



Università Degli Studi di Sassari

Scuola di Dottorato in

Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Coordinatore: Prof.ssa Claudia Crosio

XXVI Ciclo

Indirizzo: Proteomica, Metabolomica, Biologia Molecolare Clinica e Biochimica Clinica

Studio delle proprietà antiossidanti in frutti di origine sarda

Tutor:

Prof. Luca Deiana

Co-Tutor:

Dott.ssa Anna Maria Posadino

Tesi di dottorato:

Dott.ssa Elisabetta Canu

Anno Accademico 2012-2013

INDICE

CAPITOLO 1	INTRODUZIONE	5
1.1	Nutrizione e longevità	5
1.2	Gli antiossidanti	7
1.3	I Polifenoli	11
1.4	Stress ossidativo	14
1.5	Modello cellulare	17
CAPITOLO 2	SCOPO DEL LAVORO	20
CAPITOLO 3	MATERIALI E METODI	23
3.1	Campioni	23
3.2	Estrazione composti fenolici	24
3.3	Determinazione dei polifenoli totali	25
3.4	Determinazione dei flavonoidi totali	26
3.5	Determinazione dell'attività antiossidante	26
3.6	Cellule endoteliali umane (HUVEC)	27
3.7	Saggio di vitalità cellulare	28
3.8	Misura del danno ossidativo	29
3.9	Misura della concentrazione dei ROS intracellulari	30
3.10	Analisi statistica	31
CAPITOLO 4	RISULTATI E DISCUSSIONE	33
4.1	Analisi chimico-funzionali su campioni di susina	33
4.2	Analisi chimico-funzionali su campioni di pera	36
4.3	Analisi chimico-funzionali su campioni di mela	38
4.4	Vitalità cellulare in campioni di susine	40
4.5	Misura del danno ossidativo a breve termine	41
4.6	Misura della concentrazione intracellulare di ROS	42
CONCLUSIONI		44
BIBLIOGRAFIA		47

CAPITOLO 1

Dott.ssa Elisabetta Canu

“Studio delle proprietà Antiossidanti in frutti di origine sarda”

Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche – Università degli Studi di Sassari

INTRODUZIONE

Il lavoro presentato in questa tesi è parte integrante di un progetto finanziato dalla Regione Autonoma della Sardegna L.R. 7/2007 dal titolo *“La biodiversità degli alimenti autoctoni della Sardegna nella longevità: Ricerca Proteomica, Metabolomica e di Biologia Molecolare sui campioni biologici dei centenari sardi e sui campioni della dieta”* (acronimo *B.AI.AKeA, P. I. Prof.Luca Deiana*). Il progetto è stato sviluppato con la partecipazione dei ricercatori del CNR di Sassari, delle Facoltà di Medicina e Chirurgia, Agraria e Veterinaria dell’Università di Sassari. e di AGRIS Sardegna.

1.1 Nutrizione e longevità

La longevità è attualmente oggetto di numerosi studi in tutti i paesi occidentali e negli ultimi tempi in Giappone, Russia, Cina, etc.: i dati demografici mettono in evidenza un progressivo invecchiamento della popolazione mondiale e l’aumento dell’età media dovuta al costante miglioramento delle condizioni socio-sanitarie. Il fenomeno dell’invecchiamento è il risultato dell’interazione di numerosi fattori tra i quali ricordiamo i fattori genetici, socio-economici, ambientali e nutritivi etc.

Diversi studi, hanno dimostrato che in Sardegna la prevalenza di centenari è superiore rispetto agli altri Paesi europei (16,6 centenari ogni 100.000 abitanti rispetto ai 10 centenari ogni 100.000 abitanti degli altri) (20, 13). L’Isola è una delle ‘poche **Zone Blu del mondo**’, termine usato dagli studiosi per delineare le aree dove c’è una maggiore presenza di centenari (62); per la sua posizione geografica, nel cuore del Mediterraneo, la Sardegna è anche caratterizzata dalla presenza di diverse produzioni agroalimentari

tipiche realizzate in un ambiente, dove l'equilibrata gestione della biodiversità vegetale e animale porta alla produzione di alimenti tipici, e di qualità

I centenari sardi si sono sempre nutriti con i prodotti locali provenienti dagli allevamenti e dalle colture praticate nel territorio nel quale loro hanno vissuto e vivono. In Sardegna, l'elevata biodiversità orto-frutticola, ben distinta caratterialmente da quella di altre regioni, potrebbe costituire una delle cause degli effetti salutistici associati alla dieta e alla longevità riscontrata nella popolazione locale. Infatti, i vegetali rappresentano la più importante fonte di sostanze antiossidanti, composti in grado di rallentare o contrastare la diffusione e la propagazione di reazioni ossidoriduttive responsabili, tra gli altri, dell'invecchiamento delle cellule e pericolose per l'organismo.

1.2 Gli antiossidanti

Diversi studi epidemiologici hanno indicato che il consumo frequente di antiossidanti naturali, essenzialmente introdotti nella dieta tramite frutta e vegetali, è associato ad un basso rischio di contrarre malattie cardiovascolari e cancro (1).

Gli antiossidanti sono definiti come “qualsiasi sostanza che, presente in bassa concentrazione rispetto ad un substrato ossidabile, è in grado di rallentare o inibire l'ossidazione di quel substrato” (26). Sono un gruppo di composti, caratterizzati dalla capacità di ossidarsi più facilmente rispetto ad altre specie presenti nella cellula: prevengono o rallentano, quindi, il fenomeno dell'ossidazione (3). Oggi le sostanze antiossidanti sono considerate indispensabili per il corretto funzionamento dell'organismo e vengono utilizzate anche come integratori alimentari per la loro azione protettiva nei confronti di tumori e patologie cardiovascolari (49).

Gli antiossidanti hanno la funzione di combattere lo stress ossidativo attraverso una serie di sistemi, enzimatici e non enzimatici che limitano il potenziale danno causato dai ROS.(4)

Oltre che contrastare i radicali liberi, gli antiossidanti svolgono numerose attività biologiche come la protezione dei capillari sanguigni, l'azione antinfiammatoria, antibatterica, immuno-stimolante, antiallergica, antivirale, estrogenica ed anticancerogena (1).

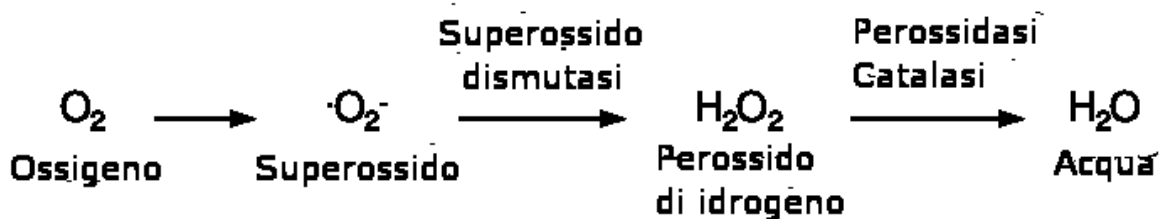
E' stata inoltre dimostrata la loro azione inibente nei confronti di alcuni enzimi, quali la fosfolipasi A₂, la cicloossigenasi, la glutazione riduttasi e la xantina ossidasi (36).

I polifenoli sembrano possedere anche attività antivirale nei confronti dell'HIV, dell'Herpes simplex e di vari virus influenzali e del Rhinovirus (36).

