da AE nelle cellule HepG2	73
4.13.0	Apoptosi indotta dal trattamento con AE nelle cellule HepG2	74
4.14.0	Capacità antiossidante totale misurata come FRAP dell'estratto e del ChA	75
4.15.0	Modello sperimentale <i>in vitro</i>	76
4.16.0	Effetto delle 3 diverse concentrazioni di ChA sulla capacità antiossidante	77
4.17.0	Effetto delle 3 diverse concentrazioni di estratto sulla capacità antiossidante	79
5.0.0	<i>Discussione e conclusioni</i>	81
5.0.0	<i>Bibliografia</i>	93

Lista tabelle

Tabella 2	Composizione nutrizionale del pasto sperimentale	45	22
Tabella 1	Contenuto di derivati cinnamici in prodotti ortofrutticoli (mg/kg)	57	
Tabella 3	Contenuto in carotenoidi (luteina) nel capolino delle cultivar di sostanza fresca di carciofo analizzate	58	
Tabella 4	Contenuto in vitamina C nel capolino delle cultivar di carciofo analizzate	58	
Tabella 5	Capacità antiossidante totale nel capolino delle cultivar di carciofo analizzate	59	
Tabella 6	Contenuto polifenolico nel capolino delle cv di <i>Cynara scolimus</i> L. analizzate	60	
Tabella 7	Confronto tra le molecole polifenoliche nei capolino di <i>Cynara scolimus</i> L. cv Violetto di Provenza e Romanesco crudo e cotto	61	
Tabella 8	Capacità antiossidante plasmatica misurata con il metodo TRAP	67	
Tabella 9	Capacità antiossidante plasmatica misurata con il metodo FRAP	68	
Tabella 10	Influenza dell'estratto di carciofo sulla produzione di MDA in epatociti trattati con glucosio ossidasi	73	

Lista figure

Figura 1	Struttura chimica di fenoli semplici C6-C1	15
Figura 2	Deaminazione della fenilalanina ad acido trans-cinnamico	16
Figura 3	Biosintesi dei fenoli	17
Figura 4	Struttura degli acidi idrossicinnamici più comuni	21
Figura 5	Grafico della curva standard per la misura del Potere Riducente Totale (FRAP)	41
Figura 6	Modello sperimentale studio <i>in vitro</i>	53
Figura 7	Cromatogramma rappresentativo di una soluzione in MeOH di acido clorogenico	61
Figura 8	Concentrazioni plasmatiche di acido clorogenico	63
Figura 9	Concentrazioni plasmatiche di acido caffeico	64
Figura 10	Concentrazioni plasmatiche di acido ferulico	64
Figura 11	Concentrazioni plasmatiche di acido diidrocaffeoico e diidroferulico	65
Figura 12	Cromatogramma del profilo di assorbimento dei polifenoli target in un soggetto	66
Figura 13	Effetto dell'acido clorogenico sugli epatociti	69
Figura 14	Dose-dipendenza della morte degli epatociti in coltura trattati con glucosio ossidasi	70
Figura 15	Effetto protettivo dell'estratto di carciofo sugli epatociti esposti a glucosio ossidasi	71
Figura 16	Influenza dell'estratto di carciofo sulla perdita di GSH negli epatociti trattati con glucosio ossidasi	72
Figura 17	Citotossicità dell'estratto di carciofo nelle cellule HepG2	74
Figura 18	Determinazione dell'apoptosi tramite citofluorimetria	75
Figura 19	Capacità antiossidante totale del ChA e dell'estratto	75

Figura 20	Paragone tra le curve di correlazione di ChA ed estratto	75
Figura 21	FRAP del sistema Plasma + ABAP e Plasma + ABAP + C1	78
Figura 22	FRAP del sistema Plasma + ABAP + C2 e Plasma + ABAP + C3	78
Figura 23	FRAP del sistema Plasma + ABAP e Plasma + ABAP + E1	79
Figura 24	FRAP del sistema Plasma + ABAP + E2 e Plasma + ABAP + E3	80

Premessa

La qualità dei prodotti ortofrutticoli può essere definita come l'insieme degli aspetti e delle caratteristiche che differenziano un prodotto in grado di soddisfare le esigenze del consumatore. Recentemente, il concetto di qualità e di sicurezza alimentare si è allargato anche verso l'importanza del processo produttivo ed il rispetto dell'ambiente e della biodiversità.

La biodiversità indica una misura della varietà di specie animali e vegetali nella biosfera; essa è il risultato di lunghi processi evolutivi. Perché la diversità nell'ambito di una comunità biologica possa essere considerata una risorsa deve essere caratterizzata da un adeguato numero di specie, da un'alta valenza ecologica e da un legame con le condizioni ambientali. La biodiversità non contribuisce soltanto in maniera diretta alla diversità alimentare della dieta ma può anche incrementare la sicurezza alimentare salvaguardando gli ecosistemi.

Il 75% della diversità genetica di coltivazione agricole a livello mondiale è scomparsa nel ventesimo secolo a causa delle varietà e specie introdotte che hanno sostituito le tradizionali. Circa 10.000 specie di piante sono state usate per la coltivazione agricola e utilizzate per l'alimentazione umana, non più di 120 specie coltivate forniscono oggi più del 90% degli alimenti destinati alla alimentazione umana.

Alcuni autori indicano che in un arco di tempo pari ad una settimana almeno venti e probabilmente anche trenta tipi di alimenti nutrizionalmente diversi sono richiesti per assicurare un contributo importante alla salute del consumatore.

La biodiversità agricola sta diminuendo nei Paesi Europei portando ad una potenziale perdita di diversità nutrizionale e probabilmente di qualità nutrizionale della dieta. Studi su bilancio dietetico e salute indicano che una maggiore diversità alimentare potrebbe essere associata ad una ridotta incidenza e mortalità per malattie degenerative (cancro e malattie cardiovascolari). (1)

Infatti, la qualità nutrizionale dei prodotti ortofrutticoli, da diversi anni, è sempre più apprezzata anche per la ricchezza di frutta e verdura in molecole antiossidanti, sostanze protettive nei confronti di gravi patologie degenerative: sostanze come vitamina C, composti fenolici, carotenoidi, svolgono un

fondamentale ruolo nel metabolismo dell'uomo nel prevenire varie forme di tumore, malattie cardiovascolari, invecchiamento precoce delle cellule e tutti quei danni ampiamente attribuiti ai radicali liberi.

I livelli dei singoli antiossidanti presenti negli alimenti, però, non necessariamente riflettono in maniera esaustiva la loro capacità antiossidante totale, misura sia delle singole attività delle diverse specie antiossidanti sia delle loro azioni sinergiche e/o di riciclo.

In questa ottica, la valutazione della capacità antiossidante totale di un alimento assume una nuova importanza come parametro aggiuntivo nella determinazione della qualità nutrizionale di un prodotto.

In un'ottica generale, questa ricerca è stata finalizzata alla valorizzazione dell'eccellenza italiana nel settore agro-alimentare

Dal punto di vista operativo, lo studio è nato un importante razionale scientifico che ha avuto come obiettivo quello di valutare le qualità nutrizionali e salutistiche (tramite la misura della capacità antiossidante totale dei prodotti presi in esame) di prodotti locali di origine vegetale ottenuti in aree geografiche scelte.

Uno dei prodotti tipici italiani particolarmente interessante da un punto di vista nutrizionale è il carciofo (*Cynara Scolimus L.*).

Infatti l'Italia è uno dei paesi più importanti del mondo per la coltivazione di questa ortiva che interessa soprattutto le aree centro-meridionali e si inserisce al terzo posto dopo il pomodoro e la patata.

Il carciofo è una pianta erbacea perenne, originaria del Nord Africa e largamente diffusa nel bacino mediterraneo che cresce spontaneamente nelle zone più calde.

Il nome del genere sembra derivare da "cinis" perché il terreno destinato alla coltivazione di questa ortiva veniva cosparso di cenere.

Secondo la mitologia il nome deriverebbe da Cynara, una bella fanciulla dai capelli color cenere trasformata in carciofo da Giove che ne era innamorato.

In greco, il termine *kinara* sembra essere comune a molte piante spinose, mentre il termine *scolymus*, sempre greco, significa appuntito e probabilmente fa allusione alla forma appuntita di alcuni tipi di carciofo.

La sua coltivazione per uso alimentare è quasi certamente dovuta agli italiani a partire dal XV secolo nella zona di Napoli dove era stata introdotta da Filippo Strozzi. Da qui si diffuse in Toscana e successivamente nel Veneto nel 1493.

Dall'Italia si è diffuso in Europa (Francia, Inghilterra) e al di là dell'Oceano seguendo le orme degli emigrati.

A livello mondiale, i Paesi in cui la coltivazione del carciofo è maggiormente diffusa sono l'Italia, la Spagna, la Francia, la Grecia, ed il Marocco.

Secondo una stima della FAO, l'Italia ne è il primo produttore al mondo: si calcola che circa il 50% di tutta la produzione mondiale di carciofo provenga dall'Italia, in particolare dal Lazio, dalla Toscana, Sicilia, Sardegna e Puglia.

La produzione di questa ortiva è molto importante dal punto di vista economico; la sua produzione è terza dopo quella di pomodori e patate.

L'epoca di produzione va da ottobre a maggio per le specie precoci e da fine maggio a giugno per quelle tardive.

Sebbene sia un alimento stagionale, in Italia, il suo consumo medio giornaliero pro-capite è di 2.2 g .

Il carciofo possiede numerosi pregi nutrizionali essendo ricco di acqua (91% di parte edibile) e di sali minerali, ma anche di vitamine, carotenoidi (luteina) e polifenoli (acidi idrossicinnamici e flavonoidi).

Dal punto di vista nutritivo e dietetico il carciofo, per l'abbondanza di sostanze azotate, è un alimento plastico e molto energetico per il suo contenuto di carboidrati.

Tra questi ultimi è presente l'inulina che aumenta quando i capolini vengono sottoposti a basse temperature durante la maturazione. L'inulina non incrementa i livelli di glicemia, per questa ragione il carciofo può essere consumato senza riserve dai soggetti diabetici

Inoltre, per l'elevato contenuto in fibra (il 65% è costituito da cellulosa, il 21% da emicellulose e il 14% da lignina), il carciofo è molto utile per il suo effetto antistipsi e per gli effetti benefici sul metabolismo glucidico e lipidico. L'apporto

calorico per 100 g di prodotto edule è di 40 calorie e rispetto ad altri ortaggi è ricco di fibre, proteine, inulina, P, K, Fe, Cu, Zn, Na e niacina.

Il suo contenuto lipidico è basso, così quello in vitamina A, B2, C e zolfo. Tra gli amminoacidi presenti quello contenuto in maggior quantità è l'acido aspartico, glutammico, arginina, prolina, leucina, lisina, alanina, L-asparagina, in ordine decrescente.

Il carciofo è un ortaggio che si distingue per il suo caratteristico sapore amarognolo dovuto alla presenza della cinaropicrina, un sesquiterpenoide, e di diverse molecole appartenenti alla famiglia dei polifenoli. Il 2% del peso fresco del carciofo è costituito da molecole polifenoliche, principalmente acidi idrossicinnamici. (2)

Gli estratti da carciofo (*Cynara Scolimus L.*) sono utilizzati fin dal 4° secolo a. C. come rimedio officinale epatoprotettivo. Le proprietà terapeutiche sembrano essere, tra le altre, quella aperitiva (stimola l'appetito), colagoga-coleretica (aumenta l'escrezione biliare), diuretica, epatoprotettiva, ipocolesterolizzante, ipoglicemizzante e lassativa. Una delle ipotesi attualmente in studio è che le suddette proprietà siano, almeno in parte, ascrivibili ai costituenti polifenolici del carciofo, in particolare a quelli più rappresentativi in termini di contenuto, ovvero agli acidi idrossicinnamici (3, 4) ed alle loro proprietà antiossidanti.

Da qui nasce l'interesse scientifico per la valorizzazione di questo prodotto così poco commercializzato e studiato. Quindi, questa ricerca si sviluppa dall'esigenza di incrementare il suo consumo proprio per le sue numerose potenzialità nei confronti della salute del consumatore (5).

1.0.0 Introduzione

Il ruolo dell'alimentazione nella salute umana non è solo legato alle carenze alimentari e ai disturbi di comportamento quali obesità, anoressia, ma differenti studi negli ultimi decenni hanno evidenziato la possibile connessione tra alimentazione e malattie degenerative quali il diabete, le malattie cardiovascolari, i tumori. Dal *The world health report 2000*, il 41% di malattie degenerative è legato a problemi alimentari. Frutta e verdura sono ricchi di molecole bioattive, in grado di bloccare l'insorgere di tali malattie degenerative a partire dalle strutture cellulari. Tale azione "benefica/preventiva" potrebbe essere spiegata dall'alto contenuto, in frutta e verdura, di micronutrienti ad azione antiossidante vitamina C, polifenoli, flavonoidi, carotenoidi, acidi idrossicinnamici. L'insieme di tali costituenti presenta una plurifattorialità di azione antiossidante, anticancerogenica, antimutagenica, antineoplastica. Tale multifattorialità potrebbe conferire un possibile grado di chemioprevenzione al fine di prevenire/rallentare l'inizio, l'avanzamento e la progressione del processo cancerogenico. Vari studi epidemiologici ed evidenze sperimentali hanno mostrato la correlazione tra la relazione del cibo e l'incidenza delle neoplasie. E' stato studiato il ruolo dell'alimentazione in tutte le tappe della cancerogenesi, l'esposizione a cancerogeni ambientali, il processo di differenziazione, la riparazione dei danni al DNA, l'attivazione di meccanismi di apoptosi, la trasduzione del segnale di vari fattori di crescita. Molte ricerche, infatti, hanno dimostrato che un uso ricorrente/continuo di specifici alimenti (frutta e verdura) potrebbe ritardare l'insorgere di alcune forme cancerose, per esempio della bocca, della laringe, dell'esofago, dello stomaco e dell'intestino. Al contrario c'è un forte connessione fra le diete ricche di grassi saturi e alcune forme di cancro.

Un possibile effetto chemiopreventivo potrebbe essere attribuito al carciofo, grazie al profilo di molecole bioattive presenti: principalmente polifenoli, quali acidi idrossicinnamici (acido clorogenico e altri acidi mono e di-caffeilchinici) e flavonoidi (luteolina e apigenina). Componenti chiave per tali proprietà sono gli acidi caffeilchinici, a cui sono state attribuite attività antiossidante, antiproliferative e apoptotiche (6,7). E' stato dimostrato come gli estratti di

carciofo riducano la vitalità cellulare e presentino attività apoptotica su linee cellulari cancerose di cancro al fegato: l'ingestione di carciofo potrebbe potenzialmente ridurre il rischio di cancro epatico (7). I risultati di uno studio di biodisponibilità *in vivo* in soggetti umani condotto da Azzini et al. 2007 hanno mostrato per la prima volta un *pathway* di assorbimento degli acidi idrossicinnamici contenuti in campioni di carciofo cotto (8). Quindi, la caratterizzazione chimico-nutrizionale del carciofo e l'effetto protettivo di alcuni suoi principali costituenti potrebbero conferire al carciofo l'etichetta di cibo funzionale naturale.

Quindi, le evidenze sia epidemiologiche (9, 10, 11) che sperimentali (12) che la dieta sia in grado di fornire molecole bioattive in grado di prevenire la formazione e la progressione delle malattie degenerative, hanno focalizzato l'interesse della ricerca sullo studio dei rapporti tra alimentazione, stato red-ox e patologie.

1.1.0 Stato red-ox, ossidanti e antiossidanti

Lo stato red-ox viene definito come l'equilibrio dinamico presente nelle cellule e nei fluidi biologici tra specie ossidanti e antiossidanti. Questa definizione implica il fatto che in condizione fisiologiche, le cellule possiedano dei sofisticati sistemi di controllo in grado di modulare in maniera efficace lo stato red-ox. La regolazione avviene in modo continuo attraverso il controllo della produzione di specie ossidanti e l'induzione dei sistemi di difesa antiossidante secondo meccanismi non ancora perfettamente delineati.

1.1.1 Gli ossidanti

Per definizione gli ossidanti sono composti in grado di ossidare altri composti tramite l'estrazione di uno o più elettroni (13).

La molecola dell'ossigeno ha una struttura molecolare con due elettroni non accoppiati con spin paralleli tra loro (stato basale di tripletto $^3\text{O}_2$). Questa particolare configurazione elettronica lo rende relativamente inerte nei confronti della maggior parte delle molecole biologiche.

L'ossigeno, quindi, per poter reagire con altre molecole ha due possibilità: subire una inversione di spin di uno dei due elettroni sull'orbitale esterno, o accettare un elettrone per volta. Nel primo caso sono necessarie forti quantità di energia, capaci di fargli compiere la transizione da stato di tripletto (stato basale) a stato di singoletto (stato eccitato $^1\text{O}_2$). Nel secondo caso l'addizione elettronica porta alla formazione di una serie di prodotti intermedi di riduzione, le Specie Reattive dell'Ossigeno (SRO), che comprendono sia i cosiddetti radicali liberi che composti non radicalici. Per definizione, un radicale libero è un atomo o una molecola che possiede un elettrone spaiato nell'orbita esterna, caratteristica che lo rende particolarmente reattivo. Le SRO sono costantemente generate in vivo nel corso di normali processi biologici (respirazione cellulare, contrazione dei muscoli, processi di difesa immunitaria etc.) e, in condizioni fisiologiche, rappresentano un aspetto importante ed irrinunciabile dell'economia cellulare.

La formazione esogena di SRO può essere iniziata da tossine esogene (farmaci, pesticidi etc.), da esposizione a radiazioni ionizzanti, da inquinanti atmosferici (biossido d'azoto, ozono), dal fumo di sigarette e dalla luce solare.

I principali radicali liberi presenti nell'organismo comprendono il radicale idrossile, $\text{OH}^\bullet$, l'anione superossido, $\text{O}_2^{\bullet -}$, il perossile, $\text{RO}_2^\bullet$, l'alcossile, $\text{RO}^\bullet$, e l'ossido nitrico, $\text{NO}^\bullet$. Delle SRO fanno parte, come detto, anche specie reattive che non sono radicali liberi, ma altamente ossidanti, come ad esempio il perossido d'idrogeno, H_2O_2 , l'ossigeno singoletto, $^1\text{O}_2$, l'ozono, O_3 e il perossinitrito, ONOO^- .

1.1.2 Gli antiossidanti

Per definizione un antiossidante è una sostanza che, presente a basse concentrazioni rispetto al substrato, è in grado di impedire o ritardare l'ossidazione del substrato. L'attività di un antiossidante è influenzata dalla sua azione come donatore di idrogeno o di elettroni, dalla stabilità del radicale che si forma in seguito alla reazione con gli ossidanti, dalla capacità di reagire con altri antiossidanti ed infine dall'abilità di chelare metalli di transizione (13).

Il sistema fisiologico di difesa antiossidante consiste in antiossidanti endogeni ed esogeni che collaborano nella difesa delle biomolecole nei confronti degli insulti ossidativi. Gli antiossidanti endogeni sono essenzialmente enzimi, quelli esogeni includono nutrienti e non-nutrienti introdotti nell'organismo attraverso la dieta.

Gli antiossidanti endogeni comprendono sostanzialmente sistemi enzimatici: superossido dismutasi (SOD), catalasi (CAT) e glutatione perossidasi (GSPx).

Gli antiossidanti esogeni possono essere suddivisi in base al loro meccanismo d'azione in tre gruppi: quelli che reagiscono direttamente con i radicali liberi trasformandoli in molecole meno reattive, neutralizzandoli (vitamina C, vitamina E, vitamina A, carotenoidi e composti fenolici); quelli che svolgono un'azione chelante nei confronti di ioni metallici come ferro e rame evitando le reazioni di Fenton (albumina, transferrina e ceruloplasmina); minerali che rappresentano componenti strutturali di enzimi antiossidanti (rame, zinco, manganese e selenio).

La cooperazione tra i diversi antiossidanti fornisce all'organismo una protezione contro le SRO di gran lunga maggiore rispetto a quella fornita dai singoli componenti. Un esempio tipico di questo effetto sinergico è rappresentato dall'interazione tra glutatione, ascorbato e α -tocoferolo: l' α -tocoferolo ossidato viene rigenerato grazie all'acido ascorbico che si ossida ad acido deidroascorbico sul quale agisce il glutatione, come antiossidante, che viene rigenerato enzimaticamente dalla GSPx.

I rapporti sinergici e di riciclo tra gli antiossidanti plasmatici e cellulari sembrerebbero rivestire un ruolo fondamentale nella difesa dell'organismo contro gli insulti ossidativi. A livello plasmatico, per esempio, la presenza di una serie di molecole antiossidanti caratterizzate da potenziali red-ox diversi, da caratteristiche chimiche, strutturali e da solubilità diverse che ne garantiscono una localizzazione specifica forniscono una vasta gamma di risorse, ancora non perfettamente delineate, utilizzabili dall'organismo per modulare lo stato red-ox nei tessuti e nei fluidi biologici.

In questa ottica, la misura della Capacità Antiossidante Totale (TAC) fornisce delle informazioni biologicamente utili sull'entità cumulativa delle difese antiossidanti della matrice biologica.

La TAC è modulata sia dai radicali in eccesso, sia dagli antiossidanti assunti con la dieta e può essere considerata maggiormente rappresentativa del bilancio in vivo delle specie ossidate e dei composti antiossidanti presenti, conosciuti e sconosciuti, misurabili e non misurabili, rispetto alla valutazione delle concentrazioni dei singoli antiossidanti.

La TAC misura sia le singole attività delle diverse specie antiossidanti presenti sia le loro eventuali azioni sinergiche e/o di riciclo. La valutazione della TAC rappresenta un approccio relativamente recente, sebbene i primi lavori risalgano al 1995 (14), negli ultimi anni il suo utilizzo è cresciuto in maniera esponenziale, trovando il suo principale campo di utilizzo nella valutazione del ruolo svolto dalla dieta nella modulazione nutrizionale dello stress ossidativo (15).

1.2.0 Stress ossidativo, danno ossidativo e patologie

Il termine “stress ossidativo” indica la profonda alterazione dell’equilibrio dinamico esistente tra molecole antiossidanti e ossidanti a favore dei secondi con generazione di potenziali ossidativi nei distretti cellulari e nei fluidi biologici. Esiste una vasta mole di evidenze scientifiche che suggerisce il coinvolgimento diretto e/o indiretto dello stress ossidativo nell’insorgenza e nello sviluppo di una serie di patologie quali aterosclerosi, cancro, diabete etc. Il ruolo svolto dallo stress ossidativo è chiaramente diverso a seconda della malattia, ma può essere ricondotto ad una serie di modificazioni a carico di molecole biologiche come acidi grassi polinsaturi (PUFA), acidi nucleici, proteine e carboidrati, modificazioni che possono essere causa di alterazioni profonde dei processi metabolici e funzionali fino alla morte cellulare per necrosi o apoptosi .

1.3.0 Modulazione nutrizionale dello stress ossidativo

Un ruolo di grande importanza nella modulazione dello stress ossidativo è esercitato dalla dieta, tramite la quale l’organismo introduce sia substrati ossidabili che sostanze antiossidanti. Le numerose evidenze epidemiologiche (11) hanno mostrato come la dieta, attraverso molecole bioattive, moduli e prevenga la formazione e la progressione delle malattie degenerative, indirizzando l’interesse

della ricerca sullo studio dei rapporti tra alimentazione, stress ossidativo e patologie.

1.3.1 Ipotesi lipidica

Le evidenze che correlano il consumo elevato di acidi grassi saturi nella dieta con malattie cardiocircolatorie risalgono alla metà del secolo scorso ed hanno permesso di gettare le basi della ricerca moderna in campo nutrizionale. Negli anni '60, Ancel Keys formulò la cosiddetta “ipotesi lipidica” sulla base di uno studio condotto tra il 1958 e il 1964 in 7 paesi del mondo (Grecia, Italia, Jugoslavia, Giappone, Finlandia, Olanda e Stati Uniti d'America) su un totale di 12763 uomini tra i 40 e i 59 anni (16). L'ipotesi di Keys asseriva che la diversa incidenza di mortalità per malattie cardiovascolari tra nord e sud Europa, potesse essere parzialmente spiegabile sulla base delle diverse abitudini dietetiche e principalmente con il maggior consumo di acidi grassi saturi nei paesi del nord Europa rispetto ai paesi dell'area mediterranea. Negli ultimi 50 anni una vasta mole di studi epidemiologici hanno evidenziato come il modello alimentare di tipo mediterraneo sia associato ad una minore incidenza di mortalità per malattie degenerative (17, 18).

Per definizione, la “dieta mediterranea” corrisponde al tipo di alimentazione consumato nell'area di crescita delle olive delle regioni mediterranee tra gli anni '50 e '60 dopo la Seconda Guerra mondiale. La dieta tradizionale dei paesi mediterranei era caratterizzata da un ridotto consumo di proteine animali, da un moderato consumo di vino, latte e prodotti caseari, da un elevato rapporto tra acidi grassi monoinsaturi e saturi, da un elevato consumo di legumi, cereali, olio di oliva, spezie, e di frutta e verdura. L'alimentazione mediterranea ricava la maggior parte dell'energia dai carboidrati (circa il 46%), mentre la quota lipidica è rappresentata dai grassi saturi (23% dell'energia totale). Si realizzano così due importanti effetti sinergici: da una parte l'elevato consumo di carboidrati complessi a discapito dei grassi saturi tende a mantenere bassi i livelli colesterolemici e glicemici; dall'altra parte il consumo di frutta e verdura fornisce un adeguato apporto di vitamine.