Gli antiossidanti vengono classificati in base alla loro provenienza e alle loro caratteristiche strutturali in:

- ENDOGENI (sintetizzati autonomamente)
- ESOGENI (presenti negli alimenti)

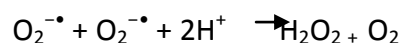
Nella prima categoria rientrano sistemi enzimatici quali la superossido dismutasi (SOD), catalasi e glutazione perossidasi (44): SOD accelera la conversione di superossido a perossido di idrogeno, mentre catalasi e glutazione perossidasi convertono il perossido di idrogeno in acqua (4). Questi enzimi, collaborando tra loro, riducono l'anione superossido ad acqua e ossigeno limitando in tal modo la concentrazione di ROS all'interno della cellula.(5)



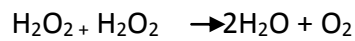
La SOD esiste in 3 forme:

- a) Cu / Zn SOD presente principalmente in matrice citosolico,
- b) MnSOD localizzata preferenzialmente nei mitocondri,
- c) SOD extracellulare.

Le SOD catalizzano la reazione:

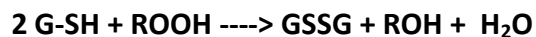


La catalasi funziona in modo molto simile, perché il perossido di idrogeno può essere un riducente debole e ossidante abbastanza forte. La catalasi catalizza la reazione:



Questo enzima è presente nel perossisoma delle cellule aerobiche ed è molto efficace nel promuovere la conversione del perossido di idrogeno in acqua e ossigeno molecolare .(5)

La glutazione perossidasi (GSH) è presente in elevate concentrazioni all'interno delle cellule e catalizza la conversione di perossido di idrogeno o perossido organico in acqua. E' il principale detossificatore di H_2O_2 della cellula. Compete anche con la catalasi per il perossido di idrogeno come substrato ed è la principale fonte di protezione contro bassi livelli di stress ossidativo.(5)



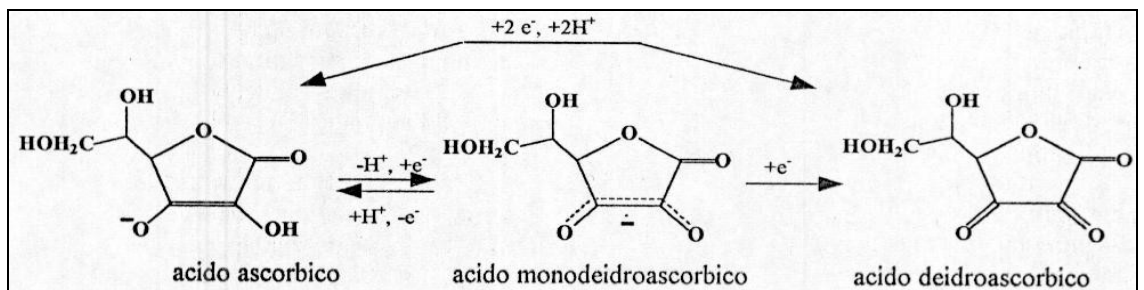
Il glutazione ridotto cede molto volentieri il suo idrogeno (H^+), che funge da accettore di un elettrone (e^-) proveniente da molecole reattive dell'ossigeno (radicali liberi). A questo punto, il glutazione ossidato, per riacquistare la propria attività antiossidante, deve tornare nella forma ridotta; ciò avviene grazie ad un enzima NADPH dipendente, chiamato glutazione reduttasi(44).

Questa capacità di rigenerarsi continuamente ha contribuito a considerare il glutazione come il più potente antiossidante presente nell'organismo umano.

Nella seconda categoria rientrano i sistemi non enzimatici come le vitamine ed i composti non vitaminici come i polifenoli e carotenoidi.

Tra gli antiossidanti vitaminici i più importanti vi sono la vitamina C e la vitamina E, che svolgono fondamentalmente la stessa funzione: la prima in ambiente acquoso, la seconda in ambiente lipofilo.

A pH fisiologico l'acido ascorbico si trova sotto forma di anione; svolge la sua azione antiossidante attraverso diversi meccanismi: è coinvolto nella riduzione di metalli, come ferro e rame; rigenera la vitamina E, riportandola nella sua forma attiva; blocca i radicali liberi, convertendosi in un anione radicale, stabilizzato per risonanza (28).

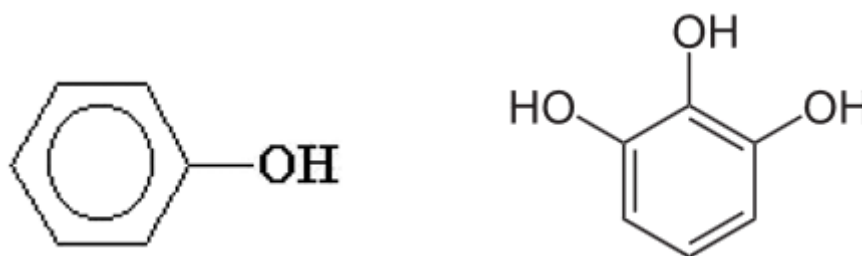


Tra gli antiossidanti esogeni non vitaminici i principali sono i carotenoidi e i polifenoli.

I carotenoidi sono un ampio gruppo di pigmenti rossi, arancio e gialli presenti negli alimenti soprattutto nella frutta e nei vegetali. Sono sostanze liposolubili presenti nelle membrane cellulari e sono veicolati dalle lipoproteine. Hanno un'elevata capacità antiossidante, dovuta all'abilità della struttura a doppi legami coniugati nel delocalizzare elettroni spaiati. Bloccano i radicali tra cui anche l'[•]O₂ tramite due meccanismi: trasferimento del e⁻ ed addizione del radicale alla molecola.

1.3 I polifenoli

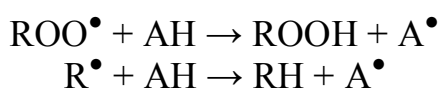
I polifenoli sono i più abbondanti antiossidanti nella nostra dieta e sono presenti in frutta, vegetali, cereali, olive, legumi secchi, cioccolato e bevande, come tè, caffè e vino (43). Malgrado la loro ampia distribuzione, gli studi sugli effetti dei polifenoli sono cominciati solamente negli ultimi anni. La classica struttura polifenolica è caratterizzata da diversi gruppi ossidrilici su anelli aromatici, ma possono essere considerati polifenoli anche molecole con un solo anello fenolico, come acidi ed alcoli fenolici (11).



I polifenoli naturali sono divisi in diverse classi a seconda del numero di anelli fenolici che contengono ed agli elementi strutturali che legano ciascun anello con un altro.

L'azione antiossidante dei polifenoli è del tipo *chain - breaking*: reagiscono con i radicali cedendo loro un radicale idrogeno, formando così radicali più stabili.

Il radicale che si forma, infatti, è molto meno reattivo di R^\bullet , a causa della delocalizzazione dell'elettrone spaiato sull'anello aromatico e partecipa molto più lentamente alle reazioni radicaliche.



I radicali liberi possono portare al danno ossidativo, attraverso una serie di reazioni radicaliche a catena. È evidente dunque che sostanze in grado di bloccare il radicale R• come i polifenoli portano ad un rallentamento o all'arresto di tali reazioni (17).

I polifenoli si distinguono in diverse classi in funzione del numero degli anelli fenolici e degli elementi strutturali che legano tali anelli:

1) fenoli semplici: sono molecole con un solo anello benzenico e contenenti, come sostituenti, solo gruppi ossidrilici (es. fenolo e idrochinone). Si trovano principalmente negli oli essenziali ricavati dalle piante;

2) aldeidi fenoliche: contengono sia il gruppo fenolico che il gruppo aldeidico (es. aldeide p-idrossibenzoica ed aldeide vanillica);

3) acidi fenolici: sono molto diffusi in natura e rappresentano una classe molto studiata. Sono costituenti della lignina e dei tessuti delle piante e, se legati a zuccheri, antocianine o altri fenoli, hanno un'importante funzione nella struttura dei tannini. Le uve ed i vini sono ricchi di un particolare gruppo di acidi fenolici rappresentato dagli acidi cinnamici;

4) fenil-ammine: sono una famiglia relativamente piccola ma molto importante che, per la coesistenza nella propria struttura chimica di un gruppo debolmente acido (l'ossidrile) e di uno molto basico, hanno natura anfotera. Fanno parte di questo gruppo l'adrenalina, la tirosina e la fenilalanina;

5) fenoli composti: in queste molecole, l'anello fenolico è legato ad un altro anello benzenico o ad altri composti eterociclici aventi gruppi funzionali ossidrilici, lattonici e chetonici (es. cumarine e xantoni);

6) flavonoidi: sono sostanze la cui struttura chimica è composta da due anelli benzenici collegati mediante una catena a tre atomi di carbonio costituente un anello eterociclico ossigenato. Le varie classi di flavonoidi differiscono tra loro per la natura di tale anello centrale, la cui struttura varia soprattutto nello stato di ossidazione (i flavonoidi più ossidati sono i flavoni mentre i più ridotti sono le catechine). A questo grande gruppo appartengono molecole molto importanti: le catechine, i calconi, i flavanoni, i flavoni, i flavanonoli, i flavanoli, le leucoantocianidine e le antocianidine;

7) tannini: non sono un'ulteriore famiglia di composti fenolici, ma una combinazione di vari tipi di queste sostanze. Ancor oggi una classificazione rigorosa di tale raggruppamento è difficile, pertanto essi sono distinti essenzialmente in idrolizzabili e condensati.

I polifenoli possono quindi proteggere i costituenti cellulari dal danno ossidativo e, di conseguenza, dal rischio di varie malattie degenerative associate a stress ossidativo(17). Studi sperimentali, infatti, supportano fortemente un ruolo dei polifenoli nella prevenzione di malattie cardiovascolari, cancro, osteoporosi, diabete mellito e malattie neurodegenerative (14). In particolare, è stato dimostrato che il consumo di polifenoli limita lo sviluppo di lesioni ateromatose, inibendo l'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità (15), che è considerato un meccanismo chiave nelle lesioni endoteliali che si verificano in aterosclerosi. Molti studi clinici controllati hanno dimostrato che un aumento dei consumi degli antiossidanti ha un'azione protettiva contro le malattie cardiovascolari.

1.4 Lo stress ossidativo

La maggior parte delle patologie e l'invecchiamento degli esseri viventi sono causati da processi chimici ossidativi, dovuti ad una eccessiva produzione di radicali liberi (19). La presenza dei radicali liberi in organismi viventi ha conseguenze negative, come il danneggiamento diretto o indiretto del DNA cellulare e la modificazione strutturale delle proteine. Quando le cellule utilizzano l'ossigeno per produrre energia, i radicali liberi vengono prodotti in conseguenza alla produzione di ATP da parte dei mitocondri (28).

Questi sottoprodotti sono generalmente specie reattive dell'ossigeno (ROS) e specie reattive dell'azoto (RNS) che risultano dal processo redox cellulare (23).

In condizioni normali il potenziale tossico dei radicali liberi è neutralizzato da un complesso sistema di fattori antiossidanti che rappresenta il meccanismo fisiologico di difesa: il rapporto tra fattori ossidanti e difese antiossidanti rappresenta il cosiddetto "bilancio ossidativo". I radicali liberi ad alte concentrazioni, generano stress ossidativo, un processo deleterio che può danneggiare tutte le strutture cellulari (12), a bassi o moderati livelli, ROS e RNS esercitano effetti benefici sulla risposta cellulare e sulla funzione immunitaria.

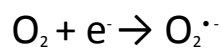
Lo stress ossidativo è pertanto l'espressione biologica di un danno che si verifica quando, i fattori pro-ossidanti (farmaci, sostanze tossiche, radiazioni, stati infiammatori, attività fisica esacerbata, etc.) superano le difese antiossidanti endogene (enzimi come la SOD, la catalasi, la perossidasi, etc.) ed esogene (antiossidanti presenti negli alimenti) (33).

Si può incorrere in stress ossidativo sia in condizioni normali di salute sia negli stati patologici.

Gli antiossidanti endogeni ed esogeni agiscono come "antiradicali liberi": prevengono e riparano i danni causati dai ROS e RNS, aiutano a migliorare le difese immunitarie e a ridurre il rischio di cancro e malattie degenerative (35).

Le specie reattive dell'ossigeno sono suddivisibili in due categorie principali: i radicali liberi, come il superossido ($O_2^{\bullet-}$) e il radicale ossidrilico (OH^{\bullet}), e molecole non radicali, come il perossido d'idrogeno (H_2O_2) [3].

Anione superossido $O_2^{\bullet -}$: Viene considerato il ROS “primario”, da cui, mediante reazioni con altre molecole, si possono generare i ROS “secondari” Pur essendo un radicale libero, caratterizzato quindi dalla presenza di un elettrone spaiato sull’orbitale elettronico esterno, la molecola non possiede un’elevata reattività in quanto non è in grado di attraversare la membrana mitocondriale, perché bloccato dalla carica negativa. La sua formazione avviene spontaneamente soprattutto nell’ambiente ricco di ossigeno in prossimità della membrana interna del mitocondrio [4]. Due molecole di anione superossido reagiscono rapidamente a dare perossido di idrogeno e ossigeno molecolare in una reazione anche catalizzata dalla superossido dismutasi (44).



Perossido di idrogeno H_2O_2 : Tipico esempio di specie reattiva dell’ossigeno non presente in forma radicalica, pur non essendo particolarmente reattiva, riveste un ruolo importante per la sua capacità di penetrare velocemente attraverso le membrane biologiche e critico come intermedio di reazione nella sintesi di ROS altamente reattivi, soprattutto il radicale idrossilico (22). La sua rimozione è a carico di almeno tre sistemi enzimatici: la catalasi, le glutatione perossidasi e le perossiredossine.

Radicale ossidrilico OH^{\bullet} : La sua estrema reattività verso le biomolecole e la mancanza di meccanismi di inattivazione endogena lo rendono la specie reattiva dell’ossigeno in grado di generare i maggiori danni nelle macromolecole cellulari: proteine, acidi nucleici, glicosaminoglicani e soprattutto gli acidi grassi poliinsaturi dei fosfolipidi di membrana. Quando si forma esso reagisce istantaneamente provocando dei danni rilevanti ad

importanti molecole biologiche, come proteine, lipidi e DNA (20). Nelle proteine, ad esempio, l'ossidazione di residui cisteinici può portare alla formazione di legami disolfuro che provocano un'alterazione nella struttura terziaria della proteina con la conseguente inibizione della sua funzione biologica. Il radicale ossidrilico, in particolare, può reagire facilmente con tutti i componenti della molecola del DNA danneggiando le basi azotate sia purine che pirimidone e la struttura del deossiribosio(24).

1.5 Modello cellulare

Il modello cellulare utilizzato è stato quello delle cellule endoteliali umane estratte dal cordone ombelicale (HUVEC).