1.3.2 Ipotesi antiossidante.

Successivamente all'ipotesi lipidica di Keys e all'affermarsi del modello alimentare mediterraneo come strategia vincente nella prevenzione delle patologie degenerative, numerose evidenze epidemiologiche evidenziarono l'esistenza di una correlazione inversa tra consumo di frutta e verdura e diminuzione di mortalità dovuta a malattie degenerative (19, 20) evidenziando l'importanza del ruolo svolto dai cibi di origine vegetale nell'ambito dell'effetto protettivo della dieta.

Con una serie di studi condotti a partire dal 1986 in 16 paesi europei (21, 22) facenti parte di un più grande progetto noto come "progetto MONICA" atto a monitorare (MONI) cause e andamento delle malattie cardiovascolari (CA) (23), furono correlati i livelli degli antiossidanti plasmatici con la mortalità per cardiopatia ischemica (IHD) nei soggetti partecipanti allo studio. Lo studio in questione rivelò l'esistenza di una correlazione inversa, statisticamente rilevante, tra la mortalità per IHD e la concentrazione plasmatica di antiossidanti nelle popolazioni che fanno largo consumo di composti di origine vegetale ricchi in antiossidanti.

Sulla base di questi risultati venne formulata l' "ipotesi antiossidante" secondo la quale il rischio minore di mortalità per IHD sarebbe attribuibile agli elevati livelli di antiossidanti plasmatici derivanti dall'ingestione di frutta e verdura che, modulando lo stato red-ox, impedirebbero l'insorgere dello stress ossidativo e di conseguenza lo sviluppo della patologia (16).

1.3.3 Il Paradosso Francese

Nel 1979 St Leger ed altri proposero la prima associazione tra la componente non alcolica del vino ed il ruolo protettivo mostrato dal moderato consumo di vino nei confronti delle malattie cardiovascolari (24).

Questo studio condotto analizzando dati provenienti da 17 paesi mostrò un' associazione inversa tra incidenza delle malattie cardiovascolari e consumo di vino portando alla formulazione del cosiddetto "Paradosso francese": una bassa

incidenza di malattie cardiache registrate in alcune regioni della Francia, a fronte di alti livelli plasmatici di colesterolo e consumi elevati di grassi saturi.

Successivamente nel 1993, Frankel e colleghi (25) mostrarono come, alcuni composti appartenenti alla frazione non alcolica del vino rosso, i composti fenolici, inibissero l'ossidazione ex vivo delle LDL in maniera più efficace rispetto all' α -tocoferolo, facendo supporre un loro ruolo attivo nell'effetto protettivo esercitato dal vino nei confronti delle malattie cardiache ipotizzato da St Leger con il "Paradosso francese".

I composti fenolici (CF), considerati fino ad allora solo a causa di proprietà secondarie come aroma o colore, divennero oggetto di una intensa ricerca scientifica atta a studiare la relazione tra le loro proprietà antiossidanti e la difesa contro alcune importanti malattie degenerative.

1.4.0 I composti fenolici (CF)

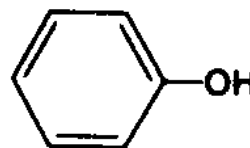
I CF sono prodotti del metabolismo secondario delle piante entrano, infatti, a far parte della catena di trasporto degli elettroni, intervengono nei processi di riproduzione e di crescita delle piante come cofattori degli ormoni o come ormoni essi stessi (26). Difendono le piante conferendo resistenza contro i patogeni e i predatori (27,28) e sono responsabili della colorazione di molti fiori e frutti.

1.4.1 I polifenoli: struttura, classificazione e vie biosintetiche

La caratteristica chimica dei composti fenolici è la presenza di un anello aromatico con un sostituito ossidrilico (Fig.1); nel caso in cui i gruppi ossidrilici siano più di uno si parla di polifenoli.

I fenoli costituiscono un gruppo chimicamente eterogeneo: tra essi sono presenti molecole lipofile, acidi carbossilici, glucosidi solubili in acqua e grandi polimeri insolubili.

*Figura 1 – Struttura chimica di fenoli
semplici C6-C1*



Alla famiglia dei fenoli appartengono diverse classi, ovvero fenoli semplici, acidi fenolici, acidi idrossicinnamici, cumarine, cromoni, flavonoidi, isoflavonoidi, lignine, melanine, tannini condensati.

I fenoli rivestono ruoli diversi nella pianta a seconda della loro struttura chimica; essi costituiscono una difesa contro erbivori, patogeni e piante competitive, svolgono azione di sostegno meccanico, ed agiscono come chemioattrattori di insetti impollinatori .

Nella cellula vegetale i fenoli si trovano in forma coniugata con molecole mono o disaccaridi, in genere glucosio.

La formazione di glucosidi ne aumenta la solubilità e ne permette il trasporto nel vacuolo in modo da non interagire con i processi enzimatici vitali del metabolismo vegetale.

La biosintesi di fenoli è un processo strettamente correlato ai diversi stadi fisiologici della pianta (germinazione, crescita e sviluppo). Essa segue due diverse vie: la via dell'acido scichimico e quella dell'acido malonico. (fig.2)

Di queste due vie, quella dell'acido malonico è poco rilevante nelle piante, mentre ha una grande importanza nel metabolismo dei funghi.

La via dell'acido scichimico inizia a partire da carboidrati semplici e conduce alla formazione di amminoacidi aromatici. Uno degli intermedi della reazione è l'acido schichimico da cui la via biosintetica prende il nome.

L'acido scichimico è un prodotto del ciclo di Calvin che, in seguito a reazioni successive, porta alla formazione di fenilalanina. Nella maggior parte delle specie vegetali il passaggio chiave è rappresentato dalla conversione della fenilalanina in acido cinnamico, catalizzata dall'enzima fenilalanina-ammonio-liasi (PAL) (fig.3)

La fenilalanina costituisce il precursore degli acidi idrossicinnamici, dei flavonoidi e dei polimeri fenolici non idrolizzabili (lignine, tannini condensati).

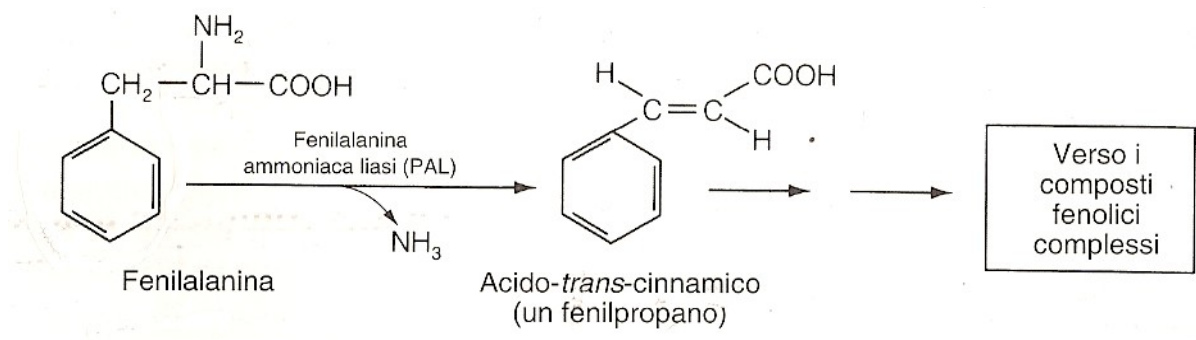


Figura 2 – Deaminazione della fenilalanina ad acido trans-cinnamico catalizzata dalla fenilalanina ammoniaca-liasi (PAL)

Anche la tirosina potrebbe essere considerata un precursore degli acidi cinnamici anche se non è certa l'esistenza dell'enzima tirosina ammonio-liasi (TAL) in grado di catalizzare la formazione del derivato cinnamico a partire dalla tiroxina. I fenoli mostrano un discreto grado di reattività che li porta da una parte a formare sostanze più complesse, dall'altra a degradarsi in composti sempre più semplici, come i derivati benzoici, fino alla formazione dell'anidride carbonica.

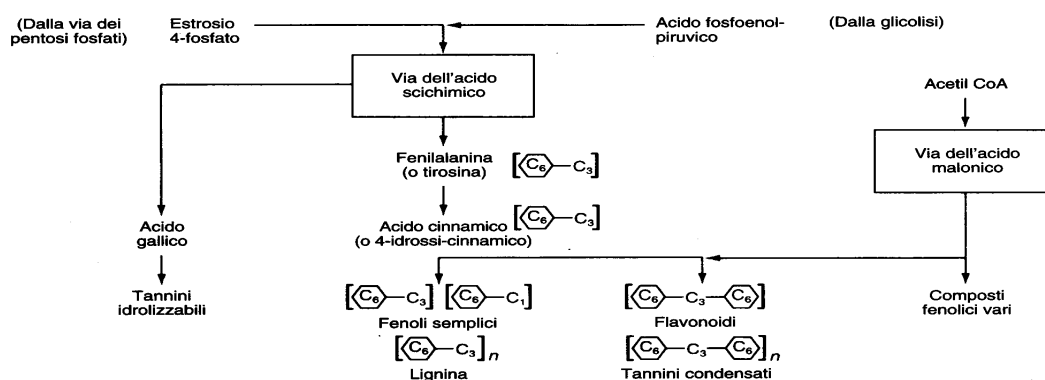


Figura 3 – Biosintesi dei fenoli

1.4.2 Attività biologica

Le prime ricerche sull'attività biologica dei CF risalgono al 1936, quando Rusznyk e Szent-Gyorgyi (29) osservarono che una miscela di due flavanoni, estratta dai peperoni, inizialmente chiamata “vitamina P”, diminuiva la permeabilità e la fragilità capillare in cavie incapaci di sintetizzare vitamina C, alimentate con dieta in grado di causare lo scorbuto. Questa definizione cadde successivamente in disuso, non possedendo, i flavonoidi, caratteristiche tipiche delle vitamine.

Studi successivi hanno permesso di attribuire numerose proprietà ai CF, tra cui attività antinfiammatoria e antimicrobica (30, 31).

Evidenze epidemiologiche hanno suggerito l'esistenza di una correlazione tra i CF della dieta e la protezione nei riguardi di alcune patologie degenerative. Nel 1993, Hertog e colleghi raccolsero i dati provenienti da uno studio iniziato nel 1960 su 878 uomini tra i 40 e i 59 anni in Zutphen, Olanda (32). La maggiore fonte di flavonoidi di queste popolazioni era costituita da tè, cipolle e mele. I risultati ottenuti mostrarono una significativa relazione inversa tra l'assunzione di flavonoidi e la mortalità per malattie cardiovascolari.

A parziale conferma dei risultati ottenuti da Hertog, uno studio condotto in Finlandia su 5133 soggetti (30-69 anni) sani seguiti per 26 anni ha mostrato una relazione inversa tra consumo dietetico di CF e mortalità per tutte le cause e per IHD (52); tra il primo ed il quarto quartile di consumo di CF, il rischio di mortalità totale e per IHD era più basso rispettivamente del 48% e 31% rispetto ai controlli. L'attenzione rivolta alle molecole polifenoliche in generale è dovuta ai risultati di alcuni studi osservazionali di popolazione secondo i quali tali sostanze, tra cui gli acidi idrossicinnamici, sarebbero coinvolte nella protezione dal rischio di alcune patologie cronico-degenerative quali l'aterosclerosi (34), il cancro e l'osteoporosi (35, 36, 37).

La base concettuale di questa associazione è stata attribuita alla capacità antiossidante dei polifenoli. Infatti è ormai accertato che i danni provocati dai

radicali liberi, se non efficacemente contrastati dalle difese antiossidanti, siano coinvolti nell'insorgenza e nel progresso proprio di quelle patologie la cui insorgenza è stata trovata essere inversamente associata al consumo di polifenoli. (38)

Evidenze sperimentali suggeriscono per i CF un ruolo preventivo nei confronti della patologia neoplastica. Uno dei meccanismi proposti riguarda la modulazione dell'attività di sistemi enzimatici che metabolizzano i carcinogeni o i pro-carcinogeni a genotossine. In questo modo l'attivazione dei carcinogeni può essere inibita, o possono essere convertiti in composti meno reattivi prima che reagiscano con il DNA dando avvio al processo neoplastico.

1.4.3 Attività antiossidante

Il ruolo protettivo attribuito ai CF sembrerebbe essere principalmente legato alle loro capacità antiossidanti, molto ben delineate in modelli in vitro (39). I CF sono ottimi scavenger dell'anione superossido (40, 28), del radicale idrossile (41, 42) e del radicale perossile (43, 44). D'altra parte grazie alla loro alta affinità per i metalli, i CF possono chelare gli ioni ferro e rame impedendo la reazione di Fenton, una delle più importanti vie di formazione delle SRO (45). I CF possono inibire l'ossidazione delle LDL (46, 47) e impedire i processi di adesione e aggregazione delle piastrine (48, 49) coinvolti nell'insorgenza dell'aterosclerosi. Oltre ad un'azione antiossidante diretta, i CF esercitano un effetto antiossidante indiretto riducendo il numero delle SRO prodotte durante la cascata dell'acido arachidonico, inibendo in vitro la lipoossigenasi e la cicloossigenasi (50, 51) e di conseguenza diminuendo la produzione di sostanze chemiotattiche ed infiammatorie (52, 53). I CF sono in grado di inibire, inoltre, la perossidazione lipidica (54).

Se da un lato le proprietà antiossidanti dei CF sono ben delineate in vitro, solo recentemente sono stati pubblicati studi che hanno mostrato come l'ingestione di bevande ad alto contenuto fenolico, come tè (55) e vino (56) sia in grado di

aumentare le difese antiossidanti plasmatiche in vivo nell'uomo. Tali studi hanno fornito una prova indiretta della capacità dei CF di modulare lo stato red-ox plasmatico, anche se, un'evidenza diretta e chiara che correli l'aumento delle difese antiossidanti con la presenza nel plasma dei CF è ancora assente.

Inoltre sembrerebbero implicati nella modulazione del sistema della detossificazione endogena, nella regolazione dell'espressione genica, comune ai meccanismi di proliferazione cellulare e apoptosi (38, 57) e nel metabolismo ormonale (58), come anche nella modulazione della sintesi del colesterolo e nella regolazione della pressione sanguigna. (6).

Molti studi hanno rivelato che il potenziale biologico relativo di questi composti è una funzione diretta oltre della struttura chimica anche della loro lipofilità. Probabilmente l'attività citoprotettiva dei polifenoli è dovuta ad entrambe queste caratteristiche (59).

Le proprietà antiossidanti ed epatoprotettive di un estratto standardizzato di carciofo ad alto contenuto di acidi idrossicinnamici, sono state valutate in uno studio di Gebhardt (54) mediante l'utilizzo di una linea cellulare di coltura primaria di epatociti di ratto Sprague- Dawley utilizzati come donatori.

La protezione esercitata dall'estratto di carciofo nei confronti del danno cellulare era verificata trattando le cellule con un agente ossidante, il ter-butil-idroperossido (t-BHP) ed osservando la riduzione degli effetti ossidativi rispetto a un controllo misurando la deplezione del glutathione intracellulare (GSH) e la produzione di malondialdeide (MDA).

I risultati mostravano che negli epatociti trattati con estratti di carciofo si preveniva sia la produzione di MDA che la perdita di GSH.

Lo stesso esperimento condotto con i principali costituenti polifenolici dell'estratto identificati mostrava la seguente scala di attività: luteolina > cynarina > clorogenico > caffeico.

1.4.4 Gli acidi idrossicinnamici

Tra le molecole polifenoliche di particolare interesse sono gli acidi idrossicinnamici che possono formarsi sia per β -ossidazione degli acidi cinnamici, che per aromatizzazione diretta dell'acido scichimico. Gli acidi idrosicinnamici derivati dall'acido cinnamico hanno una struttura C6-C3 e si trovano nella parete cellulare delle piante, dove giocano un ruolo molto importante nella lignificazione, costituendo un centro di nucleazione per l'attacco dei precursori della lignina. (60)

L'acido più comune, precursore degli altri membri di questa classe di polifenoli è l'acido p-cumarico. Altrettanto diffusi sono l'acido caffeico, l'acido ferulico e l'acido sinapico. Tali molecole si trovano spesso in forma di esteri dell'acido chinico, o come glicosil-esteri o metil-esteri o glucosidi.

La forma esterificata più comune finora nota è l'acido clorogenico, derivato dall'esterificazione dell'acido caffeico ad opera dell'acido chinico.

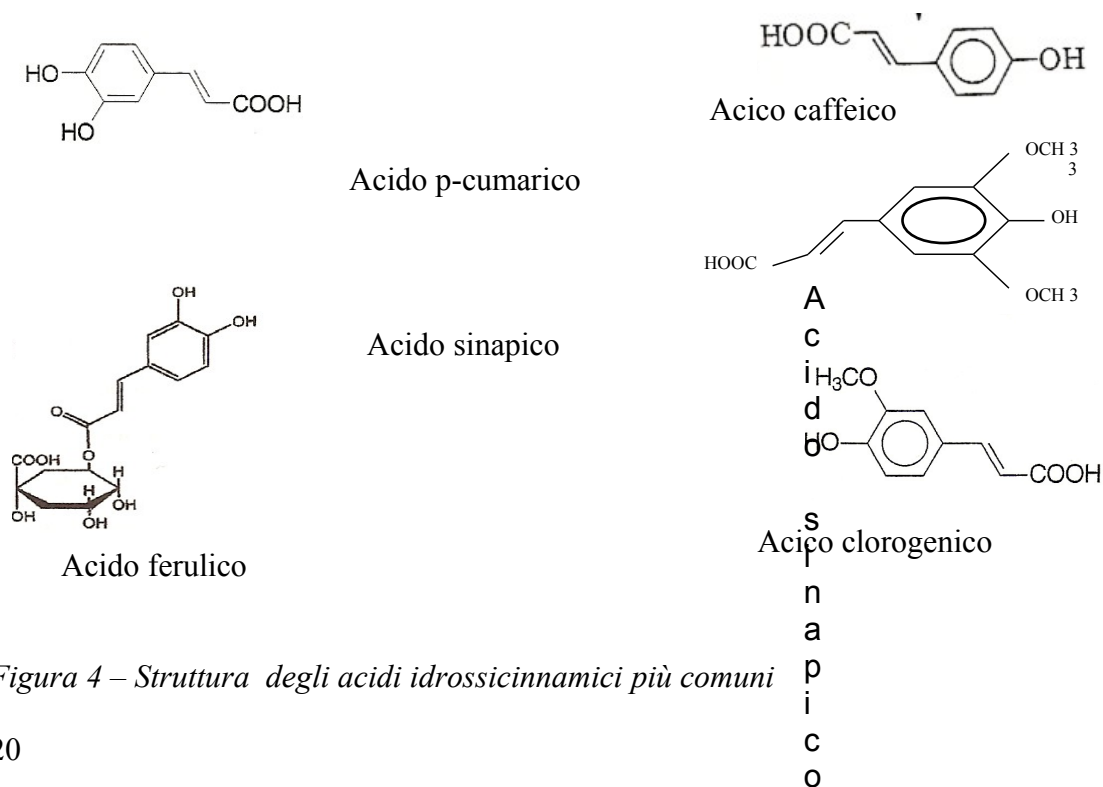


Figura 4 – Struttura degli acidi idrossicinnamici più comuni

Tra gli enzimi coinvolti nella biosintesi degli acidi idrossicinnamici, oltre ai già citati PAL e TAL devono essere menzionati l'enzima cinnamico-4-idrossilasi e il cumarico-3- idrossilasi e il catecol-O-metil-transferasi. I primi due catalizzano, rispettivamente, la reazione di formazione dell'acido p-cumarico e dell'acido caffeico mentre il terzo conduce alla formazione degli acidi sinapico e ferulico.

L'ipotesi più accreditata è che questi enzimi esplicino la loro attività a livello degli acidi liberi e che le reazioni di glucosilazione ed esterificazione avvengano allo stadio finale della sequenza biosintetica. (31)

Gli acidi idrossicinnamici sono costituenti importanti (fisicamente, chimicamente e biologicamente) della parete cellulare delle piante.

Generalmente gli acidi idrossicinnamici si trovano in forma legata attraverso legami idrogeno o covalenti sia nella frazione alcool-solubile, che in quella alcool-insolubile dove la presenza degli acidi ferulico, sinapico e cumarico è da mettere in relazione con il loro ruolo di precursori della lignina.

Gli acidi idrossicinnamici arrivano ad un contenuto pari a 0.5–2 g per kg di peso fresco di acidi idrossicinnamici nei frutti che ne contengono le più alte concentrazioni (kiwi, mele, ciliegie, mirtilli, prugne). L'acido caffeico, nella forma libera ed esterificata (acido clorogenico), è generalmente il più abbondante acido idrossicinnamico contenuto nei frutti (75-100% degli acidi fenolici presenti).(Tabella 1)

	<i>Ac. Caffeico</i>	<i>Ac. Cumarico</i>	<i>Ac. Ferulico</i>	<i>Ac. Sinapico</i>
Melanzana	360-440	-	2	3
Pomodoro	42-56	5-25	3-7	-
Patata	39-280	0-4	5-28	0-8
Carota	23-141	0,5-2	4-10	-
Sedano	84-168	0,5-3	34-61	-
Fava	10-15	15-30	10-15	2
Lattuga	90-590	Tracce	-	-
Spinacio	-	0-100	3-38	-
Cavolfiore	1-90	6-80	0-80	4-94
Cavolo	0-62	0-69	1-56	12-76
Broccolo	10	14	31	97
Mela	52-190	15-22	4-8	- 21
Pera	43-108	8	-	-
Albicocca	167	Tracce	Tracce	-
Pesca	128	Tracce	Tracce	-
Finocchio	100	-	8	-

Tabella 1: Contenuto di derivati cinnamici in prodotti ortofrutticoli (mg/kg di sostanza fresca)

Gli acidi idrossicinnamici si trovano in ogni parte del frutto, sebbene la più alta concentrazione si trovi nelle parti più esterne del frutto maturo.

La loro concentrazione generalmente diminuisce durante la maturazione, ma la quantità totale aumenta con l'aumentare delle sue dimensioni.

1.4.5 *Biocinetica degli acidi idrossicinnamici*

Il termine “biocinetica” è preso in prestito dal mondo farmaceutico e sta ad intendere lo studio della farmacocinetica di sostanze che non possono essere definite farmaci, come ad esempio i metaboliti secondari delle piante, quali gli acidi idrossicinnamici.

La biocinetica comprende lo studio dell'assorbimento, del metabolismo, della distribuzione e dell'escrezione (ADME) di una sostanza che non ha proprietà terapeutiche conclamate.

Nei paragrafi seguenti si fornirà un quadro riassuntivo relativo allo stato attuale delle conoscenze di ADME degli acidi idrossicinnammici.

1.4.6 *Assorbimento e metabolismo intestinale*

L'assorbimento di una sostanza può avvenire, in dipendenza del suo pKa, sia al livello dello stomaco, sia nel tratto intestinale, specialmente nell'intestino tenue, al livello dell'ileo. Assorbimenti si osservano anche nel colon, ma spesso non riguardano la sostanza tal quale, ma un suo prodotto derivato dalla biotrasformazione ad opera della microflora batterica (61).

Le reazioni di biotrasformazione metabolica intervengono soprattutto al livello del reticolo endoplasmatico liscio del fegato, ma anche nel rene, nel polmone e nell'epitelio gastro-intestinale, sebbene in quantità più modeste.

L'assorbimento degli acidi idrossicinnamici è stato studiato mediante l'utilizzo di modelli sia *in vitro* che *ex vivo*.

Spencer e collaboratori (62), utilizzando un modello di intestino di ratto *ex vivo*, hanno osservato l'assorbimento di diversi acidi idrossicinnamici (l'acido caffeico, l'acido ferulico, l'acido sinapico, l'acido p-cumarico e l'acido clorogenico) attraverso il digiuno e l'ileo.

I loro esperimenti hanno mostrato una scala di assorbimento degli acidi idrossicinnamici nel digiuno secondo l'ordine: acido ferulico (0,16%) > acido p-cumarico (0,074%) > acido caffeico (0,038%) > acido clorogenico (0,002%).

Nell'ileo, l'andamento dell'assorbimento era simile a quello riscontrato nel digiuno: acido ferulico (0,019 %) > acido caffeico (0,006 %) > acido clorogenico (0,00056 %).

Gli agliconi erano assorbiti sia in quanto tali, sia dopo glucuronazione, in proporzioni variabili in funzione della struttura chimica. Ad esempio, l'acido clorogenico non subiva alcuna coniugazione mentre due diversi glucuronidi dell'acido caffeico erano identificati a concentrazioni due volte maggiori rispetto a quelle della relativa forma aglicone.

In un recente lavoro di Kern e collaboratori (63) è stato svolto uno studio *in vitro* mirato alla comprensione dei meccanismi di biotrasformazione che avvengono a livello dell'epitelio intestinale mediante l'uso di cellule Caco-2. La linea cellulare Caco-2 è una linea cellulare isolata da un'adenocarcinoma di colon umano in grado di differenziare spontaneamente, *in vitro*, esprimendo le caratteristiche morfologiche e funzionali dell'enterocita umano.

Le cellule erano incubate per 24 h con metil-ferulato, metil-sinapato, metil-caffeato e metil-p-cumarato o con ciascuno dei corrispondenti acidi idrossicinnamici. L'incubazione delle forme metilate conduceva alla formazione dei corrispondenti metil-idrossicinnammati-solfati e forme libere. Per quanto riguarda il tempo di assorbimento, i metaboliti del metil-caffeato compaiono dopo

solo 30 min dall'incubazione, quelli del metil p-cumarato e ferulato dopo 4 h e quelli del metil-sinapato dopo 6 h. L'incubazione con gli acidi idrossicinnamici liberi mostrava una scala di assorbimento secondo la quale acido ferulico (50 %) > acido sinapico (42%) > acido caffeico (10%). L'acido p-cumarico non era praticamente assorbito.