L'endotelio vascolare svolge un ruolo importante nella regolazione del tono vascolare, della pressione sanguigna, della coagulazione, della reattività immunologica e del trasporto dei lipidi. Inoltre svolge un ruolo vitale nella regolazione del passaggio dei fluidi, soluti e cellule dal sangue ai tessuti (46).

L'alterazione della permeabilità vascolare contribuisce a varie patogenesi e porta a diverse malattie come aterosclerosi e danno infiammatorio. La progressione di queste malattie è associata alla presenza di ROS, che, se presenti ad alte concentrazioni, portano all'attivazione di eventi che condurrebbero alla morte cellulare. I ROS svolgono un ruolo chiave anche nell'innesco e nella progressione dell'angiogenesi e delle metastasi e la loro azione potrebbe non essere limitata ad attività mutagenica.

Il ruolo assegnato ai ROS in realtà non è soltanto negativo; recenti studi hanno infatti rivelato che tali molecole influenzano positivamente la funzionalità endoteliale. I ROS sono stati infatti riconosciuti come messaggeri coinvolti nella trasduzione del segnale

intracellulare e implicati nella regolazione di diversi eventi, come attivazione di fattori della trascrizione, espressione genica, proliferazione cellulare. L'apparente paradosso del ruolo dei ROS come biomolecole essenziali per la regolazione da una parte della sopravvivenza e della crescita e dall'altra della morte cellulare, è in gran parte legato alla concentrazione di tali biomolecole prodotte all'interno della cellula (41).

Alla luce di tutto questo, interventi finalizzati a modificare la concentrazione dei ROS intracellulari, quali l'aggiunta di antiossidanti naturali, potrebbero creare conseguenze sia dannose che vantaggiose alla cellula, alterando o meno la funzionalità dell'endotelio vascolare.

Il modello cellulare utilizzato quindi si adatta molto bene alla linea di ricerca portata avanti.

CAPITOLO 2

SCOPO DEL LAVORO

Negli ultimi anni in Sardegna si è sviluppata un'approfondita ricerca sulla longevità.(18, 19) Il progetto B.AI.AKeA (L.R.7/2007) *“La biodiversità degli alimenti autoctoni della Sardegna nella longevità: Ricerca Proteomica, Metabolomica e di Biologia Molecolare sui campioni biologici dei centenari sardi e sui campioni della dieta”* nasce con l'obiettivo di studiare i prodotti alimentari comunemente usati nella dieta dei centenari sardi. Dagli studi condotti sulle cartelle cliniche dei centenari reclutati all'interno del progetto (364 cartelle cliniche analizzate: 149 uomini e 215 donne), gli alimenti maggiormente consumati dai longevi risultano essere: latte e derivati, vino, frutta e verdura. Le cartelle cliniche oggetto di questo studio provengono dal progetto AKeA. I campioni degli alimenti oggetto di studio del progetto B.AI.AKeA sono stati raccolti all'interno di tutto il territorio sardo. Il progetto è stato sviluppato con la partecipazione dei ricercatori del CNR di Sassari, delle Facoltà di Medicina e Chirurgia, Agraria e Veterinaria di Sassari e di AGRIS Sardegna.

A tale scopo sono state studiate le principali classi chimiche con proprietà funzionali presenti nella frutta (polifenoli, flavonoidi) ed è stata determinata la capacità antiossidante di varietà di pere, mele e susine autoctone diffuse nei territori dove sono presenti centenari, e i risultati confrontati con varietà nazionali ed internazionali al fine di valutare eventuali differenze.

I campioni presi in esame sono stati: sei varietà di prugne autoctone, (due cultivar rosse: *'Sanguigna di Bosa II'* e *'Sighera'*; una gialla *'Limoninca'* e tre con la solo buccia parzialmente pigmentata *'Meloni'*, *'Fradis'*, *'Di Bonarcado'*), una gialla internazionale

coltivata in Sardegna (*Shiro*) e due varietà reperite in commercio provenienti dal Sud Africa, '*Rossa Letizia*' (rossa) e '*Southern Belle*' (nera).

Per quanto riguarda i campioni di mele, sono stati analizzati: cinque varietà di mele autoctone ('*Nuchis*', '*Appio rosseggiante*', '*Mela rosa*', '*Sant'Andrea*', '*Nuchis A*') e due varietà internazionali di confronto presenti sul mercato ('*Red*' e '*Golden delicious*'). I campioni di pera esaminati sono: otto varietà di pere autoctone ('*Crachera*', '*Pera Mela*', '*Ildè Noa*', '*Oliena*', '*Bonarcado*', '*De Puleu*', '*Natalina*', '*Mamoi*') ed una varietà di confronto presente sul mercato molto diffusa in commercio che è la pera '*Coscia*'.

Alla luce di questo, lo scopo della ricerca è stato quello di valutare i principali gruppi chimici con proprietà funzionali presenti nella frutta di origine sarda e confrontarli con le varietà nazionali ed internazionali al fine di valutarne eventuali differenze.

In aggiunta è stato fatto uno studio preliminare, su un modello cellulare di endotelio umano, per capire l'impatto di alcuni estratti (quelli di susine) sullo stato redox e sulla vitalità cellulare.

CAPITOLO 3

Dott.ssa Elisabetta Canu

“Studio delle proprietà Antiossidanti in frutti di origine sarda”

Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche – Università degli Studi di Sassari

MATERIALI E METODI

3.1 Campioni

Tutti i campioni di frutta di origine autoctona e quelli di origine internazionale coltivati in Sardegna provengono dalla collezione del germoplasma autoctono della Sardegna di proprietà del CNR ISPA - ISTITUTO DI SCIENZE DELLE PRODUZIONI ALIMENTARI (sezione di SASSARI). Le accessioni autoctone di frutta, studiate nell'ambito del progetto, sono state scelte tenendo conto della diffusione e dell'importanza che rivestivano in passato nell'alimentazione.

Tutte le qualità sotto esame erano diffuse nelle aree geografiche ove è stata riscontrata una elevata incidenza di ultra-centenari e sono il risultato di una millenaria co-evoluzione e selezione da parte della popolazione locale. La frutta in esame veniva consumata quotidianamente durante il periodo di maturazione rappresentando una parte importante nella dieta. Inoltre, la conservazione in ambiente fresco (cantina, scantinati, soffitta etc.) di alcuni frutti con maturazione tardiva (fine settembre-inizio novembre), ne consentiva il consumo fino alla primavera successiva.

La particolarità che rende differenti le cultivar da frutto attualmente commercializzate (per esempio: 'Coscia', etc.) da quelle autoctone è la netta superiorità delle proprietà funzionali e nutrizionali (elevata attività antiossidante, proprietà antisettiche, elevato contenuto in polifenoli totali etc.) di queste ultime.

Tutti i frutti di origine autoctona sono stati raccolti *in situ*. La raccolta è avvenuta quando i frutti avevano raggiunto la maturazione di consumo o per alcune pere quando avevano raggiunto la maturazione fisiologica (dimensioni, colore, forma tipica dell'accessione).

Ciascun campione raccolto è stato suddiviso in 3 repliche omogenee tenendo conto della posizione nell'albero, dimensione, grado di maturazione e albero da cui erano stati prelevati i singoli frutti. In tale modo si è garantito che ogni replica rappresentasse effettivamente un campione omogeneo dell'accessione. I frutti sono stati pesati, snocciolati, tagliati e immediatamente congelati in azoto liquido e liofilizzati.

3.2 Estrazione dei composti fenolici

La frutta è stata snocciolata, congelata con azoto liquido e subito liofilizzata. Alla fine del processo di disidratazione (48 ore) il campione (100 g peso fresco) è stato pesato e quindi omogeneizzato (3 min) in un mini-blender fino ad ottenere una polvere sottile.