L'acido ferulico e l'isoferulico erano i soli metaboliti identificati dell'acido caffeico. Nessuna forma glucuronidata era identificata per nessuna delle molecole in studio.

I risultati ottenuti in questo studio hanno suggerito che un simile processo metabolico potrebbe avvenire negli enterociti umani e che l'intestino tenue potrebbe svolgere un ruolo importante nel metabolismo e biodisponibilità degli acidi idrossicinnamici.

Sempre utilizzando la linea cellulare Caco-2, Konishi e collaboratori (64) hanno studiato l'assorbimento di acido clorogenico e caffeico. I loro risultati mostravano che l'acido caffeico era più assorbito dell'acido clorogenico.

1.4.7 Escrezione urinaria degli acidi idrossicinnamici

Cremin e collaboratori (65) hanno misurato l'acido caffeico, clorogenico e ferulico in plasma e urine di tre volontari a cui erano somministrati 100 g di prugne equivalenti a 76 mg di acidi idrossicinnamici. Il prelievo di plasma era effettuato prima e dopo 2 ore dal pasto, mentre le urine erano raccolte prima e dopo 2 e 4 ore dal pasto. Di tutti gli acidi idrossicinnamici ricercati sia in forma libera che coniugata, solo l'acido caffeico coniugato era identificato nel plasma a concentrazione di circa 90 nmoli/L. Le analisi delle urine mostravano a 2 ore un picco di concentrazione rispetto al valore basale di tutte le molecole ricercate. L'acido caffeico era presente soprattutto in forma coniugata e a 2 ore raggiungeva in totale la concentrazione di 0.448 μ mol. L'acido ferulico totale era presente in concentrazione minore di 10 volte quelle del caffeico. L'acido clorogenico libero raggiungeva dopo 2 ore una concentrazione pari a circa 0.025 μ mol.

Wittemer e collaboratori (66) hanno valutato l'assorbimento, il metabolismo e la escrezione di due estratti di foglie di carciofo diversi per il loro contenuto di acidi

caffeilchinici. Lo studio è stato condotto sull'analisi di campioni di plasma e di urine di 14 volontari sani (7 maschi e 7 femmine). La dose somministrata dell'estratto A conteneva acidi caffeilchinici equivalenti a 107,0 mg di acido caffeico mentre l'estratto B conteneva acidi caffeilchinici equivalenti a 153,8 mg di acido caffeico. I campioni di plasma sono stati collezionati prima della somministrazione dell'estratto (tempo 0) e dopo 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24 ore. Le urine sono state collezionate dopo 24 ore. I risultati hanno mostrato che dopo la somministrazione dell'estratto A e B gli acidi caffeilchinici liberi non erano presenti in plasma ed urine, mentre si trovava nel plasma un metabolita, l'acido diidroferulico (DHFA). Dopo il trattamento con β -glucuronidasi sono stati trovati l'acido caffeico (CA) e i suoi prodotti O-metilati, acido ferulico (FA) e acido isoferulico (IFA). Inoltre erano identificate forme coniugate solfatate e glucuronidate di CA, diidrocaffeico (DHCA), FA, DHFA e IFA così come la forma non coniugata di DHFA dopo l'ingestione dell'estratto. I risultati hanno mostrato che la concentrazione plasmatica di CA, FA, IFA raggiungeva il massimo picco dopo 1 ore, 6.51 ng/mL, 8.89 ng/mL, 7.89 ng/mL rispettivamente. I picchi di concentrazione plasmatica di DHFA (27.56 ng/mL) e di DHCA (21.30 ng/mL) si osservavano dopo 6-7 ore dato che potrebbe indicare che dopo l'assorbimento nella parte alta dell'intestino, il colon potrebbe essere un altro sito di assorbimento degli acidi caffeilchinici.

Il rapido aumento delle concentrazioni plasmatiche dei coniugati di CA, FA e IFA suggeriscono che l'assorbimento ha luogo nella parte alta dell'intestino. Per formare questi metaboliti, le forme esterificate devono essere tagliate prima o subito dopo l'entrata nel sistema circolatorio. Dopo il rilascio di CA dagli acidi caffeilchinici, la glucuronazione potrebbe avvenire negli enterociti. Una volta entrati nel sistema circolatorio, i coniugati di CA potrebbero essere metilati durante il primo passaggio nel fegato.

Considerando le differenti quantità di acido caffeico equivalenti somministrate, le farmacocinetiche tra i due estratti non differivano in modo significativo.

Le analisi delle urine hanno mostrato che la quantità escreta di CA, DHCA, FA, DHFA, e IFA dopo 24 ore dall'ingestione era pari al 4.74% e 4.01% rispettivamente degli acidi caffeilchinici.

1.4.8 Biodisponibilità degli acidi idrossicinnamici

Con il termine “biodisponibilità” si definisce la frazione di sostanza somministrata che raggiunge la circolazione sistemica. Essa è chiaramente dipendente dalla via di somministrazione: per definizione, la biodisponibilità di una sostanza somministrata per via endovenosa è pari al 100%.

La biodisponibilità rappresenta un parametro di grande importanza poiché consente di valutare la quantità di sostanza realmente in grado di essere distribuita agli organi.

La biodisponibilità assoluta di una sostanza somministrata per via extravascolare dipende dal grado di assorbimento e di trasformazione metabolica, come anche dalle velocità di distribuzione e di escrezione che la riguardano.

Ad esempio, la biodisponibilità di una sostanza somministrata per via orale è influenzata da fattori sia esogeni che endogeni; tra i fattori esogeni rientrano la matrice, la dimensione, la struttura molecolare e la quantità ingerita, mentre tra i fattori endogeni si considerano le attività degli enzimi digestivi, l'escrezione biliare e la biotrasformazione ad opera, soprattutto, del fegato, del rene, dell'epitelio gastrointestinale e della flora batterica intestinale.

Uno studio *in vivo* di Nardini e collaboratori (67) ha avuto come obiettivo quello di valutare nell'uomo l'assorbimento degli acidi idrossicinnamici contenuti in 200 ml di caffè. L'acido clorogenico è risultato essere presente solo nei campioni di caffè non idrolizzati mentre dopo l'idrolisi sono stati trovati in ordine decrescente gli acidi caffeico, ferulico e p-cumarico (166 mg, 28,6 mg e 2,8 mg rispettivamente contenuti in una tazzina di caffè) Questi risultati sono stati messi in relazione con le analisi del plasma di 10 volontari dello studio.

I volontari sono stati sottoposti a prelievi di sangue prima e dopo la somministrazione a digiuno di caffè, a tempo 0, e dopo 1 ora e 2 ore.

Per studiare l'assorbimento degli acidi idrossicinnamici i campioni di plasma sono stati analizzati per il loro contenuto di acidi liberi e totali sia trattando i campioni di plasma con la β -glucuronidasi, per idrolizzare in maniera selettiva le forme glucuronidate degli acidi idrossicinnamici, sia facendo un'idrolisi alcalina dei campioni per liberare gli acidi da complessi legati.

Le due diverse procedure hanno dato lo stesso risultato: è stato osservato il picco di massima concentrazione plasmatica di acido caffeico (91 ng) è stato trovato dopo 1 ora dalla somministrazione di caffè.

Nei campioni non è stato trovato l'acido clorogenico, così come gli acidi ferulico e p-cumarico dopo il consumo di caffè. Questo potrebbe essere dipeso, secondo gli autori, al limite di misurazione dello strumento. L'assenza di acido clorogenico e il simultaneo aumento della concentrazione dell'acido caffeico nel plasma potrebbe essere dovuta al fatto che l'acido clorogenico potrebbe non essere assorbito in quanto tale, ma subire idrolisi attraverso la esterasi citosoliche della mucosa o della microflora intestinale.

In questo modo l'acido caffeico liberato verrebbe assorbito ed entrerebbe nel sistema vascolare.

Azuma e collaboratori (68) hanno fatto uno studio di biodisponibilità degli acidi idrossicinnamici, in particolare acido clorogenico e acido caffeico, sui ratti.

Ai ratti a digiuno sono stati somministrati 700 μ mol/Kg di acido clorogenico o caffeico.

I campioni di plasma sono stati prelevati prima della somministrazione e ad ogni ora dopo la somministrazione fino a 6 ore.

Dopo la somministrazione di acido caffeico sono stati osservati i seguenti risultati: la concentrazione dei metaboliti raggiungeva il massimo picco dopo 2 ore dalla somministrazione. Il metabolita maggiormente presente (il 41%) era l'acido caffeico glucuronide, il secondo l'acido caffeico solfato/glucuronide. La totale concentrazione dei coniugati dell'acido ferulico è stata del 50% dei metaboliti totali dell'acido caffeico. Dopo la somministrazione di acido clorogenico sono stati trovati in piccole quantità acido caffeico glucuronide, acido caffeico

solfato/glucuronide e acido ferulico solfato/glucuronide ma non acido clorogenico.

Analizzando il plasma dei ratti ai quali era stato somministrato acido clorogenico intraperitonealmente è stato osservato che tutto l'acido clorogenico veniva trovato intatto nell'intestino tenue. Ciò ha suggerito che la mucosa intestinale non possieda attività esterasica in grado di tagliare l'acido clorogenico e che l'idrolisi possa avvenire ad opera della microflora del colon dove l'acido caffeico liberato potrebbe essere in parte assorbito. Gli autori suppongono che il motivo dell'acido chinico nella struttura dell'acido clorogenico possa essere un fattore di inibizione del suo assorbimento.

Obiettivo dello studio in vivo di Olthof e collaboratori (69) è stato quello di saggiare l'assorbimento dell'acido clorogenico ed acido caffeico in uno studio incrociato con 4 soggetti femminili e 3 maschili in salute ileostomizzati. In ciascun soggetto la degradazione da parte della microflora è stata minima ed è stato possibile calcolare l'assorbimento come quantità di polifenoli ingerita sottraendola alla quantità escreta nel fluido ileostomico.

Ai soggetti sono stati somministrati 2,8 mmoli di acido clorogenico e 2,8 mmoli di acido caffeico in modo casuale in giorni diversi. Sono stati collezionati i fluidi ileostomici e le urine per 24 ore. L'assorbimento dell'acido clorogenico è stato del 33% e quello dell'acido caffeico del 95%. Nelle urine sono state trovate tracce dell'acido clorogenico ingerito, 0,3%, ed una percentuale di acido caffeico ingerito dell'11%. I risultati hanno mostrato che solo un terzo della quantità di acido clorogenico e tutto l'acido caffeico somministrati sono stati assorbiti nell'intestino tenue dell'uomo. Questi dati implicano che parte dell'acido clorogenico può entrare nel circolo sanguigno e che la maggior parte potrebbe raggiungere il colon. Gli autori suggeriscono che i due acidi idrossicoinnamici in esame potrebbero essere assorbiti con due meccanismi diversi: l'acido clorogenico potrebbe essere assorbito tal quale come indicato dal suo ritrovamento in tracce nelle urine. Tale risultato potrebbe essere dovuto al fatto che l'acido clorogenico potrebbe essere metabolizzato intensamente dopo la fase di assorbimento nel fegato.

L'acido caffeico, invece, potrebbe essere assorbito con un meccanismo passivo nello stomaco, trovandosi in una forma non ionica, nell'ambiente basico dell'intestino tenue, invece, questo tipo di assorbimento è difficile: l'acido caffeico si dovrebbe trovare per lo più in forma ionica. Una seconda ipotesi potrebbe essere che l'acido caffeico coinvolgerebbe un meccanismo sia di assorbimento attivo Na^+ dipendente nell'intestino tenue, come succede per l'assorbimento di altri acidi cinnamici (70). Entrambi questi meccanismi, assorbimento passivo nello stomaco, e attivo nell'intestino tenue, potrebbero giocare un ruolo nell'assorbimento dell'acido caffeico nell'uomo

Una delle principali riserve di acidi idrossicinnamici nella nostra alimentazione è il carciofo considerando che il contenuto complessivo di acidi ortodifenolici è del 6.30% di sostanza secca.

2.0.0 Ipotesi e scopi

A seguito delle evidenze epidemiologiche che suggeriscono l'esistenza di una relazione inversa tra la dieta di tipo mediterraneo, in special modo attraverso frutta e verdura, e la protezione nei riguardi di alcune gravi patologie degenerative tra cui le malattie cardiovascolari causate dallo stress ossidativo, risulta interessante verificare l'esistenza di una correlazione diretta che legghi, *in vitro*, *ex vivo* ed *in vivo*, l'eventuale aumento dei sistemi di difesa antiossidanti con le molecole bioattive, in particolare i composti fenolici, presenti nel carciofo (*Cynara Scolymus* L.).

L'obiettivo della seguente ricerca è stato, quindi, quello di valutare la capacità antiossidante totale, il contenuto delle diverse molecole antiossidanti (*in vitro*) ed il loro effetto protettivo verso alcune patologie degenerative quali il cancro utilizzando due differenti tipi di approccio: da un lato modelli sperimentali su linee di cellule in coltura (*ex vivo*), dall'altro uno studio sull'uomo (*in vivo*) allo scopo di approfondire le conoscenze sui rapporti tra quantità dei componenti naturali ad azione antiossidante introdotti con l'alimento e le difese antiossidanti dell'organismo.

Dal punto di vista operativo, lo studio ha un importante razionale scientifico che ha come obiettivo quello di valutare le qualità nutrizionali e salutistiche di un prodotto locale di origine vegetale ottenuto in aree geografiche scelte, allo scopo di valorizzare questo prodotto così poco commercializzato e studiato.

La ricerca è stata articolata come segue:

in primo luogo è stato analizzato il contenuto di molecole bioattive e la capacità antiossidante totale (*in vitro*) nel carciofo precoce e tardivo proveniente da differenti aree di produzione in modo da selezionare il prodotto con più alto contenuto in antiossidanti naturali, maggiormente consumato in Italia utilizzato successivamente per la parte dello studio *ex vivo* sulle colture cellulari e per la parte *in vivo* sull'uomo.

Per i prodotti selezionati sono stati analizzati i seguenti parametri:

- 1- capacità antiossidante totale (TRAP e FRAP);

2- carotenoidi (luteina), acido ascorbico e composti fenolici (acidi idrossicinnamici, antociani, flavonoidi).

Tra gli alimenti studiati, è stato selezionato l'alimento con le proprietà antiossidanti migliori, con il quale è stato effettuato uno studio in acuto sull'uomo (*in vivo*).

L'obiettivo di questa porzione di ricerca è stato quello di verificare l'efficacia del prodotto selezionato durante il primo anno di ricerca mediante supplementazione su soggetti sani.

A tale scopo è stata verificata sia la biodisponibilità di acido clorogenico da carciofo sia il potenziale antiossidante del carciofo *in vivo*.

Quindi, nel corso delle 8 ore successive alla somministrazione di 61.7 g di carciofo in soggetti sani, si è provveduto a:

- 1- identificare e quantificare l'acido clorogenico, ed alcune sue forme coniugate (metabolismo di fase II) nel plasma;
- 2- misurare la capacità antiossidante plasmatica mediante TRAP e FRAP.

Successivamente, la ricerca ha previsto la valutazione dell'effetto antiossidante *ex vivo* su linee cellulari normali e tumorali in coltura degli estratti del prodotto selezionato durante la fase iniziale della ricerca ed un ulteriore studio di approfondimento *in vitro* sulle proprietà antiossidanti dell'estratto selezionato.

Per indagare l'azione biologica protettiva delle sostanze naturali contenute nel prodotto selezionato è stato valutato:

- 1- il potenziale effetto antiossidante ed epatoprotettivo della parte edibile del carciofo contro lo stress ossidativo in epatociti di ratto in coltura monitorando il contenuto di glutathione, la produzione di MDA e la quantità di cellule morte.
- 2- gli effetti della frazione polifenolica del carciofo sulla vitalità e sull'induzione dell'apoptosi sulle cellule di epatoma, HepG2, una linea cellulare trasformata a crescita continua.
- 3- l'efficacia antiossidante totale (TAE) dell'estratto della parte edibile di carciofo mediante un modello *in vitro* su plasma ossidato.

3.0.0 Materiali e Metodi

3.1.0 Matrice alimentare

Le varietà selezionate sono state le seguenti:

- 1- *Carciofo Romanesco*
- 2- *Carciofo Imperial Star (americano)*
- 3- *Carciofo Blanco de Tudela (spagnolo)*
- 4- *Carciofo Violetto di Provenza*
- 5- *Carciofo Spinoso sardo*

Il carciofo Romanesco, Blanco de Tudela ed Imperial Star sono stati forniti dall'Università degli studi della Tuscia. Il carciofo Violetto di provenza è stato fornito dal CNR di Bari ed il carciofo Spinoso sardo è stato fornito dall'Università degli studi di Sassari.

Per tutti i campioni sono stati analizzati i capolini. Ogni campione è stato estratto in quadruplicato e l'analisi ripetuta in duplicato per un totale di 8 ripetizioni per ogni parametro studiato.

3.2.0 Metodi studio *in vitro*

3.2.1 Estrazione dall'alimento per la valutazione della TAC (71)

Il campione viene tagliato in piccoli pezzi e frullato in corrente d'azoto; viene pesato 1 g di campione frullato che viene sottoposto a quattro estrazioni successive. L'estrazione dei composti idrosolubili è effettuata aggiungendo al campione 4 ml di acqua bidistillata e ponendo in agitazione in bagno agitato Dubnoff a 200 rpm per 15 minuti a temperatura ambiente e centrifugando a 3500 rpm per 10 minuti. Il surnatante viene recuperato e trasferito in una provetta da 10

ml, e conservato in frigo; al residuo polposo vengono aggiunti 2 ml di acqua bidistillata e viene ripetuta la procedura di estrazione. I surnatanti recuperati dalle due estrazioni vengono riuniti, viene misurato il volume totale e l'estratto viene aliquotato in contenitori da 2 ml, nuovamente centrifugato a 10000 rpm per 5 minuti (al fine di allontanare eventuali particelle solide) e trasferito in contenitori da 1.5 ml per l'analisi. Per l'estrazione della frazione liposolubile, il residuo polposo viene sottoposto a due ulteriori estrazioni: prima con 4 ml e poi con 2 ml di acetone, procedendo come nell'estrazione dei composti idrosolubili. Anche in questo caso, l'estratto acetone viene riunito e trasferito in contenitori per essere analizzato. Questo metodo estrattivo è valido sia per l'analisi TRAP che FRAP successivamente descritte.

3.2.2 Misura del Potere Antiossidante Totale (TRAP Total Radical-trapping Antioxidant Paramiter)

Il metodo TRAP rappresenta una valida misura della capacità antiossidante totale (TAC). La TAC di una soluzione, sia pura che eterogenea, può essere definita come la capacità di resistere ad una reazione di perossidazione artificialmente indotta e strettamente controllata; è un parametro che tiene conto delle concentrazioni delle sostanze antiossidanti presenti e delle loro sinergie.

Il metodo (14) sfrutta le caratteristiche di una molecola fluorescente, la R-ficoeritrina (R-PE), estratta dalle alghe rosse, la cui peculiarità è quella di perdere la caratteristica fluorescenza in seguito a reazione con agenti ossidanti (88). Essa rappresenta quindi (a concentrazioni estremamente basse, 1×10^{-8} M), il rivelatore di un flusso di radicali perossilici provocati tramite decomposizione termica di un azocomposto, il 2,2-azobis-(2-amidinopropano) diidroclore (ABAP). Qualsiasi sostanza antiossidante che ostacoli il flusso di radicali perossilici sulla R-PE provocherà un ritardo nel suo decadimento (Fase di Inibizione, FI) proporzionale alla sua concentrazione ed alla sua attività antiossidante. Rappresentando in un grafico la curva di decadimento della R-PE, la lunghezza della FI del campione in esame viene calcolata estrapolando ed intersecando la pendenza di massima perossidazione con la pendenza di inibizione

e proiettando quindi tale punto sull' asse X. La lunghezza in minuti della FI sarà convertita in molarità tramite standardizzazione con un antiossidante di cui si conoscano concentrazione ed attività “scavenger”. Per motivi di solubilità in soluzioni acquose, si usa un particolare analogo idrosolubile della vitamina E, il Trolox (T), capace di intrappolare due moli di radicali perossili per ogni mole di sostanza testata (89). Valutando l'inibizione che la sostanza in esame induce nel sistema e comparandola con l'inibizione fornita da T, si ottiene la capacità antiossidante totale della miscela secondo la formula:

$$C_{\text{trolox}} : T_{\text{trolox}} = X : T_{\text{campione}}$$

dove C trolox è la concentrazione del trolox, T trolox è la lunghezza della protezione fornita da T, Tcampione è la lunghezza in minuti del periodo d'inibizione della miscela in esame. Il valore del risultato (X) viene poi moltiplicato per f (fattore di diluizione usato) e per 2.0 (fattore stechiometrico per il trolox) che rappresenta il numero di radicali perossilici intrappolati da una molecola di trolox ed esprime la sua efficacia antiossidante.

Per i fluidi biologici il TRAP esprime la quantità totale (in numero di moli) di radicali perossilici che un litro di soluzione è capace di neutralizzare prima che si producano danni a proteine o altre molecole. Nel caso si utilizzino soluzioni di composti puri la misura viene generalmente espressa come lunghezza in minuti della fase d'induzione, o moli di radicali perossilici neutralizzati per mole di composto.

La miscela di reazione consiste di 20 µl di R-PE, concentrazione finale $1,5 \times 10^{-8}$ M, determinata sulla base del coefficiente di estinzione molare $\epsilon^{1\%}_{565} = 81.7/\text{cm}$, 80 µl del campione testato (diluito 1:10 con tampone fosfato PBS), di 250 µl di acqua bidistillata e di 1600 µl di PBS (75 mM), passato su resina (Chelex 100) per rimuovere il ferro. La soluzione viene posta a 37° C in cuvette da fluorimetro di 10 mm.

Quando la temperatura interna della soluzione raggiunge i 37° C viene fatta partire la reazione aggiungendo 50 µl di ABAP (concentrazione finale 5 mM), e il decadimento della fluorescenza della R-PE viene monitorato ogni 5 minuti tramite

fluorimetro (Perkin Elmer LS-5) dotato di un bagnetto termostato a 37° C. I monocromatori sono operativi ad una lunghezza d'onda di eccitazione di 495 nm e di emissione di 575 nm. Quando la fluorescenza è decaduta di un valore pari a circa il 30-40% rispetto al valore iniziale e la FI si è esaurita vengono aggiunti alla miscela di reazione 120 µL di T (CF 1.7 µM).

3.2.3 Misura del Potere Riducente Totale (FRAP Ferric reducing/antioxidant power)

Il metodo rappresenta una misura diretta del potere riducente totale di una soluzione (72). Il metodo, colorimetrico, si basa sulla riduzione del complesso tra ferro(III) ed il composto tripiridil-triazina (TPTZ), da parte di composti riducenti che causa la formazione del complesso ferro(II)-TPTZ con sviluppo di una colorazione blu, che può essere monitorata misurando il cambiamento di assorbanza della soluzione in esame a 595 nm.

La reazione non è specifica, infatti, qualunque composto, presente nella soluzione in esame, con potenziale redox minore della coppia Fe(III) / Fe(II) è in grado di provocare la riduzione del complesso Fe(III)-TPTZ .

Il saggio utilizza gli antiossidanti come specie riducenti ed il cambiamento di assorbanza rispetto ad una curva di calibrazione di valore noto è direttamente legato al potere riducente totale degli antiossidanti presenti nella miscela di reazione. L'attività antiossidante del campione è calcolata usando una curva standard di calibrazione costruita con una soluzione di solfato di ferro ($\text{FeSO}_4 \times 6\text{H}_2\text{O}$) che contiene una concentrazione nota di Fe(II), in un range tra 100 µM e 1000 µM. La curva standard (figura 3) permette di correlare il cambiamento di assorbanza della soluzione contenente il campione in esame, al cambiamento di assorbanza della soluzione standard di valore FRAP noto e trasformarlo in valore FRAP espresso in µmol/L.

Il reagente FRAP, preparato giornalmente e tenuto a 37° C, è costituito utilizzando 25 mL di un buffer acetato 0.3 M, pH 3.6 ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$

miscelato a $C_2H_4O_2$ in H_2O), 2.5 mL di $FeCl_3 \times 6H_2O$ 20 mM e 2.5 mL di una soluzione 10 mM di 2,4,6 tripiridil-s-triazina (TPTZ in HCl 40 mM). La miscela di reazione, formata da 900 μ L di reagente FRAP, 90 μ L di acqua bidistillata e 30 μ L di stanard, acqua bidistillata per il “bianco” o campione in esame precedentemente diluito 1:1 con acqua bidistillata, viene posta in cuvette da spettrofotometro da 1.5 mL. Le letture alla lunghezza d’onda di massimo assorbimento (595 nm) sono effettuate ogni 30 secondi utilizzando uno spettrofotometro Beckman DU 7400 termostatato a 37°C. Lo strumento è precedentemente azzerato con un “bianco” costituito da una miscela di reazione contenente 900 μ L di reagente FRAP, 90 + 30 μ L di acqua bidistillata.

La reazione di riduzione del complesso Fe(II)-TPTZ viene monitorata fino a 4 minuti per lo standard e fino a 30 minuti per il campione quando la variazione nell’assorbanza si stabilizza indicando il termine della reazione.

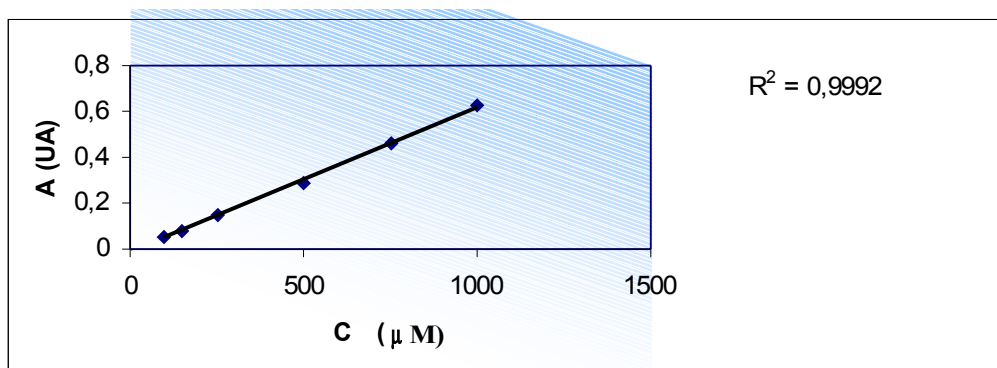


Figura 5 - Grafico della curva standard per la misura del Potere Riducente Totale (FRAP). Misurazione effettuata in assorbanza (A) espressa in unità arbitrarie (UA) in funzione delle concentrazioni espresse come micromolalità (μ M).

3.2.4 Misura dei composti fenolici (73)

Circa 25 g di carciofo mondato sia cotto che crudo sono stati omogeneamente campionati all'interno di una beuta da 250 ml con collo a smeriglio. Ciascun campionamento è stato effettuato in duplicato.

Dopo l'aggiunta di 150 ml di MeOH, il sistema viene posto sotto refrigerante ed scaldato a ricadere per 90 min.

La soluzione è quindi filtrata in un palloncino da 250 ml, mentre il materiale vegetale è sottoposto ad una seconda estrazione e, dopo l'aggiunta di ulteriori 100 ml di MeOH è scaldato a ricadere per 30 min.

Le due soluzioni estratte vengono riunite ed i 300 ml di volume risultante portati a secco con rotovapor. L'estratto, ricostituito in 100 ml di H₂O/MeOH 1:1 (v:v) è stato analizzato per il contenuto in polifenoli con HPLC accoppiato a rivelatore spettrofotometrico a serie di diodi (PDA). Le analisi HPLC sono state effettuate presso il CNR di Bari, per gentile collaborazione del Dott. Donato DI Venere.

3.2.5 Misura dei carotenoidi (74)

Per l'estrazione dei carotenoidi dai campioni di carciofo si procede come segue: si omogenizza l'alimento con il frullatore. Ad 1 g dell'omogenato si aggiungono 3 ml di THF stabilizzato con BHT 0,01% (0,01 g di BHT/100 ml di THF). Si aggiungono 2,7 ml di metanolo. La miscela viene fatta incubare per 30 minuti a 40° C in un bagnetto termostato con agitazione dopo aver aggiunto 0,3 ml di una soluzione metanolica di idrossido di potassio (KOH) al 40%. Dopo l'incubazione si aggiungono 0,15 g di acido ascorbico per neutralizzare il KOH e 10 ml di soluzione acquosa al 10% di NaCl.

Si estrae per 3 volte con 15 ml di esano/ dietilere 50/50 e si ricombinano le fasi organiche lavandole per 3 volte con acqua per ottenere una estratto limpido. I solventi vengono evaporati a secco sotto azoto ed il residuo si ridissolve in 10 ml di esano. 1 ml dell'estratto ricostituito viene fatto rievaporare e ridissolto in 1 ml

di una soluzione costituita da 100 µl di esano/dietiletere (50/50) e 900 µl di fase mobile (metanolo/acetonitrile/THF 50/45/5) .

Il volume di iniezione è di 50 µl ed il tempo di analisi è di 17 minuti.

3.2.6 Misura della vitamina C (75)

L'acido ascorbico (AA) è un idrato del carbonio a 6 atomi di C che esiste in due forme stereoisomere : un isomero L e un D detto acido isoascorbico (IAA).

Gli isomeri dell'AA possono essere reversibilmente ossidati ai loro rispettivi deidroisomeri (DHAA e DHIAA). Le forme ossidate dell'AA sono state misurate attraverso la riduzione con ditiotrietolo (DTT) calcolando la differenza tra le quantità di AA e IAA ridotte e totali.

I campioni sono stati misurati per cromatografia liquida su una colonna 250 x 4,6 mm Capcell Pak NH₂ (Shiseido, Tokyo, Japan). La colonna è stata equilibrata a 40° C e ad un flusso di 1 ml/min con una fase mobile composta da 0,68 g di KH₂ PO₄ , 200 ml di H₂O, 800 ml di acetonitrile (ACN) e 7,5 ml di acido fosforico concentrato. L'analisi è stata eseguita isocraticamente. Il detector elettrochimico è stato settato a 700 mV. La curva standard di AA è stata preparata diluendo una soluzione stock di 1 g/l in acido metafosforico (MPA) (30g/l).

Per l'analisi dei campioni alimentari, 1 g di carciofo sospeso in 5 ml di acqua e agitato per 15 secondi è stato analizzato in doppio per valutare il contenuto di AA e di IAA e dell'AA totale (AA+DHAA) e IAA totale (IAA+DHIAA).

Per la misura dell'AA e dell'IAA alla sospensione si aggiunge 1 ml di MPA (400 g/l) e si agita per 15 secondi. Si aggiungono 2 ml di ACN, si agita per 15 secondi e si centrifuga a 1000 x g per 30 minuti. Per la misura dell'AA+DHAA alla sospensione si aggiunge 1 ml di una soluzione di KH₂ PO₄ (0,5 mol/l) e DTT (100 g/l) per ridurre DHAA e DHIAA e si agita per 15 secondi. Si mantiene a temperatura ambiente per 30 minuti, si aggiunge 1 ml di MPA (400 g/l) e si agita per 15 secondi, Dopo il trattamento il surnatante limpido si trasferisce in vials per l'analisi all'HPLC.

3.3.0 Disegno di Studio *in vivo*

Per lo studio sono stati selezionati 5 soggetti volontari 2 di sesso maschile e 3 di sesso femminile, non fumatori, apparentemente sani e di età tra i 25 ed i 32 anni, risultati sani in seguito ad anamnesi.

I soggetti presentavano un peso corporeo medio di 60.4 ± 9.5 kg ed un indice medio di massa corporea pari a 21.5 ± 1.5 kg/m² e, al momento dello studio, non assumevano né medicinali né supplementi dietetici da almeno un mese.

I soggetti sono stati sottoposti ad una dieta condizionata per un periodo di tre giorni, che limitava il consumo di frutta e verdura complessivamente ad un massimo di 100 g al giorno ed escludeva carciofi, carote, patate, pomodori, mele, pere, ciliegie, frutti di bosco, pesche, tè, caffè, vino, birra, cioccolata, e loro prodotti derivati, poiché alimenti ad alto contenuto polifenolico.

Il giorno dello studio sui soggetti è stato effettuato un prelievo ematico a digiuno e a 30, 60, 120, 240, 360 e 480 min. dopo la somministrazione del pasto sperimentale che di 61.7 g di capolini di carciofo (cv Violetto di Provenza) cotti a vapore e conditi a crudo con olio extravergine di oliva (1 cucchiaino a porzione). La procedura di preparazione dell'alimento è stata preventivamente messa a punto, al fine di ottenere il giusto grado di cottura.

La quantità di carciofo da somministrare è stata calcolata sulla base del contenuto in acido clorogenico precedentemente determinata nella cultivar carciofo utilizzata, ovvero 307.5 mg/100 g di p.e. Il carciofo da somministrare è stato campionato sia crudo che cotto al fine di verificare il contenuto in acido clorogenico.

In tabella 2 è riportata la composizione nutrizionale del pasto sperimentale.

Tabella 2: composizione nutrizionale del pasto sperimentale

Sog	PROTEINE (g)			LIPIDI (g)			CHO	Fibra	Kcal
	Animali	Vegetali	Tot.	Animali	Vegetali	Tot.	(g)	(g)	
A	4.2	11.4	15.6	3.5	21.8	25.3	82.6	2.8	600
B	3.5	9.5	13.0	2.9	18.3	21.2	69.2	2.4	504
C	4.2	11.4	15.6	3.6	22.1	25.7	83.7	2.8	609
D	3.9	10.6	14.5	3.3	20.2	23.5	76.7	2.6	558
E	3.9	10.9	13.8	3.3	20.8	24.1	79.0	2.7	574
media	3.3	9.2	12.5	2.8	18.1	20.9	65.5	2.8	484

ds	1.6	3.8	5.4	1.4	6.4	7.8	31.8	0.3	210
----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------	-----	-----

Dopo il prelievo a 360 min, i soggetti hanno consumato un pasto a base di 80 g di pasta in bianco condita con 10 g di olio d'oliva. Durante le 8 ore di studio i soggetti hanno bevuto 1 l di acqua.

Il sangue è stato prelevato utilizzando delle provette contenenti EDTA, come agente anticoagulante ed il plasma ottenuto mediante la centrifugazione del sangue per 10 min. a 3600 x g. I campioni di plasma sono stati conservati a -80° fino al momento delle analisi.

3.4.0 Metodi per lo studio *in vivo*

3.4.1 Estrazione da plasma di acido clorogenico

Il metodo utilizzato per l'estrazione di acido clorogenico libero da plasma consiste di una estrazione liquido-liquido. La metodica utilizzata è quella descritta da Bugianesi e collaboratori (76).

A 0,5 ml di plasma vengono aggiunti 125 µl di una soluzione di acido ascorbico al 20 %. E' aggiunto 1 ml di MeOH/HCl 0.5 M (in miscela) ed è effettuata una prima estrazione con 2 ml di etilacetato. La miscela è centrifugata e la fase organica allontanata. L'aggiunta di etilacetato viene ripetuta e le fasi organiche riunite. Il volume estrattivo finale è portato a secco in un concentratore centrifugo sotto vuoto (Savant), mentre l'estratto secco è ricostituito in 200 µl di fase mobile (H₂O 0.02 M in NaH₂PO₄ pH 2.8 con H₃PO₄/ MeOH 1:1 (v:v)) ed iniettato in HPLC.

3.4.2 Metodo di identificazione e quantificazione

Per l'identificazione e la quantificazione dell'acido clorogenico dagli estratti è stata utilizzata la cromatografia liquida di ripartizione su fase inversa C18.

Nella cromatografia di ripartizione il soluto si distribuisce tra la fase fissa e la fase mobile in accordo con il proprio coefficiente di ripartizione.

La fase stazionaria, liquida, è supportata su di un solido inerte, che ha la funzione di assorbire e trattenere le sostanze da separare, esponendo una superficie molto vasta alla fase mobile. Normalmente il solido di supporto nella fase fissa è gel di silice, di natura polare, ma nella cromatografia a ripartizione inversa il gel viene derivatizzato con un polimero apolare, nel nostro caso una catena carboniosa C₁₈.

Esistono tre diverse tecniche operative di cromatografia liquida di ripartizione, ovvero l'eluizione semplice, l'eluizione a gradino e l'eluizione a gradiente.

L'eluizione a gradiente è quella utilizzata per il nostro studio. Tale modalità operativa consente di ottenere un buon cromatogramma con una buona separazione dei costituenti in un tempo relativamente breve.

L'eluizione a gradiente si esegue impiegando una fase mobile a composizione variabile; nella cromatografia di ripartizione a fase inversa la colonna è alimentata con una miscela di solventi la cui composizione varia linearmente nel tempo aumentando la percentuale di solvente più apolare e, conseguentemente, il potere eluente della fase mobile.

L'identificazione e la quantificazione di acido clorogenico nei campioni è stata effettuata mediante un sistema HPLC, che consiste in un autocampionatore modello ESA MODEL 540 refrigerato a 4° e di un sistema a due pompe ESA MODEL 580 accoppiato ad un rivelatore elettrochimico multicanale (8 canali) ESA 5600 gestito da un software ESA, Chelmsford, MA, USA, in grado sia di acquisire che di elaborare i dati.

La colonna utilizzata è una Supelcosil LC-18 (5µm), (250×4,6 mm) mantenuta costantemente ad una temperatura di 30°. La fase eluente è costituita da due fasi mobili: la fase mobile A è costituita da una soluzione di sodio fosfato monobasico 0,02 M portata a pH 2,8 con acido ortofosforico all'85%, mentre la fase mobile B è metanolo.

Il metodo cromatografico utilizzato prevede, come precedentemente detto una eluizione a gradiente.

Per le analisi dei campioni plasmatici il gradiente utilizzato è riportato nello schema seguente

Solvente A (%)	Tempo (min)
87	0
60	13.5
40	33.5
0	38.5
87	41.5

Il flusso dell'eluente viene mantenuto costante ad 0.80 ml/min.

L'acido clorogenico è stato rilevato con un rivelatore elettrochimico multicanale che consente di osservare un segnale amperometrico (A) dovuto all'ossidazione dell'acido clorogenico.

A differenza di un comune rivelatore elettrochimico, il multicanale in questione, consente di impostare contemporaneamente fino a 8 diverse differenze di potenziale (chiamate canali) e quindi di fornire un segnale multiplo in funzione del grado di ossidabilità o riducibilità della molecola analizzata.

Questo multiseinale si osserva normalmente con tre canali sequenziali e poiché è caratteristico per ogni sostanza, rappresenta un ulteriore parametro identificativo oltre a quello fornito dal tempo di ritenzione. La quantificazione si effettua in relazione al canale che fornisce il segnale più alto, normalmente l'intermedio nella terna di segnali, ovvero quello più vicino al potenziale standard della molecola nelle condizioni di lavoro. I tre canali sono detti "lower" (L), "dominant" (D) e "upper" (U). I rapporti D/L e D/U sono costanti in un determinato intervallo di concentrazioni e rappresentano due parametri identificativi della molecola oltre al tempo di ritenzione.

Per l'analisi dell'acido clorogenico si sono impostate le seguenti differenze di potenziale: 60, 120, 200, 480, 580, 680, 780, 900 mV.

La quantificazione dell'acido clorogenico è stata effettuata con il metodo dello standard esterno. La soluzione standard madre di acido clorogenico viene preparata in metanolo alla concentrazione di 1 mg/ml ed era conservata a - 20°C.

Le rette di calibrazione, una per ogni sessione di analisi, sono regressioni lineari dell'altezza del picco in funzione della concentrazione di acido clorogenico ottenute con il metodo dei minimi quadrati.

3.5.0 Studio *ex vivo* su cellule

3.5.1 Colture cellulari

Ratti maschi della specie Sprague-Dawley sono stati usati come donatori di epatociti. Gli epatociti sono stati preparati tramite collagenasi in accordo con il metodo di Seglen (77). Gli epatociti sono stati seminati e fatti crescere in mezzo di Williams E contenete 10 IU/ml di penicillina, 10 µg/ml di streptomicina, 0.5 mg/ml di gentamicina, 0.02 IU/ml di insulina e 10% di siero di feto di vitello inattivato a 37° C in atmosfera umidificata al 5% CO₂- 95% aria.

Le cellule HepG2, una linea cellulare di epatoma umano, sono state fatte crescere in D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), supplementate con 10 % di siero di feto di bovino con 10 IU/ml di penicillina e 10 µg/ml di streptomicina a 37° C in atmosfera umidificata con 5% CO₂-95% aria.

Gli epatociti sono stati seminati in bottiglie di plastica alla densità di 1.33×10^6 in 4 ml di mezzo Williams E. Dopo incubazione di 2 h a 37 ° C, le cellule sono state lavate in buffer Hepes, pH 7.4 per rimuovere le cellule morte. Dopo incubazione di 24 h, le cellule sono state poste in mezzo Williams E in assenza di siero di feto di vitello e trattate con concentrazioni crescenti di glucosio ossidasi (da 0.02 a 0.2 U/ml), ChA (1 mM), AE (1 mM) e DPPD (N,N'-diphenyl-p-phenylenediamine) (1 µM) per 60 minuti. Le cellule HepG2 sono state seminate alla densità di 2×5^{10} per pozzetto e dopo 24 h trattate con acido clorogenico (ChA) (400, 800, 1200 µM) ed estratto di carciofo (AE) (400, 800, 1200 µM) e Paclitaxel (1.5 µM).

3.5.2 Vitalità cellulare, misurazione del GSH intracellulare e perossidazione lipidica

La vitalità cellulare è stata determinata tramite il saggio di esclusione del Trypan blu. Il contenuto del GSH intracellulare è stato misurato in accordo con Sedlak e Lindsay (78). L'analisi quantitativa del glutatione si basa sulle variazioni del rapporto glutatione ridotto/glutatione totale (GSH/GSSG+GSH) rispetto alle

condizioni basali di un campione di controllo, che non viene esposto a condizioni ossidanti. Per questo tipo di determinazione è stato utilizzato un metodo basato sul riciclo enzimatico di Ellman con cinetica di reazione colorimetrica rilevata da un lettore spettrofotometrico microtiter. Questo tipo di misurazione si basa sul principio del riciclo enzimatico, catalizzato dalla glutathione reduttasi (GR) a cui segue una reazione colorimetrica, ottenuta mediante l'aggiunta di DTNB (acido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico). Il DTNB in soluzione e in presenza di NADPH e GR si dissocia in due molecole di acido 5-tio-2-nitro-benzoico (TNB), molecola di colore giallo intenso che si riduce legando il GSH a formare il complesso GS-TNB. La formazione del cromoforo è proporzionale al riciclo enzimatico, che a sua volta è dipendente dalla concentrazione di GSH presente nel campione. La misurazione dell'assorbanza del TNB a 405 nm è effettuata con lettore di piastre microtiter.

Le proteine cellulari sono state determinate mediante un kit della Bio Rad usando albumina serica bovina come standard.

La concentrazione di MDA è stata misurata fluorimetricamente a 515 nm (eccitazione) e 553 nm (emissione) adattando il metodo di Yagi (79). Il metodo prevede la rivelazione di un pigmento rosa, dovuto alla formazione del complesso stabile tra MDA e acido tiobarbiturico (TBA); tale pigmento possiede uno spettro di assorbimento nel visibile con un picco massimo di 532-535 nm. La combinazione tra il metodo cromogenico e una separazione in HPLC permette l'identificazione della sola MDA tra le sostanze TBA reattive.

Le condizioni di lavoro ottimali per i passi iniziali prevedono: ambiente acido (PH: 2, 3), alta temperatura (90-100° C) e un tempo di reazione di 10-15 minuti.

Le SMC e le NHF sono state seminate in fiasche da 25 cm² alla concentrazione di 5×10^5 .

I campioni sono stati pre-incubati per 2 h con le rispettive antocianine alla concentrazione finale non tossica di 100 µM, in terreno senza siero. Poiché il siero ha un'azione protettiva, la sua eliminazione è necessaria per non alterare il risultato finale del test.

E' stata poi indotta la perossidazione lipidica aggiungendo il TBH (Tert-butil-idroperossido, Sigma) per un'ora alla concentrazione finale 0.5 mM. La serie di campioni è stata la seguente:

- Un campione di controllo;
- Un campione di controllo con l'aggiunta del solo solvente (DMSO);
- Un campione trattato con il solo agente perossidante (TBH);
- I campioni trattati con TBH e le antocianine.

La rilevazione dell'MDA, come indice della perossidazione lipidica, è stata effettuata secondo un protocollo derivato dal metodo di Yagi (79) e adattato alla separazione in HPLC (80).

Dopo il periodo di trattamento, è stato raccolto il terreno di incubazione e le colture cellulari sono state sottoposte a deproteinizzazione con 500 µl di acido tricloroacetico (TCA) al 20 %, e distaccate dalle fiasche con una spazzola da "*scraping*". Le cellule sono state poi riunite al terreno di coltura precedentemente raccolto, al quale sono stati poi aggiunti 500 µl di soluzione acquosa satura di TBA (51,35 mM). Ogni singolo campione, posto in una provetta Pyrex con tappo in teflon precedentemente lavata in soluzione solfocromica, è stato poi incubato in un bagno termostatico a 100° C per 15 minuti per ottenere la formazione del complesso cromogenico. Dopo aver raffreddato la provetta in ghiaccio, sono stati aggiunti ai campioni 500 µl di HCl 5 N e si è proceduto ad una doppia estrazione del cromoforo, prima con 1 ml e poi con 500 µl di butanolo (Merck). I surnatanti di entrambe le separazioni in butanolo, recuperati per centrifugazione a 1000 g per 10 minuti, sono stati poi portati a secco sotto flusso di azoto. Il residuo è stato infine risospeso in 500 µl di H₂O e trasferito nei vials per l'iniezione nel sistema HPLC.

La separazione cromatografica è stata adattata a partire da quella originariamente pubblicata da Lepage e collaboratori. E' stato usato un cromatografo HPLC Hewelett-Packard 1090 A (Hewelett-Packard, Walbronn, Germania), dotato di sistema di erogazione del solvente programmabile a due canali, con l'adozione di una colonna C 18 per separazioni in fase inversa Spherisorb o Hypersil ODS2

(Merck Darmstadt, Germania), lunghezza 25 cm, diametro 4.6 mm. Il flusso della fase mobile era costituito dal gradiente variabile di una soluzione acquosa di metanolo (Merck) per un flusso di 1 ml/min. L'acquisizione del segnale è stata eseguita alla lunghezza d'onda di 535 nm. Grazie ad un rivelatore a serie di diodi (DAD–Diode Array Detector), i dati venivano acquisiti in tempo reale assieme agli spettri di assorbimento dei picchi cromatografici eluiti ai diversi tempi di ritenzione. Ciò consente una precisa identificazione dell'analita d'interesse sulla base di uno spettro di assorbimento caratteristico.

3.5.3 Determinazione dell'apoptosi tramite Annessina V-FITC

Dopo una notte in mezzo di coltura D-MEM al 10 % di siero bovino, le cellule HepG2 sono state incubate in mezzo privo di siero ed esposte a AE, ChA o Paclitaxel per 24 h. Dopo lavaggio le cellule sono state incubate con 5 µl di Annessin-V per 15 minuti a temperatura ambiente e al buio. Per distinguere le cellule necrotiche è stato aggiunto 1 µg/ml (concentrazione finale) di ioduro di propidio. Le cellule apoptotiche leganti annessina V e non propidio sono state evidenziate con la fluorescenza tramite un citofluorimetro.

3.6.0 Modello in vitro del plasma ossidato studio *in vitro*

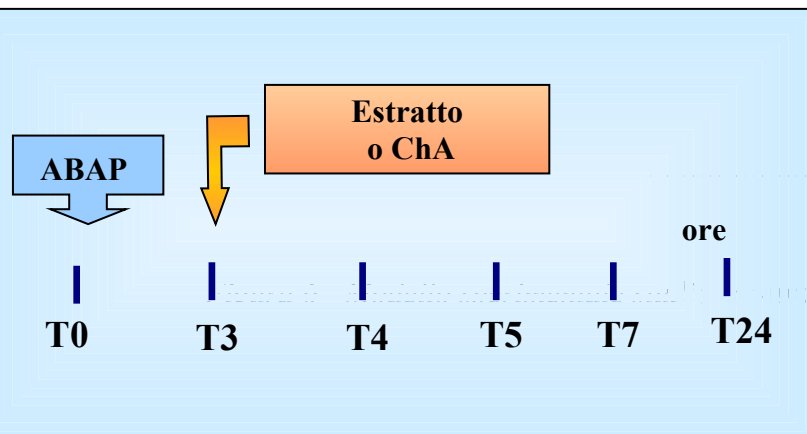
Il modello sperimentale scelto deriva da un lavoro precedentemente condotto da Ames e colleghi (81). Tale studio valutava la scomparsa nel tempo di determinati antiossidanti plasmatici in un sistema *in vitro* esposto ad un forte stress ossidativo. Lo stesso modello è stato ripreso successivamente da Fraga (82) allo scopo di accertare la capacità delle catechine di prevenire la perossidazione lipidica del plasma rallentando il processo ossidativo e preservando gli antiossidanti plasmatici.

Per gli scopi di questa ricerca, sono state apportate delle modifiche ai precedenti modelli nate dalla necessità di dover valutare la capacità antiossidante dell'estratto

di carciofo in toto e dell'acido clorogenico, il composto fenolico maggiormente rappresentato nel carciofo, come scavenger dei radicali prodotti dallo stress ossidativo indotto e nel restaurare o innalzare le proprietà antiossidanti nel pool plasmatico.

Il pool plasmatico è stato sottoposto ad uno stress ossidativo indotto chimicamente a 37° C, con 2,2'-azobis(2-amidinopropano)diidroclore (ABAP) 0.37 mM (= 0.1 mg/ml plasma), una concentrazione minima, vicina ad uno stress ossidativo naturale. Questa stessa concentrazione è stata già precedentemente testata in uno studio condotto da Palmery e colleghi (83) verificando danni nei ratti. L'ABAP è un azo-induttore capace di generare radicali perossilici. Si decompone unimolecolarmente senza enzimi o biotrasformazione per produrre azoto molecolare e 2 radicali del carbonio. La velocità di decomposizione dipende dalla temperatura, dal solvente e dal pH. Nel plasma sottoposto a stress ossidativo sono probabilmente presenti antiossidanti sia allo stato ridotto che allo stato ossidato. Al pool sono state aggiunte successivamente 3 concentrazioni differenti di acido clorogenico (ChA), C1 = 0.0065 µg/ml (0.0183 µM), C2 = 0.0228 µg/ml (0.0643 µM), C3 = 0.0456 µg/ml (0.1286 µM) di plasma e le stesse 3 differenti concentrazioni di estratto (E1, E2, E3) misurate come ChA equivalenti).