L'estrazione di 1 g di omogeneizzato è stata effettuata con la miscela (acqua/acetone - 30:70, v/v); tutte le fasi dell'estrazione sono state effettuate a 4°C. L'estrazione è stata ripetuta 3 volte per 5 min in un estrattore a sfere di vetro (IKA, Ultra Turrax Tube Drive, Germany) utilizzando ogni volta 5 ml della miscela. Dopo ogni estrazione il pellet (campione) è stato recuperato tramite centrifugazione per 15 min a 6000 rpm mentre i rispettivi surnatanti sono stati recuperati ottenendo alla fine circa 14 ml di estratto.

L'acetone presente nell'estratto è stato allontanato con il roto-vapor con il bagno termostato a 45°C. L'estratto acquoso rimasto dopo l'allontanamento dell'acetone è stato pesato, congelato in azoto liquido e infine liofilizzato. Dopo 48 ore il campione deidratato è stato nuovamente pesato, recuperato in vial di vetro da 5 mL e immediatamente conservato a -80°C.

3.3 Determinazione dei polifenoli totali

La determinazione dei polifenoli totali è stata fatta usando il metodo colorimetrico di Folin Ciocalteau. Questo metodo si basa sull'ossidazione chimica dei composti fenolici da parte di una miscela ossidante, chiamata reattivo di Folin, costituita da acido fosfotungstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) che, riducendosi, forma una miscela di ossidi (W_8O_{23} e Mo_8O_{23}) colorata di azzurro. L'analisi è condotta mediante determinazione spettrofotometrica (62).

Un'aliquota della soluzione acetonica è stata portata a secco su rotovapor (rotovapor RE 121; Buchi, CH-9230 Flawil, Switzerland) e il residuo acquoso quantitativamente trasferito su cartucce SPE di fase solida (C18), al fine di separare i composti fenolici dagli altri antiossidanti, in particolare dall'acido ascorbico e da altri composti polari che possono interferire con il saggio (zuccheri, aminoacidi, acidi organici, etc.).

L'assorbanza dei composti blu formati in seguito alla reazione è stata misurata a 740 nm e i risultati espressi come acido gallico equivalenti GAE (mg/100 g) di peso fresco (PF), tramite una curva di calibrazione di acido gallico ($R^2=0.998$).

3.4 Determinazione dei flavonoidi totali

I flavonoidi totali sono stati determinati per via colorimetrica allo spettrofotometro. Un millilitro di soluzione acetonica è stata posta in un matraccio da 10 ml contenente 4 ml di H₂O m_Q.

Il bianco è stato ottenuto sostituendo l'acqua al campione. Dopo 5 minuti sono stati aggiunti 3 ml di NaNO₂ al 5% e a 6 min 2 ml di NaOH 1 M e portato a volume con H₂O m_Q.

E' stata letta l'assorbanza delle soluzioni a 510 nm contro il bianco.

E' stata quindi utilizzata una curva di calibrazione di catechina (2.5-20 µg/ml) per quantificare i flavonoidi totali (R²=0.999) nelle susine ed i risultati sono stati espressi come mg di catechina equivalenti (CE)/100 g PF.

3.5 Determinazione dell'attività antiossidante

L'attività antiossidante è stata misurata usando due diversi metodi spettrofotometrici: saggio dell'ABTS e saggio del DPPH come descritto da Surveswaran (61). Per ciascun saggio sono stati utilizzati 100 µl di soluzione acetonica ed i risultati espressi sulla base di curve di calibrazione costruite usando come standard il Trolox, come unità di TEAC (mmol di Trolox equivalenti per 100 g PF).

3.6 Cellule endoteliali umane

Le cellule endoteliali umane (HUVEC) utilizzate per i nostri esperimenti sono state isolate da funicoli forniti dalla clinica ginecologica di Sassari. Il cordone ombelicale, ottenuto subito dopo il parto, è stato riposto in una soluzione bilanciata di Sali di Hanks (BSS) (Sigma) contenente 2,8 g/l di CaCl_2 , 8 g/l di KCl, 1,2 g/l di KH_2PO_4 , 4 g/l di $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 160 g/l di NaCl, 3,04 g/l di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 mM HEPES free acid, 20 g/l di Glucosio, Phenol red/ NaHCO_3 (0,01%/40mM), penicillina 500U/ml, streptomicina 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ed anfotericina 5%.

In questa soluzione il funicolo può essere conservato fino al momento dell'estrazione cellulare, per un periodo massimo di 48h.

L'estrazione delle cellule è stata fatta sotto cappa sterile a flusso laminare, eseguita secondo il metodo descritto da Jaffe (42). La vena del cordone ombelicale è stata incannulata ad entrambe le estremità per rendere possibile 2 lavaggi con PBS (Phosphate Buffered Saline, 120 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 8,5 mM NaH_2PO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4 , pH 7,3); successivamente è stata iniettata la collagenasi tipo II da *Clostridium histolyticum* (Sigma) allo 0,2%, solubilizzata in Medium M199 con aggiunta di antibiotici (penicillina 10.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, streptomicina 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, anfotericina 0,85%) per il trattamento dissociativo della durata di 10 minuti a 37°C. Allo scadere del tempo la vena ombelicale ha subito un ulteriore lavaggio con PBS così da raccogliere le cellule dissociate in un tubo di polipropilene da 50 ml (Falcon) e centrifugarle per 10 minuti a 1400 rpm. Il pellet di cellule ottenuto, privato del surnatante, è stato risospeso in terreno di coltura per HUVEC (Medium 199 con aggiunta di penicillina 100U/ml, streptomicina 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anfotericina 0,85% e glutamina 2mM, FCS 10% (Foetal Calf Serum) e NBCS 10% (New Born Calf Serum).

Le cellule sono state messe in cultura in fiasche da 25 cm² (Falcon) pre-trattate con una sostanza (Hemagel) che favorisce l'adesione cellulare alla fiasca, e poste in incubatore a 37°C, con umidità al 90% e CO₂ al 5% fino al raggiungimento della confluenza nei successivi 3-5 giorni. La caratteristica forma a ciottolo e la presenza del fattore di von Willebrand (fattore VIII) è prova dell'appartenenza alle cellule endoteliali della coltura cellulare in uso.

Le HUVEC utilizzate per gli esperimenti sono state isolate da cordoni differenti e sono state usate al 90-100% di apparente confluenza.

3.7 Saggio di vitalità cellulare

La valutazione della vitalità cellulare delle cellule HUVEC è stata fatta utilizzando due fluorofori intercalanti del DNA: ioduro di propidio (PI), Hoechst 33342.

PI può entrare solo all'interno delle cellule con la membrana non integra e colora di conseguenza le cellule non vitali perciò viene di solito usato per identificare cellule morte. I coloranti fluorescenti nel blu della serie Hoechst sono, invece, coloranti per il DNA permeabili a tutte le cellule. Tutti i nuclei delle cellule potrebbero essere riconosciuti dalla fluorescenza blu di Hoechst, mentre i nuclei delle cellule danneggiate dalla fluorescenza rosso del PI accumulato. Dopo il trattamento, le cellule sono state colorate con PI e Hoechst, lavate con PBS, e la fluorescenza è stata misurata utilizzando il GENIOS plus lettore di micropiastre (Tecan). Le lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione utilizzate per la quantificazione della fluorescenza sono, rispettivamente, 340 e 485 nm per la Hoechst e 485 e 612 nm per PI. I risultati sono stati espressi come percentuale di cellule di controllo non trattate.

3.8 Misure del danno ossidativo

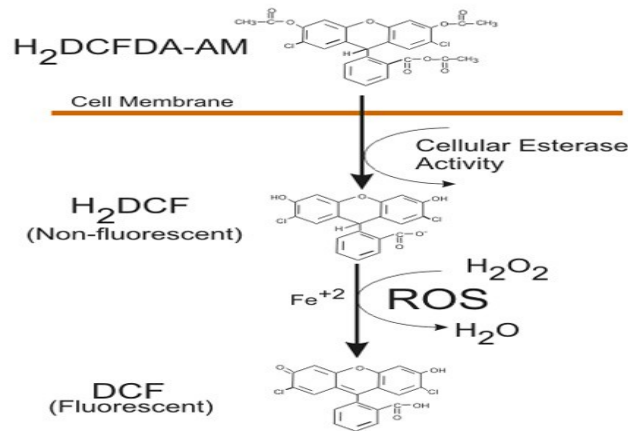
La morte cellulare è stata valutata usando due tipi di coloranti fluorescenti: lo ioduro di propidio (PI) e l'Hoechst 33342. Questi tipi di coloranti sono in grado di discriminare le cellule con le membrane cellulari intatte da quelle con le membrane danneggiate. Con la perdita dell'integrità della membrana cellulare, il PI entra all'interno della cellula e si lega al DNA.

Le HUVEC sono state poste in fiasche da 25 cm², una volta raggiunta la confluenza trasferite in multipiastre da 48 pozzetti alla concentrazione di 150.000 cell/ml e stimolate con gli estratti di prugna per 24h a diverse concentrazioni (30 µg/ml, 90 µg/ml, 120 µg/ml); il danno ossidativo è stato indotto con H₂O₂ (100µM) per la durata di 2 ore: dopo le cellule sono state colorate con il PI, 10 µg/ml e Hoechst 33258 10 µg/ml (Invitrogen, Carlsbad, CA). Dopo un periodo di incubazione di 30 minuti, la sonda è stata rimossa e sono stati fatti due lavaggi in PBS 1X. La fluorescenza è stata letta utilizzando un GENIOS plus lettore di micropiastre (Tecan) con un filtro di eccitazione di 365 nm e uno di emissione di 410 nm. Per ogni pozzetto sono state fatte tre letture consecutive della fluorescenza ad una distanza di un minuto l'una dall'altra. I risultati sono stati espressi come rapporto della fluorescenza fra il campione trattato e il controllo non trattato.

3.9 Misura della concentrazione dei ROS intracellulari

La determinazione quantitativa dei ROS intracellulari è stata fatta utilizzando la sonda molecolare specifica per i ROS, H₂DCF-DA (2',7'-diclorodidrossifluoresceina diacetato) (Molecular Probe, Eugene): la sonda una volta dentro la cellula viene diesterificata ad

H₂DCF ed ossidata dai ROS in un composto fluorescente DCF. Tanto maggiore sarà la fluorescenza tanto maggiore sarà la quantità dei ROS prodotti dalla cellula.



Le cellule una volta raggiunta la confluenza sono state messe in una piastra da 48 pozzetti ad una concentrazione di 150.000 cellule/ml. Sono state trattate per 24h con gli estratti della frutta e valutata l'attività antiossidante dopo il trattamento con H₂O₂ (100 μM) per 2 h. Prima dei trattamenti, è stato sostituito il medium di coltura con PBS plus (PBS 1X con aggiunta di CaCl₂ 0,5 mM, MgCl₂ 1 mM, C₆H₁₂O₆ 30 mM) contenente H₂DCF-DA 1 μM: dopo un periodo di incubazione di 30 minuti, la sonda è stata rimossa e sono stati fatti due lavaggi in PBS 1X.

Il lettore di piastra per fluorescenza GENios plus (Tecan) ha permesso di misurare la fluorescenza utilizzando una lunghezza d'onda pari a 485nm per l'eccitazione e 535 nm per l'emissione.

Per ogni pozzetto sono state fatte tre letture consecutive della fluorescenza ad una distanza di un minuto l'una dall'altra. I risultati sono stati espressi come rapporto della fluorescenza fra il campione trattato e il controllo non trattato.

3.10 Analisi statistica

I dati ottenuti dai saggi biologici sono stati elaborati da una analisi della varianza (ANOVA) con il software GraphPad Prism 5, seguita da un test di comparazione multipla post-hoc Newman-Keuls per determinare le differenze tra valori medi dei diversi trattamenti, con una significatività $p < 0.05$ (Prism 5.0; GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA).

CAPITOLO 4

Dott.ssa Elisabetta Canu

“Studio delle proprietà Antiossidanti in frutti di origine sarda”

Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche – Università degli Studi di Sassari

RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Analisi chimico-funzionali su campioni di susina

Il contenuto di polifenoli totali varia da un minimo di 242,5 mg GAE/100 g nella cultivar 'Di Bonarcado' ad un massimo di 905,7 mg GAE/100 g nella cultivar 'Fradis'. Per quanto riguarda i flavonoidi totali, sempre la cultivar 'Fradis', seguita da 'Meloni' e 'Shiro', risultano le accessioni a maggior contenuto, mentre le varietà commerciali provenienti dal Sud Africa hanno contenuti decisamente più bassi.

'Fradis' e 'Meloni' si differenziano da tutte le altre accessioni anche per la capacità antiossidante, estremamente elevata. In particolare 'Fradis' ha mostrato capacità antiossidante quattro volte superiore rispetto alla 'Shiro', nonostante il contenuto di polifenoli superi solo una volta e mezza quello della cultivar internazionale. Nel confronto con la 'Shiro' anche altre varietà autoctone possiedono elevato potere antiossidante: la 'Meloni', che ha valori comparabili in flavonoidi e polifenoli totali, mostra una capacità antiossidante tre volte superiore, la 'Limoninca' ha il doppio della capacità antiossidante nonostante valori decisamente inferiori nel contenuto di fenoli e flavonoidi totali.

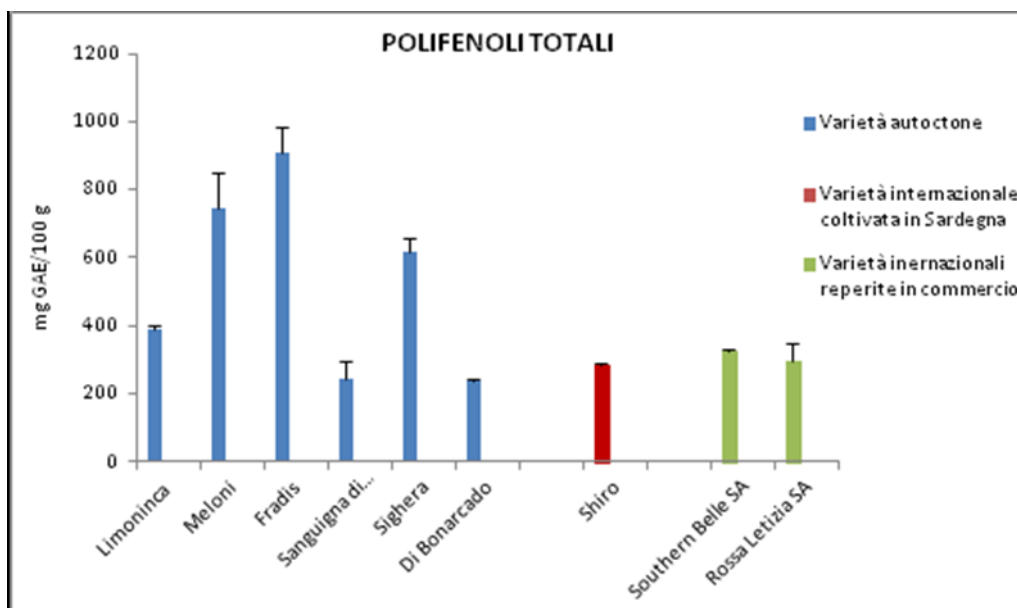


Fig. 1

Contenuto di polifenoli totali nei campioni di prugna espressi come equivalenti di acido gallico per 100 g di peso fresco