La concentrazione di 0.0065 µg/ml corrisponde ai valori di ChA riscontrati nel plasma di soggetti sani dopo assunzione in acuto di 61.7 g di carciofo cotto contenente 170.35 mg di clorogenico in uno studio condotto precedentemente nei nostri laboratori. Le concentrazioni di 0.0228 µg/ml e 0.0456 µg/ml corrispondono rispettivamente ad un eventuale livello di ChA riscontrabile dopo somministrazione di 216.5 g di carciofo e 432.98 g di carciofo. Questi calcoli sono purtroppo solo ipotetici: non c'è conferma che i livelli plasmatici di ChA potrebbero essere questi a seguito dell'ingestione di dette due quantità di carciofo cotto, poiché studi sulla biodisponibilità di questi composti derivanti da matrici alimentari sono attualmente in corso. In figura 6 è descritto il modello sperimentale utilizzato.



Il plasma è stato ottenuto da prelievi di sangue effettuati a digiuno su 6 soggetti sani uomini e donne, non fumatori, di età compresa tra i 25 e i 40 anni, utilizzando provette vacutainer con EDTA per prevenire la coagulazione. Il plasma ottenuto a seguito della centrifugazione è stato trasferito in 7 provette con aggiunta di ABAP 0.37 mM e posto in un bagnetto termostato, con agitazione continua, alla temperatura di 37° C dando così inizio alla decomposizione con la conseguente produzione di radicali perossilici. Da ogni provetta è stata prelevata immediatamente un'aliquota corrispondente a T0. Dopo 3 ore sono state prelevate altre aliquote corrispondenti a T3 e successivamente, in 6 delle 7 provette sono state aggiunte quantità diverse di ChA ed estratto per ottenere le 3 differenti concentrazioni interne di ChA ed estratto. Come controllo è stata utilizzata la settima provetta contenente plasma e ABAP 0.37 mM. Ad intervalli successivi dopo l'aggiunta di clorogenico ed estratto sono state prelevate aliquote da ciascuna provetta a tempi diversi: dopo 4 ore (T4), dopo 5 ore (T5) e dopo 7 ore (T7) Le aliquote sono state conservate a – 80° C e successivamente analizzate per verificare variazioni nel corso dei vari tempi della capacità antiossidante totale misurata come FRAP con il metodo precedentemente descritto al punto 3.2.3.

3.7.0 Sostanze chimiche

L'acido cloridrico (HCl), l'esano, il metanolo, il butanolo, l'etil acetato, il tetraidrofurano (THF), l'acetonitrile (ACN), sono stati forniti dalla Carlo Erba Reagenti (Milano, Italia).

L'acido acetico glaciale ($C_2H_4O_2$), l'acido ortofosforico 85% (H_3PO_4), l'acido metafosforico (MPA), il Ferro cloruro 6-idrato ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$), il sodio acetato 3-idrato ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$), il sodio fosfato monobasico (NaH_2PO_4), sono stati forniti dalla BDH (Poole, England). L' α -tocoferolo è stato fornito da Hoffman LaRoche (Nutley, NJ, USA). L'acido 2-carbossilico-6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcromano (TROLOX), è stato fornito da Randox Laboratories LTD (UK).

Il 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) diidroclore (ABAP) è stato fornito da Polyscience (Warrington, PA, USA). La 2,4,6-tri-(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) è stata fornita da Fluka Reagenti (Svizzera). Il solfato ferroso ($FeSO_4 \cdot 6H_2O$) è stato acquistato presso la Merck (Darmstadt, Germania).

La R-ficoeritrina (R-PE), il PBS (phosphate buffered saline), la quercetina, l'acido ascorbico, l'acido tiobarbiturico, (TBA), l'acido fosfotungstico e tutti i restanti composti non nominati nella lista, ma utilizzati per le analisi, sono stati forniti dalla SIGMA (St. Louis, MO USA).

Tutte le soluzioni ed i reagenti utilizzati per le varie analisi sono stati preparati usando acqua bidistillata Milli-Q (Millipore, Milano, Italia), resistenza $18\text{ m}\Omega / \text{cm}^2$.

4.0.0 Risultati

4.1.0 Carotenoidi

In tabella 3 sono descritti i valori di luteina delle 5 cultivar di carciofo prese in esame. Il carciofo violetto di provenza presenta dei contenuti significativamente superiori ($p < 0.05$), pari al 52% in più, rispetto al carciofo spagnolo Blanco de Tudela, maggiori del 35% rispetto al carciofo spinoso sardo, del 25% rispetto al carciofo romanesco e lievemente superiori rispetto alla cultivar americana Imperial Star (valori superiori solo del 14 %).

I valori di luteina per i campioni analizzati sono comparabili con i dati presenti in letteratura.

Tabella 3: contenuto in carotenoidi (luteina) nel capolino delle cultivar di carciofo analizzate¹

		<i>luteina</i>	
		<i>µg/100 g</i>	
Campioni		<i>media</i>	<i>ds</i>
<i>romanesco</i>		624,15	56,00
<i>imperial star</i>		709,19	123,86
<i>blanco de tudela</i>		397,85	99,60
<i>violetto di provenza</i>		824,37	77,03
<i>spinoso sardo</i>		539,05	100,41

¹I risultati sono espressi come medie e deviazioni standard di 8 repliche analitiche

4.2.0 Vitamina C

I contenuti di vitamina C delle 5 cultivar di carciofo prese in esame sono rappresentate in tabella 4.

La cultivar violetto di provenza mostra dei contenuti significativamente superiori ($p < 0.05$) rispetto al carciofo Imperial Star (47% in più), maggiori del 37% rispetto al carciofo romanesco, superiori del 25% rispetto al carciofo Blanco de Tudela e lievemente superiori rispetto alla cultivar sarda (del 18% in più). Anche per i

contenuti di vitamina C sono stati verificati dei valori comparabili con i dati presenti in letteratura.

Tabella 4: contenuto in vitamina C nel capolino delle cultivar di carciofo analizzate¹

		<i>Vitamina C</i>	
		<i>mg/100 g</i>	
Campio ni		<i>media</i>	<i>ds</i>
<i>romanesco</i>		5,8	0,4
<i>imperial star</i>		4,9	0,4
<i>blanco de tudela</i>		6,7	0,4
<i>violetto di provenza</i>		9,2	1,6
<i>spinoso sardo</i>		7,5	0,7

¹I risultati sono espressi come medie e deviazioni standard di 8 repliche analitiche

4.3.0 Capacità antiossidante totale

La tabella 5 descrive i valori della capacità antiossidante totale misurata con due metodologie differenti: TRAP e FRAP (vedi metodi).

Per entrambi i parametri si può notare una certa omogeneità nei valori tra le 5 cultivar analizzate. La cultivar di carciofo spinoso sardo mostra una capacità antiossidante, misurata sia come TRAP che come FRAP, superiore (20 – 37 % in più) rispetto alle altre cultivar.

Tabella 5: capacità antiossidante totale nel capolinodelle cultivar di carciofo analizzate¹

		TRAP		FRAP	
		$\mu\text{mol}/100\text{ g}$		$\mu\text{mol}/100\text{ g}$	
Campi oni		<i>media</i>	<i>ds</i>	<i>media</i>	<i>ds</i>
<i>romanesco</i>		0,65	0,05	0,40	0,01
<i>imperial star</i>		0,54	0,02	0,49	0,21
<i>blanco de tudela</i>		0,56	0,02	0,47	0,10
<i>violetto di provenza</i>		0,77	0,02	0,43	0,02
<i>spinoso sardo</i>		0,88	0,01	0,61	0,06

¹I risultati sono espressi come medie e deviazioni standard di 8 repliche analitiche

4.4.0 Composti fenolici

In tabella 6 sono descritti i contenuti di molecole fenoliche nelle 5 cultivar di carciofo analizzate.

La concentrazione maggiore di acido clorogenico è stata riscontrata nelle cv Violetto di Provenza e Romanesco. Oltre all'acido clorogenico, sono state identificate, sulla base dello spettro UV/VIS acquisito, altri 3 acidi mono-caffeil-chinici (MCC) e ben 7 differenti acidi di-caffeil-chinici (DCC), di cui sei a struttura incognita ed uno noto, la cinarina (acido 1,5-dicaffeil-chinico). Inoltre, è stata osservata la presenza di due flavonoidi, l'apigenina glucoside e la luteolina glucoside.

Tabella 6: contenuto polifenolico nel capolino delle cv di *Cynara scolimus* L. analizzate¹

	<i>Violetto di provenza</i>	<i>Romanesco</i>	<i>Americano</i>	<i>Spinoso sardo</i>	<i>Spagnolo</i>
--	--	-------------------------	-------------------------	---------------------------------	------------------------

clorogenico	276.1±1.2	149.1±1.0	44.2±0.2	51.7±0.7	38.9±0.5
mono-caffeil-chinico 1	13.4±1.3	3.2±0.2	1.8±0.1	2.8±0.1	5.7±0.2
mono-caffeil-chinico 2	3.5±0.2	3.5±0.1	1.3±0.2	0.8±0.3	1.1±0.2
mono-caffeil-chinico 3	0	10.3±0.3	0	0	0
monocaffeil totali	16.9	16.5	3.1	3.6	6.8
cinarina	0	2.0±0.1	1.3±0.2	0.3±0.1	0.5±0.1
di-caffeil-chinico 1	1.4±0.3	5.5±0.1	3.5±0.1	2.2±0.2	2.3±0.1
di-caffeil-chinico 2	1.9±0.2	5.1±0.2	1.6±0.1	1.6±0.1	2.2±0.2
di-caffeil-chinico 3	0	164.3±1.2	53.0±0.9	31.6±0.7	39.9±1.2
di-caffeil-chinico 4	159.9±1.2	11.3±0.3	76.6±0.8	55.1±0.7	68.5±1.3
di-caffeil-chinico 5	138.5±1.3	8.6±0.5	3.2±0.2	3.0±0.1	3.3±1.0
di-caffeil-chinico 6	8.0±0.2	0	0	0	0
dicafeilchinici totali	309.7	194.8	137.8	93.5	116.2
luteolina glicosilata	7.5±0.2	0	0	0	0
apigenina glicosilata	9.9±0.2	41.0±1.2	10.5±0.2	20.4±0.8	6.3±0.2

¹I risultati sono espressi come medie e deviazioni standard di 8 repliche analitiche

Tra le 5 cultivar di carciofo analizzate, ne sono state selezionate 2 per il contenuto elevato di acido clorogenico: la cv Violetto di Provenza e la cv Romanesco.

Essendo il carciofo un alimento prevalentemente consumato cotto, allo scopo di valutare l'effetto della cottura domestica sul contenuto dei polifenoli, i capolini delle due cultivar selezionate sono stati analizzati anche a seguito di cottura.

In tabella 7 sono confrontati i contenuti di molecole nell'alimento crudo e cotto. Il contenuto di acido clorogenico per la cv Violetto di Provenza è pari a 276 mg/100g di p.e. e non mostra variazioni significative in seguito a cottura (307,45 mg/100g). La cv Romanesco è risultata contenere un concentrazione di acido clorogenico significativamente inferiore ($P < 0.001$, T-test di Student) rispetto al Violetto di Provenza pari a 149.14 mg/100g nel crudo e 198.38 mg/100g nel cotto. MCC 3, DCC 3 e cinarina sono stati evidenziati solo dopo cottura nel Violetto di Provenza, mentre aumentano in maniera significativa per la cv Romanesco. MCC 2 e DCC 2 hanno mostrato un incremento del contenuto in seguito a cottura sia per la cv Violetto di Provenza che Romanesco. DCC 6 è stato misurato solo nel Violetto di Provenza ed il contenuto è incrementato a seguito della cottura. Per

MCC 1 non è stata osservata nessuna variazione correlata alla cottura in entrambe le cultivar. I contenuti di luteolina glicosilata e apigenina glicosilata non sono stati influenzati dalla cottura nel Violetto di Provenza, mentre nel Romanesco non è stata misurata la luteolina e il contenuto di apigenina è diminuito a seguito della cottura.

Considerati i contenuti significativamente superiori ($P < 0.001$, T-test di Student) di acido clorogenico nella cv Violetto di Provenza rispetto alla cv Romanesco, la cv Violetto di Provenza è stata selezionata per lo studio *in vivo* sull'uomo.

Tabella 7: confronto tra le molecole polifenoliche nei capolino di *Cynara scolimus* L. cv Violetto di Provenza e Romanesco crudo e cotto¹

¹I risultati sono espressi come medie e deviazioni standard di 8 repliche analitiche

4.5.0 Identificazione, calibrazione e limite di rivelabilità dell'acido clorogenico

L'acido clorogenico è stato eluito a circa 16.9 minuti ed ha mostrato elettroattività a 120, 200 e 480 mV. L'identificazione da parte del software si

	<i>Violetto di provenza</i>		<i>Romanesco</i>	
	<i>crudo</i>	<i>cotto</i>	<i>crudo</i>	<i>cotto</i>
clorogenico	276.1±2.6	307.5±1.5	149.18±1.7	198.4±1.2
mono-caffeil-chinico 1	13.4±1.2	13.3±0.2	3.2±0.2	8.7±0.2
mono-caffeil-chinico 2	3.5±0.2	17.9±0.1	3.5±0.2	24.1±0.8
mono-caffeil-chinico 3	0	35.6±0.3	10.3±0.3	48.5±0.2
monocaffeil totali	16.9	66.7	16.5	82.3
cinarina	0	18.3±0.2	2.0±0.1	33.3±1.3
di-caffeil-chinico 1	1.4±0.1	1.8±0.1	5.5±0.1	23.1±0.5
di-caffeil-chinico 2	1.9±0.1	14.3±0.1	5.1±0.2	57.8±0.3
di-caffeil-chinico 3	0	36.6±0.2	164.3±1.6	91.5±1.2
di-caffeil-chinico 4	159.9±1.3	126.1±1.2	11.3±0.2	153.7±1.3
di-caffeil-chinico 5	138.5±1.9	148.1±1.2	8.6±0.3	94.9±0.9
di-caffeil-chinico 6	8.0±0.2	69.5±0.5	0	0
dicafeilchinici totali	309.7	396.5	194.8	420.9
luteolina glicosilata	7.5±0.1	7.9±0.2	0	0
apigenina glicosilata	9.9±0.1	9.8±0.6	41.0±0.2	14.4±0.8

ritiene attendibile quando entrambi i rapporti D/L e D/U erano maggiori di 0.70 (vedi paragrafo 3.2.2).

Per quanto riguarda la quantificazione dei livelli plasmatici, l'intervallo di concentrazione è compreso tra 20 e 400 ng/ml.

La linearità della curva di regressione lineare è stata considerata attendibile nel caso di un valore del coefficiente di regressione lineare (r) > 0.98 . Il limite di rivelabilità è stato posto pari a 8 ng/ml di plasma.

Un cromatogramma di acido clorogenico standard è presentato in figura 7.

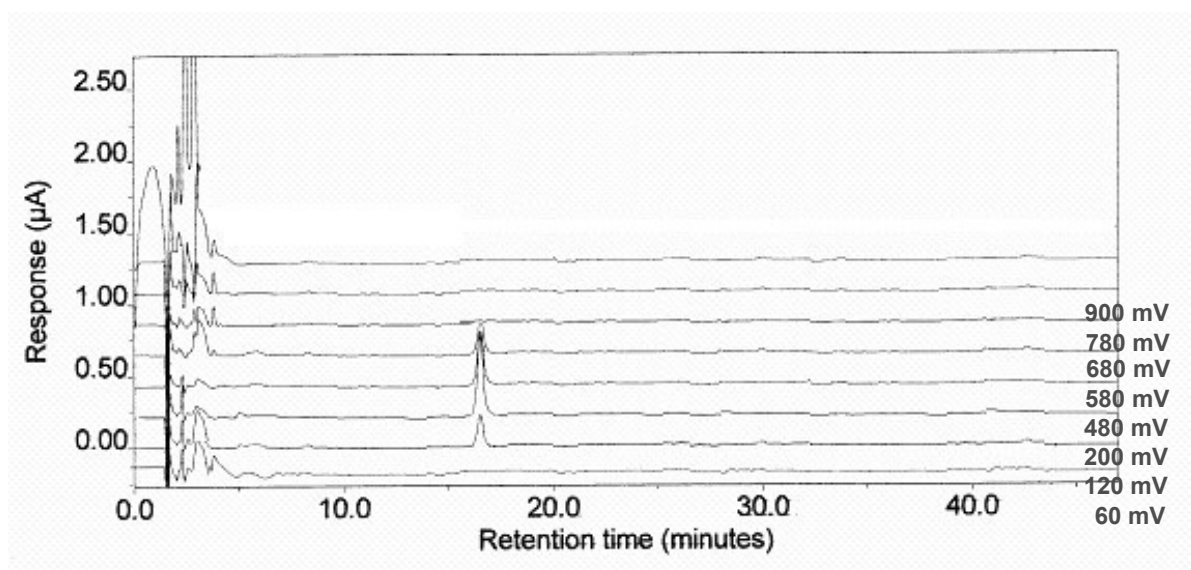


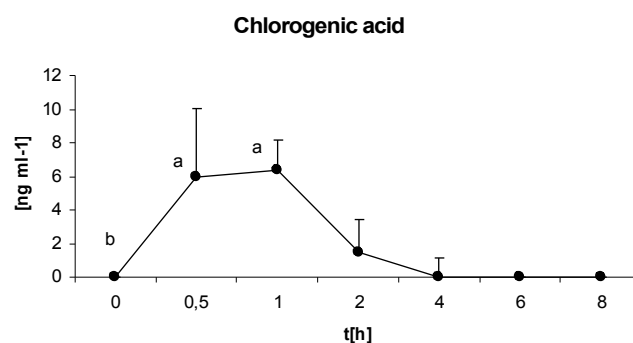
Figura 7 – Cromatogramma rappresentativo di una soluzione in MeOH di acido clorogenico.

4.6.0 Analisi del contenuto di polifenoli nel plasma

Qui di seguito sono illustrati i contenuti a tempi differenti delle molecole polifenoliche nel plasma dei soggetti supplementati con 61.7 g di capolino di carciofo cv Violetto di Provenza. I risultati sono espressi come medie di 5 soggetti ($\pm$ sd).

Nella figura 8 sono descritte le concentrazioni di acido clorogenico (CGA): un picco pari a 6.4 ng/ml è stato riscontrato ad 1 ora dal consumo di carciofo, mentre il decremento, fino alla completa non rilevabilità, è stato registrato entro le 2 ore successive ($P < 0.05$ test non parametrico di Friedman Anova).

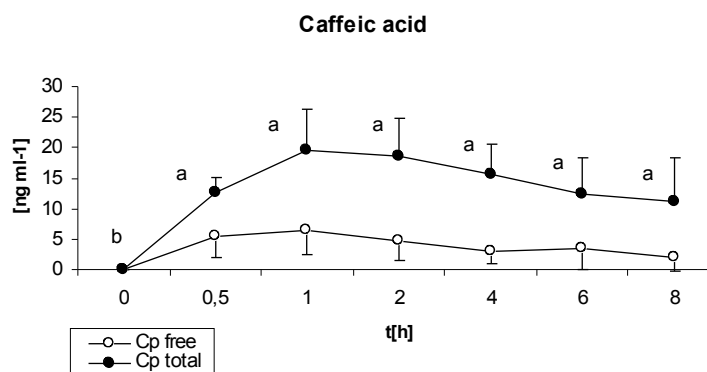
Figura 8 - Concentrazioni plasmatiche di acido clorogenico¹



¹ i risultati sono espressi come medie dei valori di 5 soggetti. Le deviazioni standard sono rappresentate dalle barre verticali.

In figura 9 sono riportati i risultati per gli acidi caffeici totali (CA). La concentrazione plasmatica massima (19.5 ng/ml) è stata raggiunta, come nel caso dell'acido clorogenico, ad 1 ora dall'assunzione di capolino di Romanesco. L'incremento della concentrazione degli acidi caffeici totali rispetto ai livelli iniziali è risultato essere significativo per $p < 0.05$ (test di Wilcoxon per campioni appaiati) .

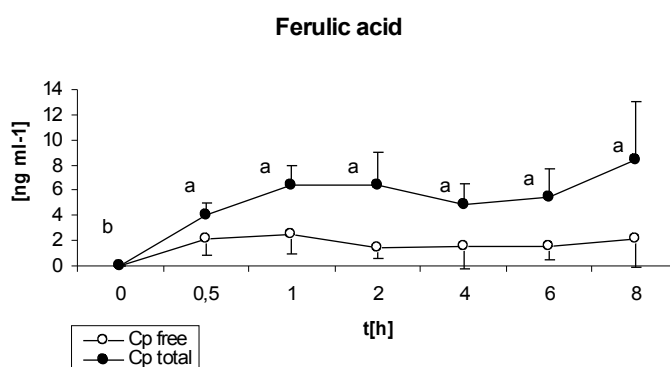
Figura 9 - Concentrazioni plasmatiche di acido caffeico¹



¹ i risultati sono espressi come medie dei valori di 5 soggetti. Le deviazioni standard sono rappresentate dalle barre verticali. ○, concentrazioni plasmatiche delle forme non coniugate dei polifenoli. ●, concentrazioni plasmatiche delle forme coniugate e non coniugate dei polifenoli.

Per quanto riguarda l'acido ferulico (FA) come descritto nella figura 10, è stato notato un andamento bifasico: con un picco ad 1 ora (6.4 ng/ml) ed un picco ad 8 ore (83.4 ng/dl) dall'assunzione dell'alimento. In entrambe le fasi, l'incremento rispetto ai valori iniziali è stato significativo ($p < 0.05$ test di Wilcoxon per campioni appaiati).

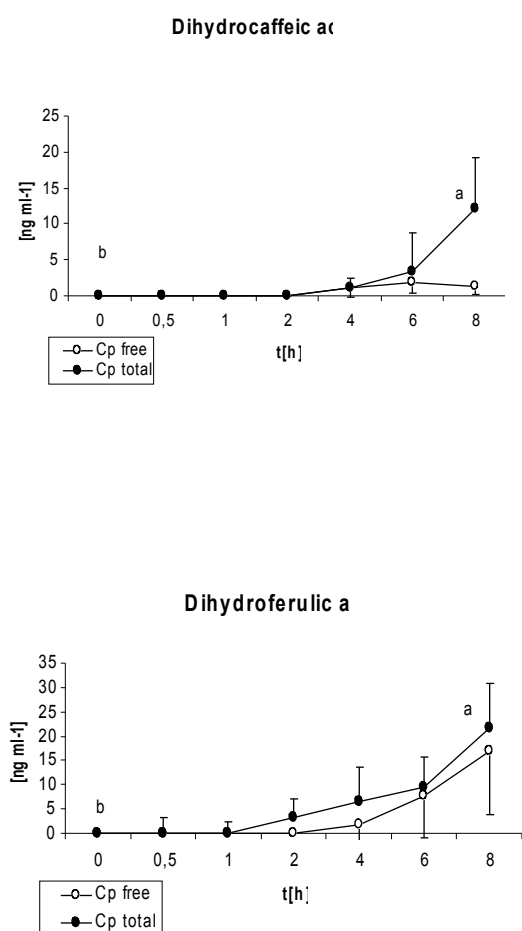
Figura 10 - Concentrazioni plasmatiche di acido ferulico¹



¹ i risultati sono espressi come medie dei valori di 5 soggetti. Le deviazioni standard sono rappresentate dalle barre verticali. ○, concentrazioni plasmatiche delle forme non coniugate dei polifenoli. ●, concentrazioni plasmatiche delle forme coniugate e non coniugate dei polifenoli.

Per l'acido deidrocaffeico (DHCA) è stato osservato, dopo 8 ore dal consumo di carciofo, un incremento significativo ($p < 0.05$ test di Wilcoxon per campioni appaiati) rispetto al base-line fino al raggiungimento di un picco di 12.1 ng/ml. Lo stesso andamento è stato riscontrato per l'acido deidroferulico totale (DHFA), per il quale è stato riscontrato un picco dopo 8 ore di 21.8 mg/ml. (Figura 11).