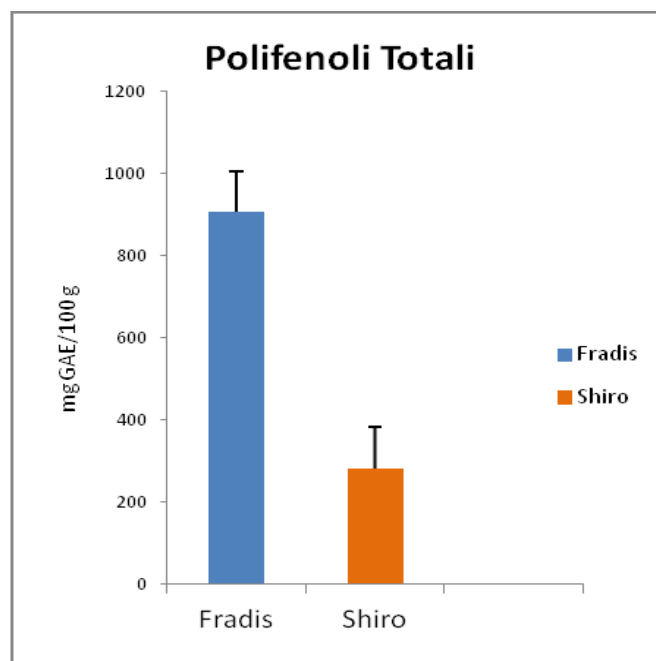


Fig.2

Contenuto di polifenoli totali : confronto tra la cultivar autoctona Fradis e la cultivar internazionale coltivata in Sardegna Shiro.

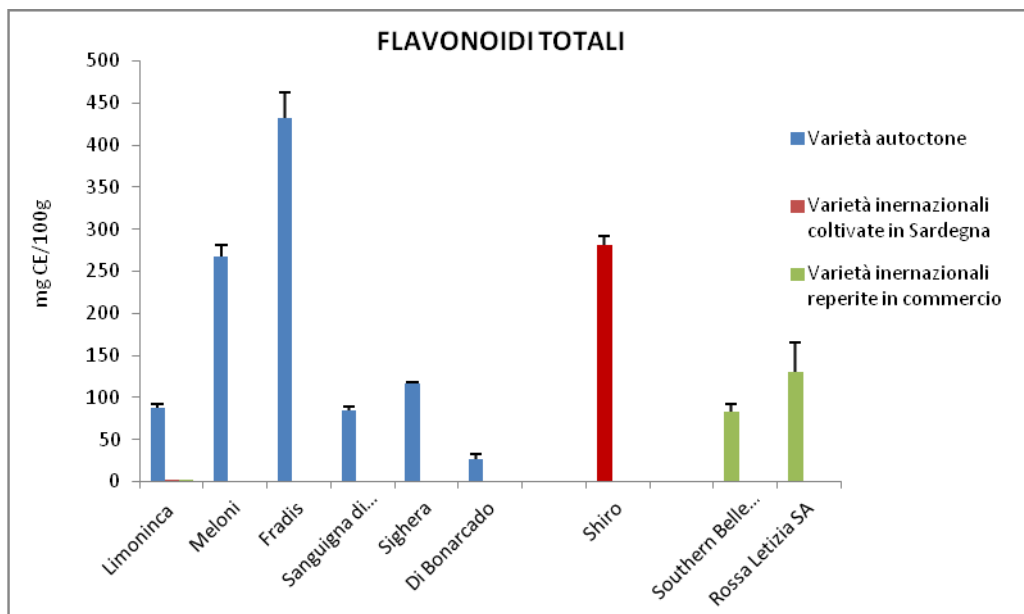


Fig. 3

Contenuto di flavonoidi totali ottenuti nei campioni di prugna espressi come mg di catechina equivalenti (CE) in 100 g di peso fresco.

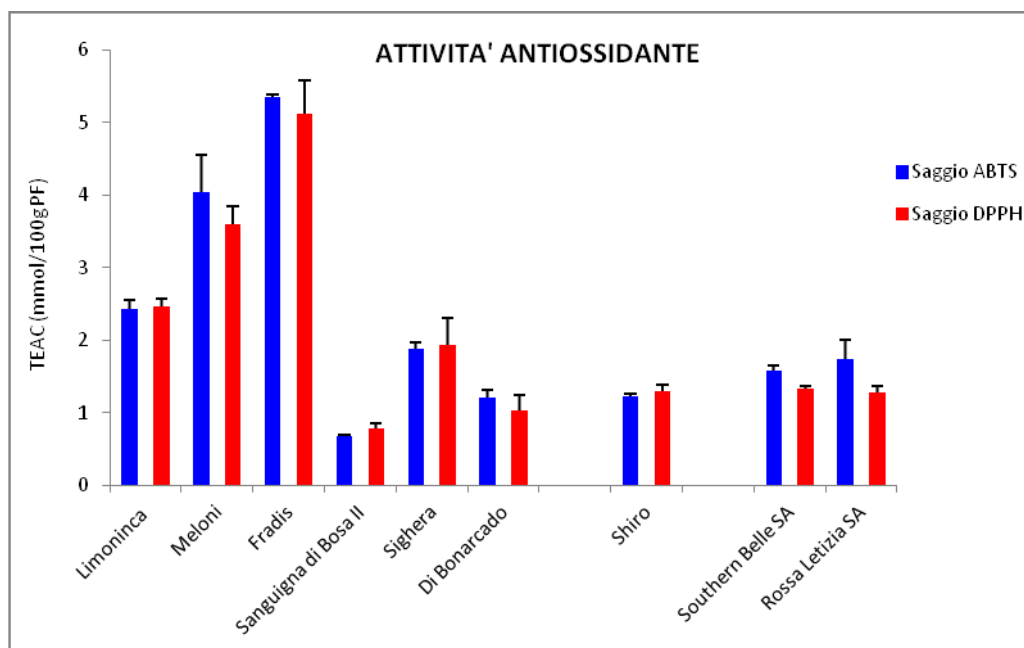


Fig. 4

Attività antiossidante espressa come trolox equivalenti, millimoli per 100 g di peso fresco, misurata con i saggi dell'ABTS e del DPPH.

4.2 Analisi chimico-funzionali su campioni di pera

Per le tutte le cultivar autoctone e non di pere sono state studiate le caratteristiche chimico-funzionali allo stadio di maturazione commerciale. Tutte la pere autoctone studiate possiedono un contenuto di polifenoli nettamente superiore alla cultivar di confronto 'Coscia', ed in particolare i valori delle accessioni 'Mamoi' e 'De Puleo' superano di 13 e 8 volte rispettivamente quelli della varietà 'Coscia'. Inoltre la natura chimica di tali polifenoli è caratterizzata da attività *radical scavering* come dimostra la correlazione altamente positiva ($R^2= 0.93$) tra capacità antiossidante e polifenoli totali, per entrambi i saggi TEAC.