Figura 11 - Concentrazioni plasmatiche di acido diidrocaffeico e diidroferulico¹

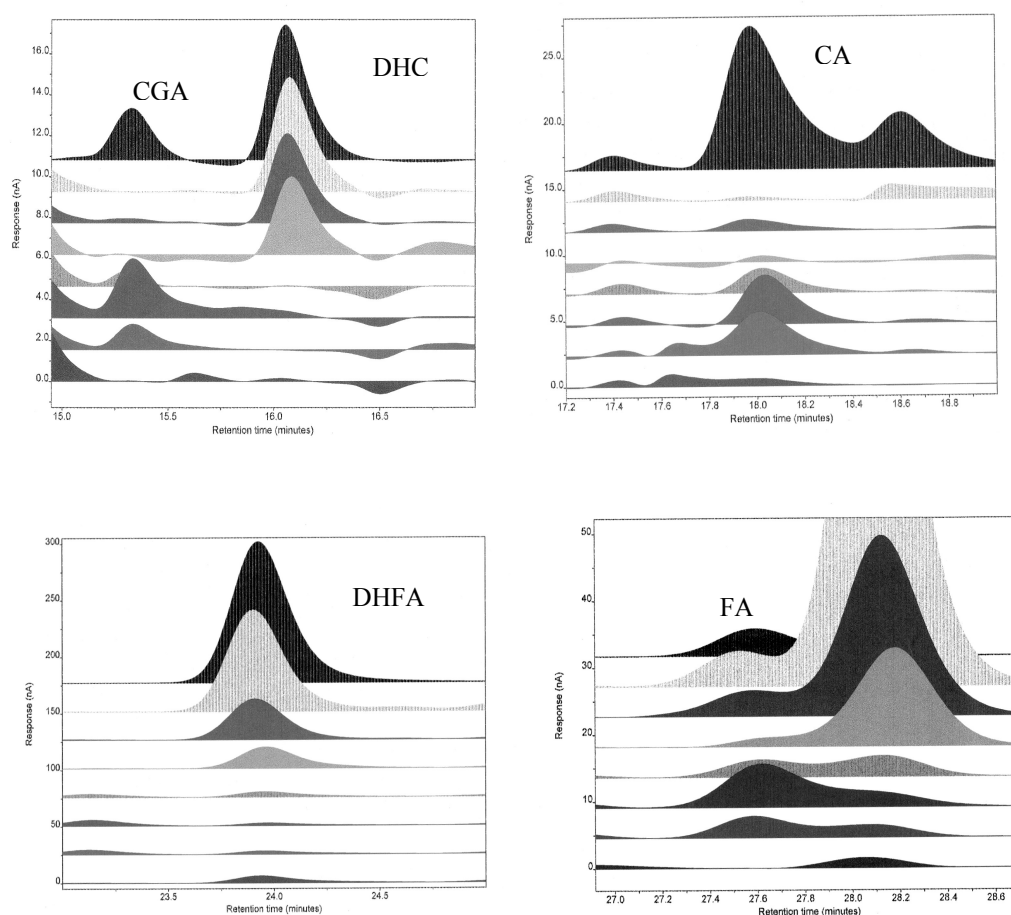


¹ i risultati sono espressi come medie dei valori di 5 soggetti. Le deviazioni standard sono rappresentate dalle barre verticali. ○, concentrazioni plasmatiche delle forme non coniugate dei polifenoli. ●, concentrazioni plasmatiche delle forme coniugate e non coniugate dei polifenoli.

Un cromatogramma rappresentativo mostra, in figura 12, il profilo di assorbimento delle molecole target identificate in un soggetto. I livelli sono descritti al base-line e durante tutta la durata dell'esperimento e sono confrontati con standard specifici. I picchi non nominati sono da considerare sconosciuti.

Non sono stati riscontrati livelli circolanti di luteolina ed apigenina.

Figura 12 - Cromatogramma del profilo di assorbimento dei polifenoli target in un soggetto¹



¹ CGA, acido clorogenico; DHCA, acido diidrocaffeoico; CA acido caffeico; DHFA, acido ferulico; FA, acido ferulico. I valori sono misurati al base-line e durante tutta la fase di supplementazione e comparati ad uno standard specifico. I picchi non nominati sono da considerare sconosciuti.

4.7.0 Potenziale antiossidante del carciofo *in vivo*

Nelle tabelle 8 ed 9 sono presentati i risultati delle analisi della capacità antiossidante plasmatica misurata con i metodi TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter) e FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) dei soggetti A, B, C, D, E prima e dopo la somministrazione di carciofo.

Sia per i valori di TRAP che per quelli di FRAP non è stato possibile osservare alcuna differenza significativa per $p < 0.01$ (Willcoxon test non parametrico) tra il valore basale e quelli misurati dopo la somministrazione di carciofo, a significare che, relativamente alla sensibilità dei metodi applicati, la somministrazione di 61.7 g di carciofo non perturba la capacità antiossidante plasmatica dei soggetti a digiuno.

Dalle tabelle 7 ed 8 si può osservare che i valori basali sia di TRAP che di FRAP dei diversi soggetti sono omogenei tra loro. Tale osservazione rappresenta una prova della omogeneità del campione selezionato per lo studio.

Tabella 8: capacità antiossidante plasmatica misurata con il metodo TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter) dei soggetti A, B, C, D prima e dopo somministrazione del pasto sperimentale.

<i>TRAP ($\mu\text{moli Trolox eq./l}$)</i>					
	A	B	C	D	E
T0	995,16	746,37	1015,89	663,44	932,96
T30	953,69	725,63	1015,89	518,31	870,76
T60	953,69	746,37	912,23	767,1	850,03
T120	912,23	725,63	995,16	787,83	829,3
T240	932,96	808,56	932,96	621,97	808,47
T360	829,3	808,56	953,69	580,51	839,56
T480	912,23	746,37	932,96	704,9	839,56

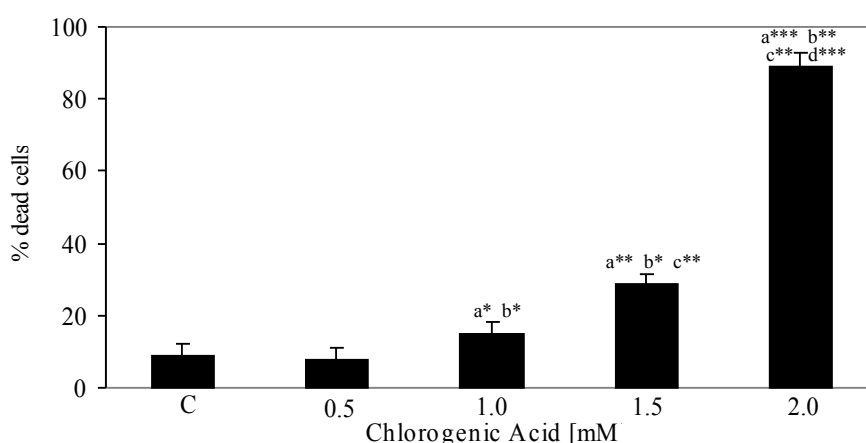
Tabella 9: capacità antiossidante plasmatica misurata con il metodo FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) dei soggetti A, B, C, D prima e dopo somministrazione del pasto sperimentale.

<i>FRAP ($\mu\text{moli Fe}^{2+}/\text{l}$)</i>					
	A	B	C	D	E
T0	643	560	768,621	637,682	500,792
T30	649	530,551	756,718	637,682	497,816
T60	637	459,130	726,959	596,020	527,575
T120	587	408,540	732,911	619,827	500,792
T240	593	500,792	795,404	598,996	479,961
T360	590	479,961	750,766	622,803	509,720
T480	634	512,695	747,790	661,489	515,671

4.8.0 Misura della citotossicità negli epatociti

Un monostrato di epatociti in coltura da 24 h è stato esposto a concentrazioni crescenti di acido clorogenico (ChA) (da 0.5 a 2.0 mM), il composto più rappresentativo nella frazione fenolica dell'estratto di carciofo e ad estratto di carciofo (AE). Dopo 60 minuti la citotossicità è stata valutata mediante il saggio del trypan blu. È stata evidenziata citotossicità solo a concentrazioni superiori a 1 mM (figura 1 stefania), mentre non è stata rivelata citotossicità per AE. (fig 13).

Figura 13 - Effetto dell'acido clorogenico sugli epatociti¹



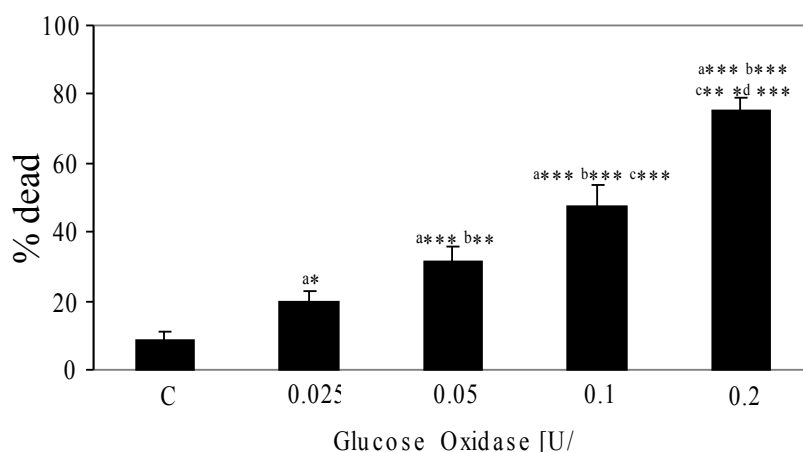
¹ Gli epatociti di ratto in coltura sono stati trattati con concentrazioni crescenti di acido clorogenico. La vitalità è stata determinata dopo 60 minuti. I risultati sono espressi come medie $\pm$ SD di determinazioni effettuate su 3 colture separate. I valori P derivano da Anova e T-Test e: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. a=control, b= concentrazione 0.5 mM, c= concentrazione 1.0 mM, d= concentrazione 1.5 mM.

4.9.0 Induzione di morte cellulare H₂O₂

L'esposizione di epatociti di ratto in coltura ad H₂O₂ è un modello apprezzabile per studiare i meccanismi di insulto cellulare indotto dallo stress ossidativo. Le cellule sono state esposte ad H₂O₂ generata nel mezzo di coltura dall'enzima glucosio ossidasi (GO). I risultati hanno mostrato che la morte cellulare è funzione della concentrazione di glucosio ossidasi aggiunta al mezzo di coltura contenente una concentrazione di 11 mM di glucosio. Dopo 1 h, ad una concentrazione di 0.1 U/ml di enzima, il 50 % delle cellule erano morte. Le

cellule non trattate (C) hanno mantenuto il 95 % di vitalità nelle stesse condizioni sperimentali (figura 14).

Figura 14 - Dose-dipendenza della morte degli epatociti in coltura trattati con glucosio ossidasi



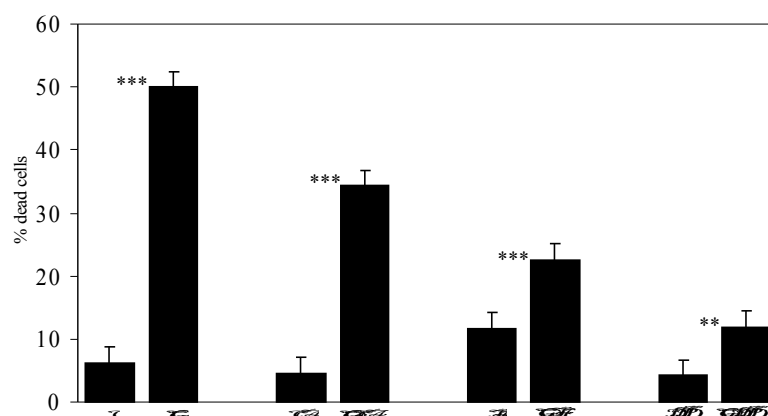
¹ Gli epatociti di ratto in coltura sono stati trattati con concentrazioni crescenti di glucosio ossidasi. La vitalità è stata determinata dopo 60 minuti. I risultati sono espressi come medie $\pm$ SD di determinazioni effettuate su 3 colture separate. I valori P derivano da Anova e T-Test e: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. a=control, b= concentrazione 0.5 mM, c= concentrazione 1.0 mM, d= concentrazione 1.5 mM.

4.10.0 Prevenzione da parte dell'estratto di carciofo della citotossicità di H_2O_2

In questo studio è stato valutato se l'estratto di carciofo fosse capace di prevenire la citotossicità di H_2O_2 . I risultati hanno mostrato come sia ChA che AE, alla concentrazione 1 mM, proteggessero le cellule dalla citotossicità di H_2O_2 . E' stato preventivamente provato che ChA e AE non inibiscono l'attività della glutazione ossidasi e conseguentemente la produzione di H_2O_2 .

Dopo 60 minuti circa il 50 % delle cellule erano morte nelle colture trattate con solo glucosio ossidasi. Il trattamento con AE ha prodotto il 55 % di cellule morte in meno rispetto al trattamento con glucosio ossidasi da solo, mentre il trattamento con ChA ha fornito una protezione minore. L'antiossidante DPPD ha, invece, fornito un effetto protettivo completo. (Figura 15)

Figura 15 - Effetto protettivo dell'estratto di carciofo sugli epatociti esposti a glucosio ossidasi¹

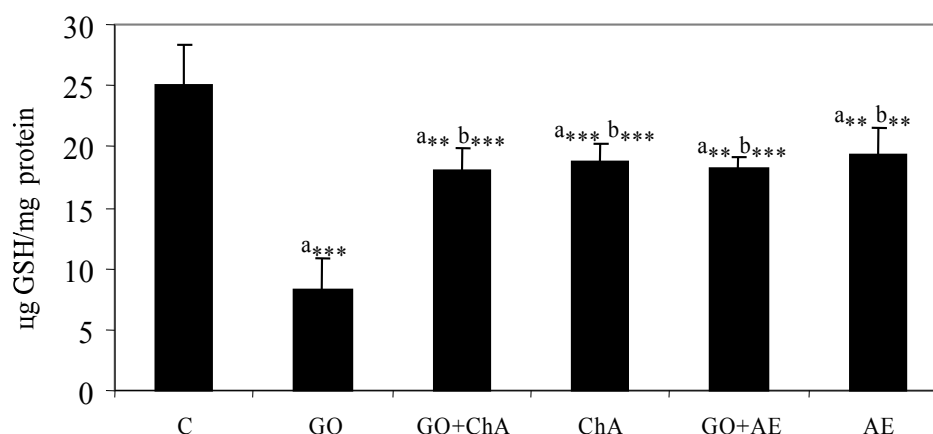


¹ gli epatociti sono stati trattati con 0.1 U/ml di GO da sola e con GO e 1 mM ChA, AE e DPPD. Dopo 60 minuti la vitalità cellulare è stata misurata. I risultati sono espressi come medie $\pm$ SD di determinazioni effettuate su 3 colture separate. I valori P derivano da Anova e T-Test e: * P<0.05, ** P< 0.01, *** P< di 0.001.

4.11.0 Misura dei valori di GSH e MDA

L'esposizione delle colture di epatociti a H₂O₂ ha causato il decremento del 70 % dopo 1 h dei livelli cellulari di GSH, la presenza di AE e di ChA ha prevenuto la perdita di GSH contemporaneamente all'effetto protettivo sulla vitalità cellulare (Fig 16).

Figura 16 - Influenza dell'estratto di carciofo sulla perdita di GSH negli epatociti trattati con glucosio ossidasi¹



¹ gli epatociti sono stati trattati con 0.1 U/ml di GO da sola e con GO e 1 mM ChA, AE. Dopo 60 minuti il contenuto di GSH è stato misurato. I risultati sono espressi come medie $\pm$ SD di determinazioni effettuate su 3 colture separate. I valori P derivano da Anova e T-Test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. a=contollo, b=GO.

La morte cellulare indotta dall' H_2O_2 è accompagnata dalla perossidazione lipidica misurabile come MDA. La presenza di DPPD nel mezzo previene per il 60 % l'accumulo di MDA parallelamente con l'effetto protettivo contro la tossicità di H_2O_2 .

Allo stesso modo AE e ChA prevengono l'accumulo di MDA negli epatociti in coltura esposti al glucosio ossidasi per 1 h. (Tab 2)

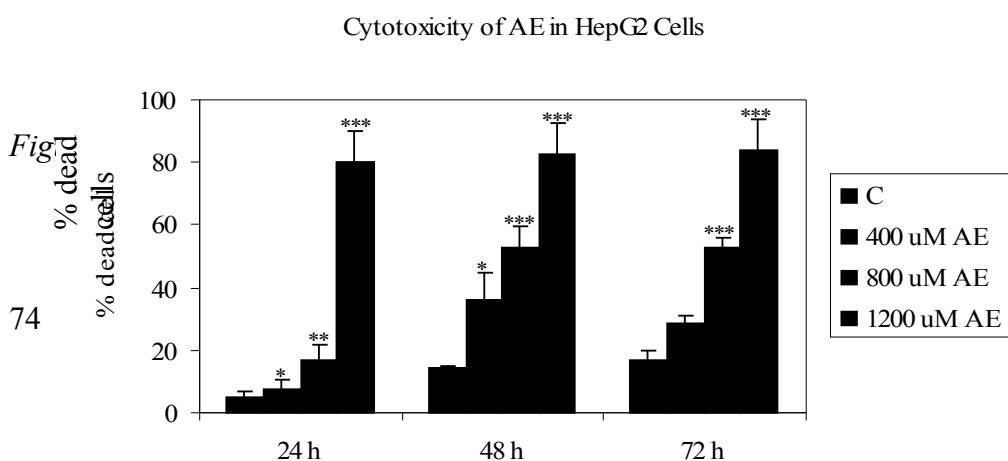
Tabella 10 - Influenza dell'estratto di carciofo sulla produzione di MDA in epatociti trattati con glucosio ossidasi¹

<i>trattamento</i>	<i>Perossidazione lipidica (nmol.MDA/mg proteina)</i>
Nessuna addizione	ND (5)
Glucosio Ossidasi solo	1.26±0.01 (51)
Glucosio Ossidasi plus ChA	ND (36)
Glucosio Ossidasi plus AE	0.10 ± 0.01 (25)
Glucosio Ossidasi plus DPPD	0.48 ±0.00 (16)
ChA	ND (10)
AE	ND (11)
DPPD	ND (6)

¹ gli epatociti sono stati trattati con 0.1 U/ml di GO da sola e con GO e 1 µM di DPPD e 1 mM ChA, AE. Dopo 60 minuti il contenuto di MDA è stato misurato. I risultati sono espressi come medie±SD di determinazioni effettuate su 3 colture separate in parentesi è espressa la percentuale di cellule morte.

4.12.0 Citotossicità indotta da AE nelle cellule HepG2

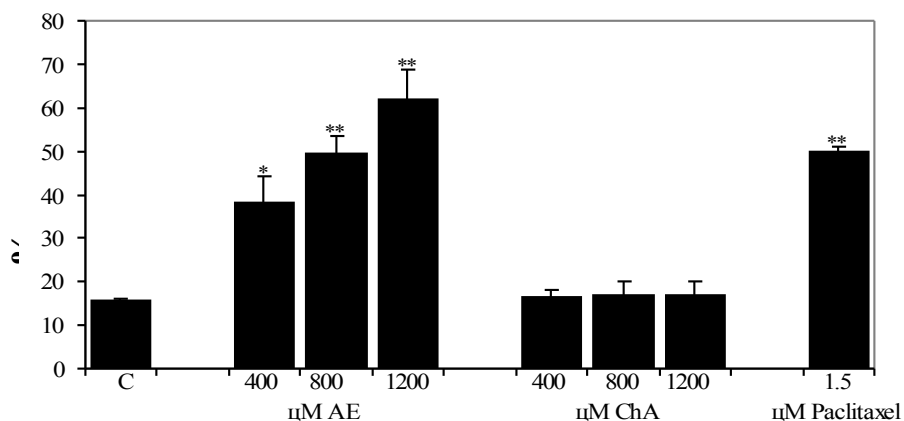
La potenziale citotossicità dell'estratto di carciofo sulle cellule cancerose è stato testato determinando la vitalità della linea cellulare di epatoma umano HepG2 tramite il saggio di esclusione del Trypan blu. Un trattamento di 24 h con AE mostra una riduzione drammatica superiore all'80 % della vitalità cellulare alla concentrazione maggiore testata di 1200 µmol/l. il livello della morte cellulare è rimasto costante durante la successiva incubazione fino a 72 h (Figura 17).



¹ le cellule HepG2 sono state poste nel mezzo senza siero e trattate con concentrazioni crescenti di AE (da 400 a 1200 μ M) per 24, 48 e 72 h. I risultati sono espressi come medie $\pm$ SD di determinazioni effettuate su 3 colture separate. I valori P derivano da Anova e T-Test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

4.13.0 Apoptosi indotta dal trattamento con AE nelle cellule HepG2

Sono stati misurati anche gli effetti sull'apoptosi sulle cellule HepG2. Dopo 24 h di trattamento con concentrazioni crescenti di AE in assenza di siero, la morte cellulare è stata testata con un citofluorimetro dopo doppia colorazione con annessina V e Ioduro di Propidio (PI). La popolazione di cellule legante annessina (annexinaV-FITC positivo/PI negativo), le cellule apoptotiche iniziali, è stata incrementata in una maniera dose-dipendente come mostrato in figura 6 ste. Mentre si è notato un 15% di cellule apoptotiche iniziali nel controllo, la popolazione di cellule apoptotiche era più del 50 % nelle cellule esposte ad una concentrazione 800 μ M di AE. La concentrazione più alta testata, 1200 μ M, ha causato il 65 % di apoptosi. Il controllo con il chemioterapico Paclitaxel 1.5 μ M ha indotto il 50 % di morte apoptotica dopo 24 h. Al contrario il trattamento con ChA, non ha prodotto una significativa attività apoptotica (figura 18). Monitorando le colture dopo 48 h, per seguire il decorso della citotossicità, si è riscontrato come il trattamento con ChA 1200 μ M inducesse il 50 % dell'apoptosi al contrario di quanto succedeva per l'esposizione ad AE. Questa osservazione ha suggerito come la combinazione dei composti fenolici presente in AE possa avere un effetto più rapido e più pronunciato rispetto al trattamento con ChA più efficace dopo 48 h.

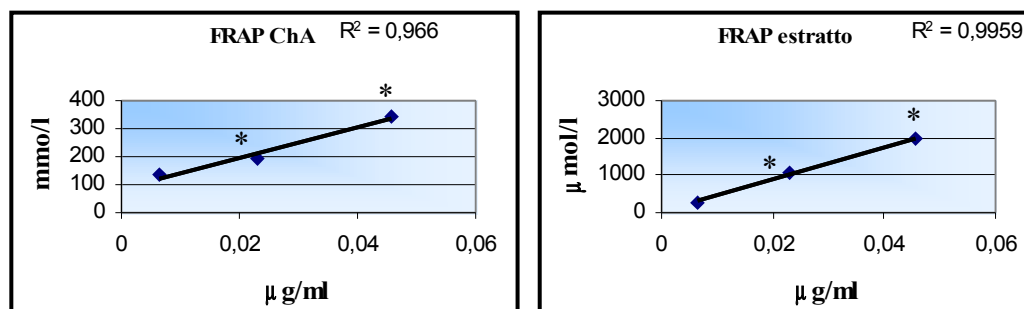
Figura 18 - Determinazione dell'apoptosi tramite citofluorimetria¹

¹ le cellule sono state trattate con AE, CHA o Paclitaxel alle concentrazioni indicate. I risultati sono espressi come medie $\pm$ SD di determinazioni effettuate su 3 colture separate. I valori P derivano da Anova e T-Test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

4.14.0 Capacità antiossidante totale misurata come FRAP dell'estratto e del ChA

In figura 19 sono descritti i valori di FRAP in relazione alle 3 diverse concentrazioni testate sia per il ChA (C) che per l'estratto (E). Si osserva un incremento significativo ($P < 0.0001$) dose-dipendente della capacità antiossidante in corrispondenza dell'aumento delle concentrazioni sia di ChA che di E. Il coefficiente di correlazione tra concentrazioni e valore di FRAP è elevato ($R^2 = 0.966$ per ChA e $R^2 = 0.996$ per E) ed è altamente significativo ($P < 0.0001$).

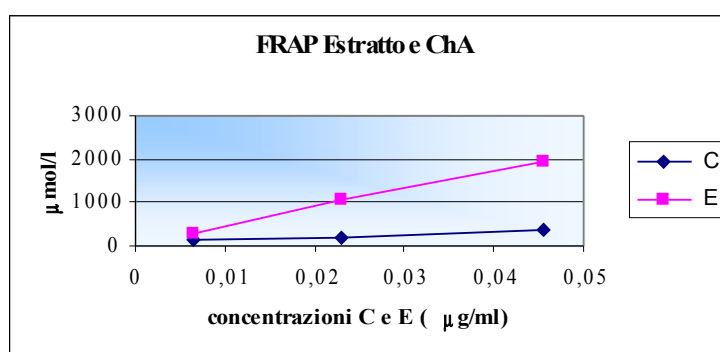
Figura 19 - Capacità antiossidante totale del ChA e dell'estratto¹



I risultati rappresentano la media e deviazione standard di 3 repliche analitiche e sono espressi come μM . * I valori P derivano da Anova: * $P < 0.0001$

In figura 20 è rappresentata la comparazione tra gli incrementi di FRAP dose-dipendenti sia per ChA che per E. A parità di concentrazione è possibile notare come l'incremento sia maggiore per E rispetto a ChA probabilmente a causa della presenza nell'estratto di altre molecole bioattive che contribuiscono sia singolarmente che con i loro effetti sinergici e di riciclo all'aumento dose-dipendente della capacità antiossidante totale.

Figura 20 - Paragone tra le curve di correlazione di ChA ed estratto.



I risultati rappresentano la media e deviazione standard di 3 repliche analitiche e sono espressi come μM

4.15.0 Modello sperimentale in vitro

Il modello sperimentale si basa sul probabile effetto protettivo di sostanze ad attività antiossidante contenute nell'estratto. L'aggiunta di un antiossidante durante la reazione di perossidazione indotta artificialmente nel sistema plasma dall'ABAP potrebbe essere direttamente proporzionale alla concentrazione e all'efficienza degli antiossidanti presenti nell'estratto.

In particolare, è stato studiato l'effetto dell'acido clorogenico, il composto fenolico maggiormente rappresentato nell'estratto di carciofo studiato.

Al pool sono state aggiunte successivamente 3 concentrazioni differenti di acido clorogenico (ChA), C1 = 0.0065 µg/ml (0.0183 µM), C2 = 0.0228 µg/ml (0.0643 µM), C3 = 0.0456 µg/ml (0.1286 µM) di plasma e le stesse 3 differenti concentrazioni di estratto (E1, E2, E3) misurate come ChA equivalenti).

Il FRAP è stato monitorato attraverso la variazione in funzione del tempo a 0, 3, 4, 5 e 7 ore.

4.16.0 Effetto delle 3 diverse concentrazioni di ChA sulla capacità antiossidante

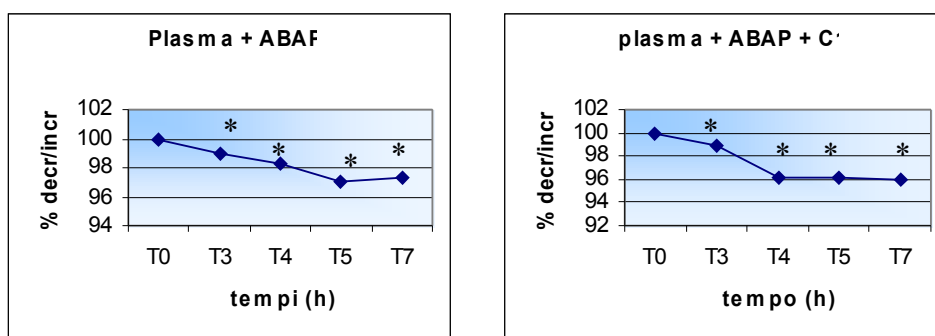
Nelle figure 21 e 22 è rappresentata come percentuale rispetto al valore iniziale la capacità antiossidante totale misurata come FRAP del modello sperimentale (plasma) esposto a stress ossidativo continuo con ABAP 0.37 mM in assenza (plasma + ABAP) e in presenza di concentrazioni differenti di ChA (plasma + ABAP + C1, plasma + ABAP + C2 e plasma + ABAP + C3). Nel sistema plasma + ABAP si osserva dopo 3 ore un decremento significativo ($P < 0.0001$) del valore FRAP rispetto al valore iniziale. Questo decremento procede in maniera significativa anche a T4 e T5. Al tempo T7 si nota una certa stabilizzazione dell'equilibrio tra antiossianti naturalmente presenti nel plasma e ossidante (ABAP).

Con l'aggiunta della prima concentrazione (C1 = 0.0065 µg/ml (0.0183 µM)) di antiossidante ChA, nel sistema Plasma + ABAP + C1 si osserva un andamento analogo a quello osservato nel sistema contenente solo ABAP.

Dalla curva che descrive il sistema Plasma + ABAP + C2 (C2 = 0.0228 µg/ml (0.0643 µM)), si può notare come ad 1 ora dall'aggiunta dell'antiossidante (T4) l'andamento sia ancora simile a quello dei due sistemi precedenti che mostrano decremento, ma a T5 si nota un incremento significativo dei valori di FRAP che raggiungono livelli addirittura superiori (104%) rispetto a quelli iniziali (T0) per continuare ad aumentare a T7 (106%).

Per quanto riguarda il sistema Plasma + ABAP + C3 (C3 = 0.0456 $\mu\text{g/ml}$ (0.1286 μM) l'incremento della capacità antiossidante si nota già dopo 1 ora dall'aggiunta di C3 (T4), fino a raggiungere il 105% rispetto al valore iniziale, per poi subire un decremento a T5 e T7.

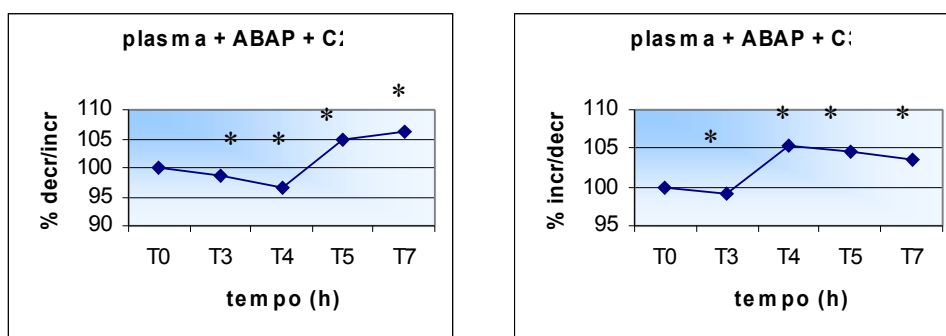
Figura 21 - FRAP del sistema Plasma + ABAP e Plasma + ABAP + C1¹



¹ i valori sono espressi come percentuale rispetto al valore iniziale e rappresentano la media e la deviazione standard di 3 repliche analitiche. I valori sono stati misurati all'inizio della sperimentazione (T0) dopo 3 ore (T3) prima che venisse aggiunto l'estratto e dopo 4, 5 e 7 (T4, T5, T7)

*variazione significative per $P < 0.001$ (Anova test ad una via) rispetto a T0

Figura 22 - FRAP del sistema Plasma + ABAP + C2 e Plasma + ABAP + C3¹



¹ i valori sono espressi come percentuale rispetto al valore iniziale e rappresentano la media e la deviazione standard di 3 repliche analitiche. I valori sono stati misurati all'inizio della sperimentazione (T0) dopo 3 ore (T3) prima che venisse aggiunto l'estratto e dopo 4, 5 e 7 (T4, T5, T7).

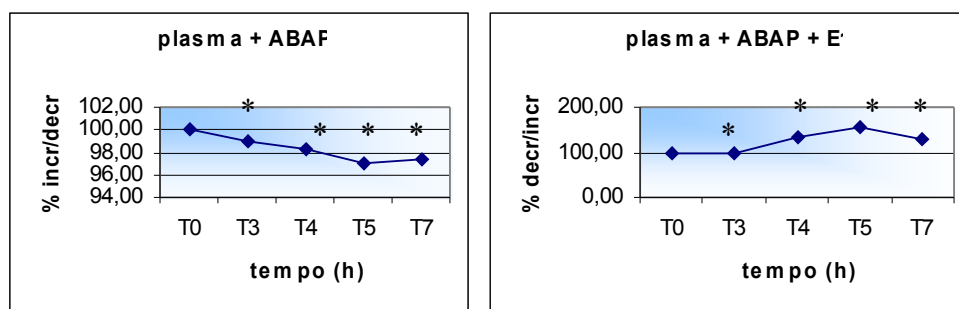
*variazione significative per $P < 0.001$ (Anova test ad una via) rispetto a T0

4.17.0 Effetto delle 3 diverse concentrazioni di estratto sulla capacità antiossidante

Nelle figure 23 e 24 sono espressi come percentuale rispetto al valore iniziale i valori di FRAP del modello sperimentale (plasma) esposto a stress ossidativo continuo con ABAP 0.37 mM in assenza (plasma + ABAP) e in presenza di concentrazioni differenti di estratto (plasma + ABAP + E1, plasma + ABAP + E2 e plasma + ABAP + E3). Il sistema Plasma + ABAP è lo stesso analizzato per l'esperimento con il ChA ed è stato già descritto precedentemente. Nel sistema plasma + ABAP + E1, dopo 1 ora dall'aggiunta dell'estratto (T4), si nota un incremento significativo ($P < 0.0001$) della capacità antiossidante del sistema particolarmente elevato (132 % rispetto al valore iniziale) che raggiunge livelli superiori a T5 (154 %) per poi ridiscendere a T7 (127 %).

Per quanto riguarda i due sistemi Plasma + ABAP + E2 e Plasma + ABAP + E3 si nota lo stesso andamento con un incremento netto e significativo ($P < 0.0001$) a T4, quindi ad 1 ora dall'aggiunta dell'estratto, con il raggiungimento di valori di gran lunga superiori rispetto ai valori basali (269 % per E2 e 371% per E3) mentre per il sistema contenente E2 i valori ridiscendono a T5 e T7 rimanendo sempre più elevati rispetto a quelli iniziali (265 e 256 %), per quanto riguarda il sistema con E3 si riscontra un ulteriore aumento a T5 (386 %) ed un successivo decremento a T7 (365 %).

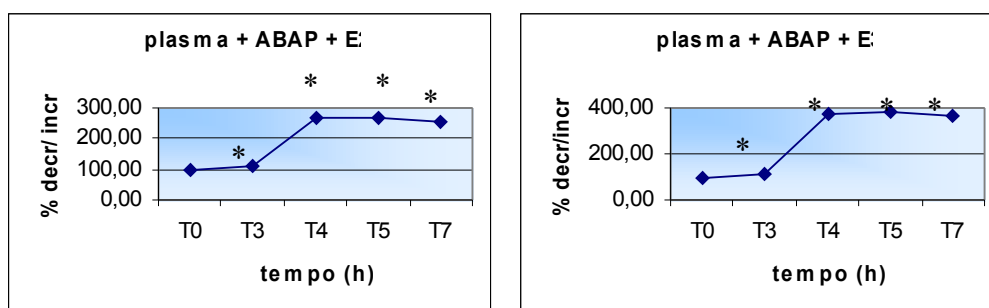
Figura 23 - FRAP del sistema Plasma + ABAP e Plasma + ABAP + E1¹



¹ i valori sono espressi come percentuale rispetto al valore iniziale e rappresentano la media e la deviazione standard di 3 repliche analitiche. I valori sono stati misurati all'inizio della sperimentazione (T0) dopo 3 ore (T3) prima che venisse aggiunto l'estratto e dopo 4, 5 e 7 (T4, T5, T7).

* variazione significative per $P < 0.001$ (Anova test ad una via) rispetto a T0

Figura 24 - FRAP del sistema Plasma + ABAP + E2 e Plasma + ABAP + E3¹



¹ i valori sono espressi come percentuale rispetto al valore iniziale e rappresentano la media e la deviazione standard di 3 repliche analitiche. I valori sono stati misurati all'inizio della sperimentazione (T0) dopo 3 ore (T3) prima che venisse aggiunto l'estratto e dopo 4, 5 e 7 (T4, T5, T7).

* variazione significative per $P < 0.001$ (Anova test ad una via) rispetto a T0.

5.0.0 Discussione e conclusioni

La dieta mediterranea, notoriamente ricca in frutta e verdura, è associata ad un basso rischio di incidenza di patologie caratterizzate da una componente eziologia ossidativa tra cui cancro, malattie cardio-vascolari e malattie a carico del sistema nervoso. (84, 85, 86, 87)

E' noto che il carciofo, ortaggio largamente presente nella dieta mediterranea, è ricco in polifenoli ed è dotato di un potenziale antiossidante che lo colloca in una posizione intermedia in una graduatoria stilata tra 34 alimenti di origine vegetale. (71).

Il carciofo è un alimento le cui proprietà benefiche sono note fin dai tempi dei Romani. Vari studi hanno dimostrato le potenziali attività benefiche di questo alimento, quali, per esempio, l'attività anticarcinogenica, antiossidante, epatoprotettiva, ipocolesterolemica. (88).

Questa ricerca ha consentito di mettere a confronto, da un punto di vista nutrizionale, diverse cultivar di carciofo provenienti da differenti aree di produzione per valorizzare la qualità dei prodotti tipici locali.

L'appartenenza a genotipi differenti e le tecniche colturali specifiche per ciascuna area di produzione e, di conseguenza, per ciascuna cultivar, permettono di distinguere i prodotti locali per i contenuti di molecole bioattive.

Scopo della prima parte della ricerca è stato quello di selezionare il prodotto con più alto contenuto in antiossidanti naturali, maggiormente consumato in Italia, utilizzato successivamente per la sperimentazione *in vivo* sull'uomo ed *ex vivo* sulle cellule.

Come è stato possibile osservare dai risultati di questa ricerca, il carciofo proveniente dalla Puglia, il *Violetto di provenza*, presenta il contenuto più elevato di luteina (carotenoide) e vitamina C, molecole antiossidanti tra le più studiate assieme ai composti fenolici, ritenute maggiormente responsabili dell'effetto preventivo nei confronti di gravi patologie degenerative nell'uomo di frutta e verdura.

Inoltre, benchè il carciofo *Violetto di Provenza* abbia mostrato di possedere i contenuti maggiori di luteina e vitamina C, il carciofo *Spinoso sardo* risulta essere il prodotto con la capacità antiossidante totale più elevata. La capacità antiossidante totale, misura sia delle singole attività delle diverse specie antiossidanti sia delle loro azioni sinergiche e/o di riciclo, assume oggi una nuova importanza come parametro aggiuntivo nella determinazione della qualità nutrizionale di un prodotto.

Ma, proprio a causa di queste diverse e sottili azioni sinergiche e di riciclo, non del tutto note ed identificabili, tra le molecole antiossidanti presenti in un sistema, non necessariamente si riscontra una corrispondenza tra i livelli dei singoli antiossidanti ed i livelli di capacità antiossidante totale.

Poichè i composti fenolici come ad esempio l'acido clorogenico, vengono ritenuti le principali molecole bioattive responsabili degli effetti salutistici del carciofo e considerati i contenuti maggiori di questa molecola nel *Violetto di Provenza* questa *cv* è stata selezionata per lo studio *in vivo* sull'uomo e per lo studio *ex vivo* sulle cellule.

Sulla base di quanto sopra esposto, ci siamo proposti di studiare la biodisponibilità dell'acido clorogenico, la molecola più rappresentativa della frazione fenolica del carciofo e le eventuali variazioni della capacità antiossidante plasmatica associate al consumo di carciofo.

Dimostrare la presenza di acido clorogenico nella circolazione sistemica dopo assunzione di carciofo, ovvero la sua biodisponibilità, permette di sostenere la possibilità che tale sostanza espliciti *in vivo* le proprietà biologiche mostrate *in vitro*, e conseguentemente di associare un potenziale effetto salutistico al consumo di carciofo.

Lo studio della biodisponibilità, del metabolismo dell'acido clorogenico nelle 8 ore successive all'ingestione della matrice alimentare ha consentito di avere un quadro biocinetico, seppure puramente orientativo, dell'interazione fisiologica di tale sostanza con l'organismo umano. Infine, la misurazione della capacità antiossidante plasmatica ha costituito un'indagine di supporto all'ipotesi per cui il carciofo, nella sua totalità, possa svolgere un'azione protettiva nei confronti

dell'organismo umano attraverso un contributo al mantenimento del potenziale antiossidante.

Il pasto somministrato nel nostro studio è consistito in 61.7 g di capolini di carciofo (cv Violetto di Provenza) cotti a vapore e in grado di fornire un introito di 189.7 mg di acido clorogenico.

La quantità di capolino di carciofo somministrata è stata scelta in modo da fornire una quantità di acido clorogenico comparabile con quella di altri studi analoghi, evitando al tempo stesso di causare ai soggetti a digiuno problemi di intolleranza gastrointestinale che in teoria poteva essere associata all'attività coleretica del carciofo.

Con questo lavoro di tesi è stato possibile dimostrare che alcuni composti presenti nel carciofo sono in grado di attraversare la barriera gastrica e, a seguito dell'assorbimento intestinale, sono in grado di raggiungere nel flusso sanguigno concentrazioni biologicamente efficaci.

E' ben noto come molte classi di polifenoli siano assorbite in modo sufficiente da avere effetti biologici. Per esempio, è stata dimostrata la presenza di concentrazioni micromolari nel sangue per la quercetina a seguito di ingestione di cipolle, così come per le catechine dopo consumo di tè, per gli isoflavoni contenuti in un pasto a base di soia e per l'acido caffeico a seguito dell'ingestione di vino rosso (89, 90, 91).

La biodisponibilità dipende da diversi fattori sia endogeni che esogeni: gli endogeni sembrerebbero essere correlati alla matrice alimentare, alle dimensioni, alla struttura chimica ed alle quantità di alimento ingerite; i fattori esogeni, invece, sembrerebbero dipendere dall'attività degli enzimi digestivi, dall'escrezione biliare, dalle biotrasformazioni legate al fegato, ai reni, all'epitelio gastrointestinale ed alla microflora intestinale.

Il tempo medio riscontrato per l'acido clorogenico per raggiungere la concentrazione massima di 6.4 ng/ml è sorprendente. Alcuni autori hanno osservato un rapido assorbimento dell'acido clorogenico dopo somministrazione orale del composto puro e a seguito di supplementazione con estratto di fiori di caprifoglio (92) in ratti e conigli (93).

Acido clorogenico non modificato è stato anche misurato nelle urine umane (94, 95, 96). Di contro, altri autori non hanno riscontrato acido clorogenico intatto nel plasma di ratti supplementati con il composto puro (97) o a seguito d'ingestione di caffè da parte di soggetti umani (98). Il rapido rilevamento di acido clorogenico (CGA) nel plasma potrebbe essere dovuto all'assorbimento di molecole intatte di CGA attraverso lo stomaco o l'intestino tenue. Lafay et al. (92) hanno individuato CGA non modificato sia nella vena gastrica che nell'aorta dimostrando che lo stomaco potrebbe essere coinvolto nell'assorbimento di questa molecola nei ratti. Othof et al. (95) hanno indicato, a seguito di uno studio condotto sull'uomo, come un terzo delle molecole di acido clorogenico fosse assorbito nell'intestino tenue. Ad ogni modo, i bassi valori di acido clorogenico riscontrati nel plasma in questo lavoro di tesi suggeriscono come la porzione più abbondante di acido clorogenico e di acidi dicaffeilchinici subiscano biotrasformazioni.

L'idrolisi dell'acido clorogenico e degli acidi dicaffeilchinici ed il rilascio dei loro metaboliti potrebbero iniziare nell'intestino tenue. Inoltre, Andreasen e colleghi (61) hanno mostrato che esterasi con attività simili agli esteri dei principali idrossicinnamati presenti nella dieta sono distribuiti nei mammiferi lungo il tratto intestinale.

L'acido caffeico e l'acido ferulico osservati in questo lavoro di tesi potrebbero originare dall'idrolisi sia dell'acido clorogenico che degli acidi caffeilchinici che rappresentano le forme polifenoliche predominanti nel pasto sperimentale fornito ai soggetti di questo studio. I coniugati dell'acido caffeico e dell'acido ferulico raggiungono il massimo della concentrazione dopo un'ora e mezza dall'ingestione del pasto sperimentale a base di capolini di carciofo. Questi risultati sembrerebbero suggerire che l'idrolisi dei composti attivi potrebbe avvenire nell'intestino tenue (92, 97, 98).

Al raggiungimento dell'intestino crasso, prima dell'assorbimento, l'acido clorogenico intatto verrebbe idrolizzato dagli enzimi presenti nel colon in vari metabolici aromatici (acido m-cumarico, derivati degli acidi fenilpropionici e benzoici. 99, 100). Diversi metabolici sono stati identificati nell'uomo a seguito

dell'ingestione di acido clorogenico e caffeico come l'acido ferulico, isoferulico, deidroferulico e vanillico (101).

La microflora batterica presente nel colon è stata designata come la principale responsabile metabolica delle reazioni di rottura degli esteri o dei legami glicosidici e del consecutivo rilascio degli acidi idrocinnamici liberi (102, 103, 100).

I nostri risultati permettono di asserire, in accordo con Wittemer e colleghi (104), che il tempo medio per raggiungere le concentrazioni massime per l'acido deidrocaffeoico e deidroferulico possa essere stimato intorno alle 6-8 ore. Il decremento della concentrazione di acido caffeico entro le 6 ore ed il simultaneo aumento dei livelli di acido deidrocaffeoico e deidroferulico nella circolazione ematica sembrerebbero suggerire come l'acido caffeico, rilasciato dopo idrolisi da parte della microflora dell'acido clorogenico e degli acidi dicaffeilchinici, sia metabolizzato nell'acido deidrocaffeoico prima dell'assorbimento. Questi risultati, in accordo con quelli descritti da Peppercorn Goldman già nel 1971, potrebbero indicare l'intestino come probabile e predominante sede del metabolismo degli esteri idrocinnamici. (61, 103)

Evidenze scientifiche suggeriscono che l'acido deidrocaffeoico assorbito potrebbe essere mutilato nell'acido deidroferulico e quindi deidrogenato in acido ferulico nel fegato (104). Tuttavia, i risultati di questo lavoro di tesi indicano come gli stessi meccanismi di reazione potrebbero avvenire nell'intestino crasso, in particolare la deidrogenazione da parte della microflora e del colon e la metilazione nelle pareti del colon. Questo in parte contribuirebbe a spiegare il profilo bifasico della concentrazioni osservato nei campioni analizzati per il nostro studio per l'acido ferulico totale.

Moridani e colleghi (105) hanno riportato che le reazioni di biotrasformazione dell'acido caffeico e deidrocaffeoico come la o-metilazione, la coniugazione al GSH, la idrogenazione e la deidrogenazione avvengono nel fegato catalizzate dalla citocromo P450. D'altro canto, alcuni ricercatori suggeriscono che la metilazione dell'acido caffeico e deidrocaffeoico in acido ferulico e deidroferulico rispettivamente possano avvenire nell'intestino (99, 106,107).

Sia nei ratti che nei soggetti umani i fenoli provenienti dalla dieta possono essere metabolizzati per formare intermedi reattivi dalla catecol-o-metiltransferasi presenti nel fegato, nei reni e nel tratto gastrointestinale sia all'altezza dello stomaco che dell'intestino (109,110,111).

In questo lavoro di tesi, la mancanza del riscontro di livelli circolanti di luteolina e apigenina potrebbe essere attribuita ai loro bassi contenuti nel pasto sperimentale somministrato ai soggetti.

Diversi fattori potrebbero spiegare la variabilità della biodisponibilità dei polifenoli, come la matrice alimentare o il background dietetico. Inoltre sono da ritenere importanti le variazioni interindividuali tra soggetto e soggetto: alcune persone potrebbero avere livelli differenti di enzimi metabolizzanti o di trasportatori che potrebbero impedire un efficiente assorbimento dei composti bioattivi.

In conclusione questo lavoro mostra per la prima volta la via di assorbimento degli acidi idrossicinnamici a seguito del consumo della porzione edibile di capolino di carciofo in soggetti umani. Questi risultati dovrebbero essere supportati da altri studi investigativi per confermare l'attività biologica del carciofo cotto nell'uomo e per meglio capire i meccanismi dei fenoli derivanti dalla dieta.

Per quanto riguarda la capacità antiossidante plasmatica, espressa come TRAP e FRAP, tali parametri non sono risultati essere modificati in seguito ad una ingestione di 61.7 g di carciofo.

La mancanza di associazione diretta tra l'aumento di acido clorogenico nel plasma ed un corrispondente aumento della capacità antiossidante plasmatica può essere dovuto ad una serie di cause ed in particolare al fatto che l'acido clorogenico, sebbene biodisponibile, non abbia avuto, alle concentrazioni riscontrate, un impatto significativamente rilevabile sul sistema antiossidante plasmatico. Va infatti notato che tutti i soggetti si trovavano in un intervallo medio-elevato dei valori di TRAP e FRAP, che rispecchiano, assieme ad un insieme di caratteristiche individuali specifiche (età, sesso, genotipo-fenotipo etc) anche un profilo alimentare in grado di fornire un apporto elevato di molecole antiossidanti.

In letteratura, relativamente agli studi di biodisponibilità e di capacità antiossidante plasmatica di una sostanza in esame, è già stata osservata una assenza di associazione, tra i valori delle concentrazioni delle molecole antiossidanti ritrovabili nel plasma e la loro capacità di aumentare il valore dalla capacità antiossidante simile a quella riscontrata nel nostro studio.

Negli ultimi cinque anni, sono stati avviati studi tesi ad investigare l'effetto protettivo degli estratti di cardo selvatico, utilizzando modelli animali e modelli *in vitro*. Agarwal e Mukhtar (36), hanno dimostrato che la silimarina, un componente fenolico del cardo selvatico, è in grado di ritardare la proliferazione di cellule tumorali di pelle di ratto indotta da promotori cancerogenici. Gebhardt e Fausel (112) hanno evidenziato che estratti provenienti da foglie di cardo selvatico esplicano una protezione antiossidante nei confronti degli epatociti di ratto sottoposti a stress ossidativo.

Altre molecole come resveratrolo e antocianine, note per la loro capacità antiossidante, si sono dimostrate attive anche sul ciclo cellulare. Se queste due attività siano tra loro indipendenti o se la seconda sia una conseguenza della prima non è ancora noto. Tuttavia l'attività biologica complessa di queste molecole conferisce loro un più completo ruolo protettivo nei confronti di specie chimiche ossidanti e indica, indirettamente, che tali specie possano esser implicate nella regolazione della crescita cellulare.

Questo lavoro di ricerca ha permesso di investigare sia l'effetto antiossidante a livello cellulare ed in un sistema plasmatico *in vitro*, sia l'effetto epatoprotettivo dell'estratto di carciofo.

Gli epatociti di ratto sono stati esposti a H_2O_2 generata nel mezzo dall'enzima glutatione ossidasi. Questo ha portato ad una diminuzione di GSH accompagnata dalla perossidazione dei lipidi cellulari e dalla perdita di vitalità cellulare. In presenza di AE la diminuzione di GSH e la produzione di MDA vengono significativamente ridotte con la prevenzione della morte cellulare.

L' H_2O_2 generata dall'enzima glucosio ossidasi porta al danno nei confronti degli epatociti coinvolgendo il ciclo GSH/GSSG in difesa contro concentrazioni

tossiche di H_2O_2 (dopo 1 h) che porta ad un accumulo di perossidi endogeni seguita dalla formazione di agenti ossidanti. Queste ultime specie portano alla perossidazione dei lipidi di membrana e quindi alla morte cellulare. Il fatto che DPPD, ChA e AE decrementino la produzione di MDA, prodotto della perossidazione lipidica, riflette le loro proprietà antiossidanti così come il ruolo protettivo dell'estratto AE nei confronti della tossicità dell' H_2O_2 . AE e ChA prevengono anche la perdita di GSH e questi risultati sono in linea con gli altri dati presenti in letteratura sugli effetti del carciofo contro lo stress ossidativo. (113)

E' stata già ampiamente descritta l'attività antiploriferativa dei polifenoli provenienti dalla dieta (114, 115). La crescita incontrollata delle cellule trasformate derivante da un'inadeguata attività degli oncogeni e dei geni soppressori così come la mancata apoptosi sono i due principali parametri collegati al cancro. E' stata comparata l'azione del chemioterapico Paclitaxel, utilizzato contro vari tipi di cancro e induttore di apoptosi delle cellule HepG2 (116), all'azione del ChA e AE nelle stesse condizioni sperimentali. L'estratto di carciofo ha mostrato un'induzione di apoptosi dose dipendente sulle cellule HepG2 entro le 24 ore al contrario di quanto osservato, in accordo con i dati presenti in letteratura, per ChA. Questo fa ipotizzare come l'attività apoptotica di AE derivi dall'azione combinata o sinergica di un numero di composti bioattivi presenti nella parte edibile del carciofo. Il meccanismo in cui AE induce l'apoptosi nelle cellule HepG2 e quali vie siano interessate sono attualmente sotto studio.

Per quanto concerne i risultati relativi allo studio *in vitro*, risulta evidente come la concentrazione di acido clorogenico più bassa (0.0065 $\mu\text{g/ml}$) non abbia alcun effetto sulla perossidazione indotta artificialmente con l'agente stressante ABAP 0.37 μM (stress fisiologico).

Questa concentrazione, scelta in base al quantitativo di acido clorogenico riscontrato nel plasma di soggetti sani dopo assunzione di 61.7 g di carciofo cotto in uno studio condotto precedentemente nei nostri laboratori, non è sufficiente a contrastare la produzione di radicali prodotta dall'ABAP.

In questo studio è stato utilizzato come modello *in vitro* il sistema Plasma + ABAP + antiossidanti. Questo modello potrebbe essere comparabile ad un sistema fisiologico completo come l'organismo umano. Si può, quindi, asserire che tale quantitativo di alimento somministrato potrebbe non essere sufficiente ad apportare "protezione" nei confronti dello stress ossidativo.

Questo dato conferma e giustifica la mancanza d'incremento dei valori di capacità antiossidante plasmatica già precedentemente osservata a seguito della supplementazione in acuto con carciofo nel suddetto studio.

Le concentrazioni superiori utilizzate, invece, mostrano un contributo positivo alla capacità antiossidante totale.

Al contrario di quando accade per la concentrazione di ChA più bassa, lo stesso quantitativo di acido clorogenico fornito al sistema *in vitro* con l'estratto di carciofo in toto porta ad un incremento significativo della capacità antiossidante totale. Un effetto simile si nota in maniera ancora più accentuata per le altre due concentrazioni di estratto E2 ed E3.

I valori così elevati di capacità antiossidante misurati per le concentrazioni E2 (265 %) ed E3 (386 %) suggeriscono come non solo queste concentrazioni blocchino la formazione di radicali indotta dall'ABAP, ma in un certo senso sembra che restaurino ed incrementino significativamente la capacità antiossidante del sistema.

Purtroppo, i calcoli effettuati per stabilire le concentrazioni di ChA utilizzate, C2, C3, E2 ed E3, corrispondono solo ipoteticamente ai livelli plasmatici riscontrabili a seguito di ingestione di 216.5 g per C2 ed E2 e 432.98 g per C3 ed E3. Studi sulla biodisponibilità di questi composti derivanti da matrici alimentari sono attualmente in corso e per ora non è possibile fornire delle raccomandazioni nutrizionali al pubblico.

Comunque, questi risultati confermano come ChA contribuisca al potenziale protettivo, ma, da solo, non giustifica le proprietà complete dell'estratto di carciofo a conferma delle possibili azioni ed interazioni tra le varie molecole presenti in soluzione.

Questi risultati sono compatibili con altri studi epidemiologici presenti in letteratura che hanno mostrato che l'azione dei nutrienti antiossidanti per se non esplica in maniera esaustiva i benefici salutistici di una dieta ricca in frutta e verdura.

In conclusione, questi dati dimostrano come l'estratto della parte edibile di carciofo abbia un pronunciato effetto antiossidante ed attività apoptotica che potrebbero essere d'interesse clinico rispetto sia ad una possibile attività di prevenzione associata al consumo di carciofo che ad un possibile utilizzo terapeutico.

6.0.0 Bibliografia

1. Esquinas-Alcazar JT. Forum (Genova). 9 (3 Suppl 3): 84-7. 1999.
- 2. Bianco VV. Carciofo (*Cynara scolimus* L.) “Orticoltura” V:V. Bianco, F. Pampini Patron Editore Bologna. 1990.**
3. Llorach R., Espin J. C., Tomàs- Barberà F. A., and Ferreres F. Artichoke (*Cynara scolymus* L.) by products as a potential source of health-promoting antioxidant phenolics. J. Agric. Food Chem. 50: 3458-3464. 2002
4. Wang M, Simon JE, Aviles IF, He K, Zheng Qun-Yi, and Tadmor Y. Analysis of antioxidant phenolic compounds in Artichoke (*Cynara scolymus* L.) . J. Agric. Food Chem. 2002.
5. Lattanzio V, Vanadio S. Taranto G. Distribuzione di composti ortodifenolici in estratti di differenti parti del carciofo. Ind Conserve 53: 29-33. 1978.
- 6. Gebhardt R. Inibition of cholesterol biosynthesis in primary cultured rat hepatocytes by Artichoke (*Cynara scolimus* L.) extracts. JPET 286: 1122-1128. 1998.**
7. Adzet T, Camarasa J, Laguna J C. Hepatoprotective activity of polyphenolic compounds from *Cynara scolymus* against CCl₄ toxicity in isolated rat hepatocytes. J Natur Prod. 50: 612-617. 1987.

8. Azzini E, Bugianesi R, Romano F, Di Venere D, Miccadei S, Durazzo A, Foddai MS, Catasta G, Linsalata V, Maiani G. Absorption and metabolism of bioactive molecules after oral consumption of cooked edible heads of *Cynara scolymus* L. (cultivar Violetto di Provenza) in human subjects: a pilot study. *Br J Nutr.* 97(5):963-9. 2007.

9. Law MR.& Morris JK. By how much does fruit and vegetable consumption reduce the risk of ischaemic heart disease? *Eur. J. Clin. Nutr.* 52: 549 – 556. 1998.

10. Weisburger JH Nutritional approach to cancer prevention with emphasis on vitamins, antioxidants and carotenoids. *Am. J. Clin. Nutr.* 53 (suppl): 226 S – 237 S. 1991.

11. Hertog MGL, Bueno-de-Mosquita HB, Fahily AM, Sweetnam PM, Elwood PC & Kromhout D. Fruit and vegetable consumption and cancer mortality in the Caerphilly Study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 5: 573 – 677. 1996.

12. Lampe JW. Health effects of vegetables and fruit : assessing mechanism of action in human experimental studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 70 (suppl): 475 S – 90 S. 1999.

13. Halliwell B & Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford:Clarendon Press. 1999.

14. Ghiselli A, Serafini M, Maiani G, Azzini E & Ferro-Luzzi A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free. Rad. Biol. Med.* 18 (1): 29-36. 1995.

- 15.** Ghiselli A, Serafini M, Natella F & Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: a critical view and experimental data. *Free. Radic. Biol. Med.* 29(11): 1106-1114. 2000.
16. Keys A. Seven countries: a multivariate analysis of death and coronary heart disease. Cambridge, MA: Harvard University Press. 1980.
17. Block G, Patterson B & Subar A. Fruit, vegetables and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer* 18: 1-29, 1992.
- 18.** Gramenzi A, Gentile A, Fasoli M, Perezzi F & La Vecchia C. Association between certain foods and risk of myocardial infarction in women. *Br. Med. J.* 300: 771-773. 1990.
19. Ness AR & Powels JW. Fruit and vegetables and cardiovascular disease: a review. *Int. J. Epidemiol.* 26: 1-13. 1997.
20. Steinmatz KA & Potter JD. Vegetables, fruit and cancer prevention: a review. *J. Am. Diet Ass.* 96: 1027-39. 1996.
21. Gey KF. On the antioxidant hypothesis with regard to arteriosclerosis. *Bibl. Nutr. Dieta* 37: 53-9. 1986.
22. Gey KF. The antioxidant hypothesis of cardiovascular disease: epidemiology and mechanism. *Biochem. Soc. Transact.* 18: 1041-5. 1990.
23. World Health Organization The WHO MONICA Project. *World Health Stat. Q.* 42: 27-149. 1989.

24. St Leger AS, Cochrene AL & Moore F. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet* 12: 1017-1020. 1979.
25. Frankel EN, Watherhouse AL & Teissedre PL. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 341: 454-457. 1993.
26. Harborne JB & Mabry TJ. *The flavonoids: advances in research*. London: Chapman & Hall. 1982.
27. Hedin PA & Wangea SK. Roles of flavonoids in plant resistance to insects. *Progress in Clinical and Biological Research*, ed. Cody, Middleton, Harborne and Liss. New York: Liss. 1986.
28. Yuting C, Rongliang Z, Zhonjian J & Yong J. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidant. *Free Rad. Biol. Med.* 9: 19-21. 1990.
29. Rusznyak ST. & Szent-Gyorgi A. Vitamin P: flavonols as vitamins. *Nature* 138: 27-28. 1936.
30. Harborne JB & Williams CA. Advances in research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481-504. 2000.
31. Lattanzio V. "Ortofrutticoli freschi " a cura di Poma, Treccani, e Fiorentini (monografia 2). 1984.
32. Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Ka MB & Kronhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary hearth disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 342: 1007-1011. 1993.

33. Knekt P, Jervinen R, Reunamen A & Maatela J. Flavonoids intake and coronary mortality in Finland: a cohort Study. Br. Med. J. 312. 1996.

34. *Djoussè L, Arnett DK, Coon H, Province MA, Moore LL, and Ellison RC. Fruit and vegetables consumption and LDL cholesterol: the National hearth, lung, and blood institute family hearth study. Am J Clin Nutr 79: 213-7. 2004.*

35. Scalbert A and Williamson G. Dietary intake and biodisponibility of poliphenols. J. Nutr. 130: 2073- 2085. 2000.

36. *Agarwal R and Muktar H Cancer prevention by polyphenols in green tea and artichoke Dietary phitochemicals in cancer prevention and treatment American institute for cancer research, Plenum Press, New York. 1996.*

37. Choi YJ, Kang JS, Han Yoon Park J, Lee YJ, Choi JS and Kang YH. Polyphenolic flavonoids differ in their antiapoptotic efficacy in hydrogen peroxide-treated human vascular endothelial cells. Biochemical and molecular actions of nutrients. 985- 991. 2002.

38. *Ramos S, Alia M, and Goya L. Comparative effects of food – derivated polyphenols on the viability and apoptosis of a human hepatoma cell line (HepG2) J. Agric. Food Chem. 53: 1271-1280. 2005.*

39. Bors W & Saran M. Radical scavenging by flavonoid antioxidants. Free Radical Res. 2: 289-294. 1987.

40. Hu JP, Calomme M, Lasure A, De Bruyne T, Pieters L, Vlietinck A & Van den Berghe A. Structure-activity relationship of flavonoids with superoxide scavenging activity *Biol. Trace Elem. Res.* 47: 327-331. 1995.
41. Rafat Husain S, Cillard J & Cillard P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids *Phytochemistry*. 26: 2489-2491. 1987
42. HanasakyY, Ogawa S & Fukui S. The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effect of flavonoid *Free Rad. Biol. Med.* 16: 845-850. 1994.
43. Chimi H, Chillard J, Chillard P & Rahmani M. Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants *JAOCS* 68: 307-312. 1991.
44. Terao J, Pskula M & Yao Q. Prospective effect of epicatechin, epicatechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers *Arch. Biochem. Biophys.* 308: 278-284. 1994.
45. Morel I, Lescoat G, Cillard P, & Cillard J. Role of flavonoids and iron Chelation in antioxidant action. *Methods Enzymol.* 234: 437-43. 1994.
46. Negre-Salvayre A & Salvayre R. Quercetin prevents the cytotoxicity of oxidized LDL on lymphoid cell lines *Free Rad. Biol. Med.* 12: 101-106. 1992.
47. Yan LJ, Droy-Lefaix MT & Pacher L. Ginkgo biloba extract (Egb 761) protects human low density lipoproteins against oxidative modification mediated by copper *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212: 360-366. 1995.

48. Ali M, Afzal M, Gubler CJ & Burka JF. A potent thromboxane formation inhibitor in green tea leaves. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acid* 40: 281-283. 1990.
49. Sagesaka-Mitane Y, Miwa M, & Okada S. Platelet aggregation inhibitors in hot water extracts of green tea. *Chem. Pharm. Bull.* 38: 790-793. 1990.
50. Lands WEM & Honel AH. Phenolic anticyclooxygenase agents in antiinflammatory and analgesic therapy. *Prostaglandins* 24: 271-277. 1982.
51. Hoult JRS, Horoney MA & Payà M. Actions of flavonoids and coumarins on lipoxigenase and cyclooxygenase. *Methods Enzymol* 234: 443-454. 1994.
52. Alanko J, Riutta A, Holm P, Hapaatalo V & Ketela T. Modulation of arachidonic acid metabolism by phenols: relation to their structure and antioxidant / prooxidant properties. *Free Rad. Biol. Med.* 26: 193-201. 1999.
53. Matsuo N, Yamashita K, Shoji K, Mori M & Sugano M. Inhibitory effect of tea polyphenols on histamine and leukotriene B₄ release from rat peritoneal exudate cells. *In vitro Cell Dev. Biol.* 32: 340-344. 1996.
- 54. Gebhardt R. and Fausel M. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Artichoke* extracts and constituents in cultured rat hepatocytes. *Toxicology in vitro* 11: 669-672. 1997**
55. Serafini M, Ghiselli A, & Ferro-Luzzi A. Red wine, tea and antioxidants. *Lancet* 344: 626. 1994.
56. Maxwell S, Cruickshank A, and Thorpe G. Red wine and antioxidant activity in serum. *Lancet* 344: 193. 1994.

- 57.** Celli A, Que FG, Gores GJ and La Russo NF. Glutathione depletion is associated with decreased Bcl-2 expression and increased apoptosis in cholangiocytes. *Am. J. Physiol.* 275 (Gastrointest. Liver Physiol. 38): G 749-G 757. 1998.
58. Johnston KL, Clifford MN and Morgan L. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *Am J Clin Nutr* 78:728-33. 2003.
59. Evans RCA, Miller NJ and Pagana G. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acid. *Free Rad Biol Med* 20: 933-956. 1996.
60. Kroon PA and Williamson G. Hydroxycinnammates in plants and food : current and future perspectives. *J Sci Food Agric* 79 : 355-361. 1999.
61. Andreasen MF, Kroon PA, Williamson G, Garcia-Conesa MT. Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnammates is distributed along the intestine of mammals. *J Agric Food Chem* 49:5679–84. 2001.
62. Spencer JPE, Chowrimootoo G, Choudhury R, Debman ES, Kaila S, Srail S and Rice-Evans CA. The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Letters* 458: 224-230. 1999.
- 63.** *Kern SM, Bennett RN, Needs PW, Mellon FA, Kroon PA and Garcia-Conesa MT Metabolites of hydroxycinnammates in the Vitro model of human small intestinal epithelium caco-2 cells. J. Agric. Food Chem. 51: 7884-7891. 2003.*

64. Konishi Y, Kobayashi S. Microbial metabolites of ingested caffeic acid are absorbed by the monocarboxylic acid transporter (MCT) in intestinal Caco-2 cell monolayers. *J Agric Food Chem.* 20;52(21):6418-24. 2004
65. Cremin P, Kasim-Karakas S, and Waterhouse AL. LC/ES – MS detection of Hydroxycinnamates in human plasma. *J. Agric. Food Chem.* 49, 1747-1750. 2001.
66. Wittemer SM, Ploch M, Windek T, Muller SC, Drewelow B, Derendorf H. And Veit M. Bioavailability and pharmacokinetics of caffeoylquinic acid and flavonoids after oral administration of Artichoke leaf extracts in humans. *Phytheromedicine* 12: 28-38. 2005.
67. Nardini M, Cirillo E, Natella F and Scaccini C. Absorption of phenolic acids in Humans after coffee consumption. *J. Agric. Food Chem.* 50, 5735-5741. 2002.
68. Azuma K, Ippoushi K. Nakajama M. Ito H, Higashio H, and Terao J. Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. *J. Agric. Food Chem.* 48: 5496-5500. 2000.
69. Olthof MR, Hollman PCH, Katan MB. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr* 131:66–71. 2001.
70. Ader P, Grenacher B, Langguth P, Scharrer E, Wolfram S. Cinnamate uptake by rat small intestine: transport kinetics and transepithelial transfer. *Exp Physiol* 81:943–55. 1996.

- 71.** Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, Brighenti F. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J Nutr. Sep*; 133(9):2812-9. 2003.
72. Benzie, IFF & Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analitical Biochem.* 239: 70-76. 1996.
73. Di Venere D, Linsalata V, Calabrese N, Cardinali A, Sergio L. Biochemical characterization of new seed propagated artichoke cultivars. *Acta Hortic* 681, 517-522. 2005.
74. Sharpless KA, Arce-Osuna M, Thoma JB, Jill ML. Value assignment of retinyl palmitate, tocopherol and carotenoid concentrations in standard reference material J. AOAC inter 82: 288-296. 1999.
75. Margolis SA & Schapira R. Liquid chromatographic measurement of L-ascorbic acid e D-ascorbic acid in biological samples. *J. Chromatog.* 690: 25-33. 1997.
76. Bugianesi R, Salucci M, Leonardi C, Ferracane R, Catasta G, Azzini E, Maiani G. Effect of domestic cooking on human bioavailability of naringenin, chlorogenic acid, lycopene and beta-carotene in cherry tomatoes. *Eur J Nutr.* 2004 Dec;43(6):360-6. Epub. 2004 Apr 5.
77. Seglen PO: Preparation of isolated liver cells. *Methods Cell Biol* 13, 29-83. 1976.

78. Sedlak J and Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 25, 192-205, 1968.
79. Yagi K. A simple fluorimetric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med* 15, 212-216. 1976.
80. Lepage G, Munoz G, Champagne J, Roy CC. Preparative steps necessary for the accurate measurement of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* Sep 2;197(2):277-83. 1991.
81. Frei B, Stocker R, Ames BN. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(24):9748-52. 1988.
82. Lotito SB, Fraga CG.(+)-Catechin prevents human plasma oxidation. *Free Radic Biol Med.* Feb;24(3):435-41. 1998.
83. Peluso I, Serafini M, Campolongo P, Palmery M. Effect on rat arterial blood pressure of chemically generated peroxy radicals and protection by antioxidants. *J Nutr Biochem.*;15(6):323-7. 2004.
84. Grande S, Bogani P, de Saizieu A, Schueler G, Galli C, Visioli F. Vasomodulating potential of mediterranean wild plant extracts. *J Agric Food Chem.* Aug 11;52(16): 5021-5026. 2004.
85. Hai Liu R. Health benefits of fruits and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am. J. Clin Nutr* 78 (suppl): 517 S-520 S. 2003.

86. Caruso D, Visioli F, Patelli R, Galli C and Galli G. Urinary excretion of olive oil phenols and their metabolites in humans *Metabolism*, vol 50, No 12: 1426-1428. 2001.
- 87.** Frank J, Kamal- Eldin A, Razdan A, Lundh T, and Vessby B. The dietary Hydroxycinnamate caffeic acid and its conjugate Chlorogenic acid increase Vitamine E and cholesterol concentrations in Sprague-Dawley Rats. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2526-2531. 2003.
- 88.** Schutz K, Kammerer D, Carle R, and Schieber A. Identification and Quantification of Caffeoylquinic Acids and Flavonoids from Artichoke (*Cynara Scolymus* L.) Heads, Juice, and Pomace by HPLC-DAD-ESI/MS. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4090-4096. 2004.
89. Abu Amsa Caccetta RA, Croft KD, Puddey IB, Proudfoot JM & Beilin LJ Phenolic content of various beverages determines the extent of inhibition of human serum and low density lipoprotein oxidation in vitro: identification and mechanism of action of some cinnamic acid derivatives from red wine. *Clin Sci* 91, 449-458. 1996.
90. Maiani G, Serafini M, Salucci M, Azzini E & Ferro-Luzzi. Application of a new high- performance liquid chromatographic method for measuring selected polyphenols in human plasma. *J Chrom B Biomed Sci Appl* 692, 311-317. 1997.
91. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C & Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79, 727-747. 2004.
92. Lafay S, Gil-Izquierdo A, Manach C, Morand C, Besson C & Scalbert A Chlorogenic acid is absorbed in its intact form in the stomach of rats. *J Nutr* 136, 1192-1197. 2006.

93. Yang H, Yuan B, Li L, Chen H & Li F. HPLC determination and pharmacokinetics of chlorogenic acid in rabbit plasma after an oral dose of Flos Lonicerae extract. *J Chromatogr Sci* 42, 173-176. 2004.
94. Cremin P, Kasim-Karakas S & Waterhouse AL. LC/ES-MS detection of hydroxycinnamates in human plasma and urine. *J Agric Food Chem* 49, 1747-1750. 2001.
95. Olthof MR, Hollman PCH & Katan MB. Chlorogenic and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr* 131, 66-71. 2001.
96. Ito H, Gonthier MP, Manach C, Morand C, Mennen L, Rémésy C, Scalbert A. Polyphenol levels in human urine after intake of six different polyphenol-rich beverages. *Br J Nutr* 94, 500-509. 2005.
97. Azuma K, Ippoushi K, Nakayama M, Ito H, Higashio H & Terao J. Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rat after oral administration. *J Agric Food Chem* 48, 5496-5500. 2000.
98. Nardini M, Cirillo E, Natella F & Scaccini C. Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *J Agric Food Chem* 50, 5735-5741. 2002.
99. Booth AN, Emerson OH, Jones FT & Deeds F. Urinary metabolites of caffeic and chlorogenic acids. *J Biol Chem* 229, 51-59. 1957.
100. Rechner AR, Spencer JPE, Kuhnle G, Hahn U & Rice-Evans CA. Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo. *Free Rad Biol Med* 30, 1213-1222. 2001.

101. Rechner AR, Pannala AS & Rice-Evans CA. Caffeic acid derivatives in artichoke extract are metabolised to phenolic acids in vivo. *Free Rad Res* 35, 195-202. 2001.
102. Plumb GW, Garcia-Conesa MT, Kroon PA, Rodhes M, Ridley S & Williamson G. Metabolism of chlorogenic acid by human plasma, liver, intestine and gut microflora. *J Sci Food Agric* 79, 390-392. 1999.
103. Couteau D, McCartney AL, Gibson GR, Williamson G & Faulds CB. Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid. *J Appl Microbiol* 90, 873-881. 2001.
104. Wittemer SM, Ploch M, Windeck T, Müller SC, Drewelow B, Derendorf H & Veit M. Bioavailability and pharmacokinetics of caffeoylquinic acids and flavonoids after oral administration of artichoke leaf extracts in humans. *Phytomedicine* 12, 28-38. 2005.
105. Moridani MY, Scobie H, Jamshidzadeh A, Salehi P & O'Brien PJ. Caffeic acid, chlorogenic acid, and dihydrocaffeic acid metabolism: glutathione conjugate formation. *Drug Metab Dispos* 29, 1432-1439. 2001.
106. Moridani MY, Scobie H & O'Brien PJ. Metabolism of caffeic acid by isolated rat hepatocytes and subcellular fractions. *Toxicol Lett* 133, 141-151. 2002.
107. Chesson A, Provan GJ, Russell WR, Scobbie L, Richardson AJ & Stewart C. Hydroxycinnamic acids in the digestive tract of livestock and humans. *J Sci Food Agric* 79, 373-378. 1999.
108. Ranganathan S & Ramasarma T. The metabolism of phenolic acids in the rat. *Biochem J* 140, 517-522. 1974.

109. Nissinen E, Linden IB, Schultz E, Kaakkola S, Mannisto PT & Pohto P. Inhibition of catechol-O-methyltransferase activity by two novel disubstituted catechols in the rat. *Eur J Pharmacol* 153, 263-269. 1988.
110. Schultz E & Nissinen E. Inhibition of rat liver and duodenum soluble catechol-O-methyltransferase by a tight-binding inhibitor OR-462 *Biochem Pharmacol.* 38, 3953-3956. 1989.
111. Mannisto PT, Tuomainen P & Tuominen RK. Different in vivo properties of three new inhibitors of catechol O-methyltransferase in the rat. *Br J Pharmacol* 105, 569-574. 1992.
112. Gebhart R, Fausel M. Antioxidative and protective properties of extract from leaves of artichoke (*Cynara Scolimus L.*) against hydroperoxide-induced oxidative stress in cultured rat Hepatocytes. *Toxicol Appl Pharm.* 144:279-286. 1997.
113. Chinou I and Harvala C. Polyphenolic constituent from the leaves of two *Cynara* species growing in Greece. *Planta Med* 63, 469-470. 1997.
114. Matito C, Mastorakou F, Centelles JJ, Torres JL, and Cascante M. Antiproliferative effect of antioxidant polyphenols from grape in murine Hepa-lcl7. *Eur J Nutr* 42, 43-49. 2003.
115. Watson WH, Cai J, and Jones DP: Diet and apoptosis. *Annu Rev Nutr* 20, 485-505. 2000.
116. Kuo HC, Lee HJ, Hu CC, Shun HI, and Tseng TH. Enhancement of esculetin on taxol-induced apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 210, 55-62. 2006.