La capacità antiossidante delle cultivar 'Mamoi' e 'De Puleo' è più alta in termini assoluti rispetto a tutte le varietà.

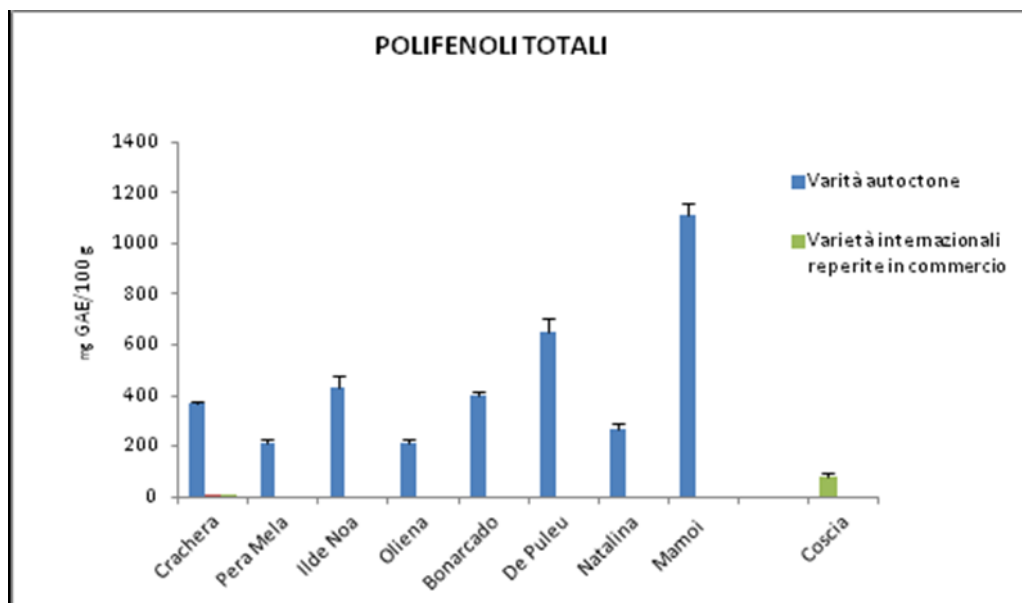


Fig. 5

Contenuto di polifenoli totali nei campioni di pera espressi come equivalenti di acido gallico per 100 g di peso fresco.

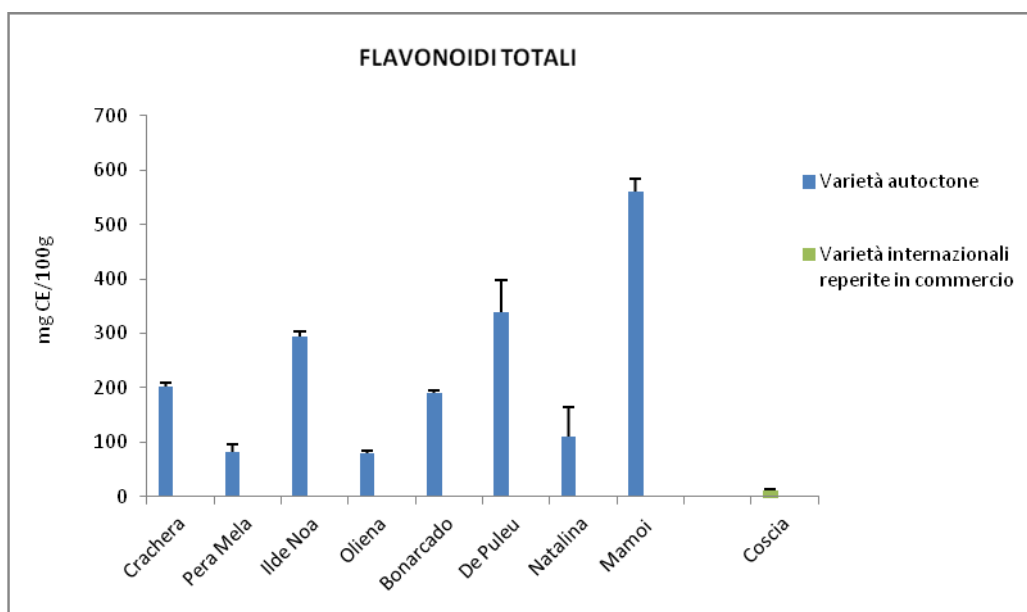


Fig. 6

Contenuto di flavonoidi totali ottenuti nei campioni di pera espressi come mg di catechina equivalenti (CE) in 100 g di peso fresco.

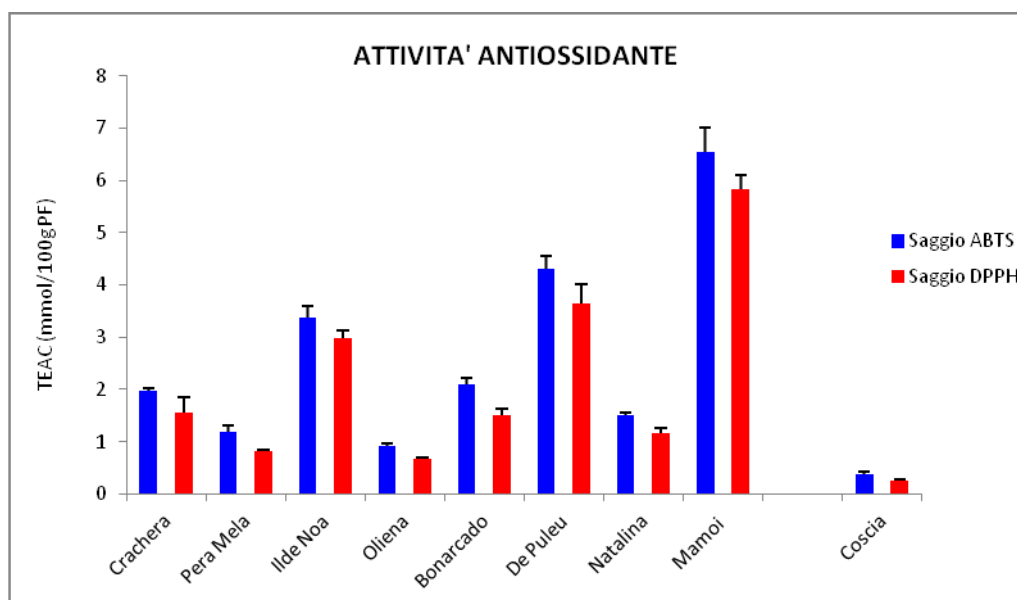


Fig. 7

Attività antiossidante espressa come trolox equivalenti, millimoli per 100 g di peso fresco, misurata con i saggi dell'ABTS e del DPPH.

4.3 Analisi chimico-funzionali su campioni di mela

Le cinque accessioni analizzate di mele autoctone ('Nuchis', 'Appio rosseggiante', 'Mela rosa', 'Sant'Andrea', 'Nuchis A') mostrano tutte un elevato contenuto di polifenoli totali, almeno doppio rispetto a quelle internazionali di confronto 'Red' e 'Golden delicious'. 'Nuchis' e 'Appio rosseggiante' sono caratterizzate da un contenuto di polifenoli oltre i 600 mg di GAE/100 g di peso fresco. Anche il potere antiossidante misurato con il saggio dell'ABTS risulta superiore per tutte le accessioni autoctone in confronto alle accessioni di confronto 'Red Delicious' e 'Golden Delicious'.

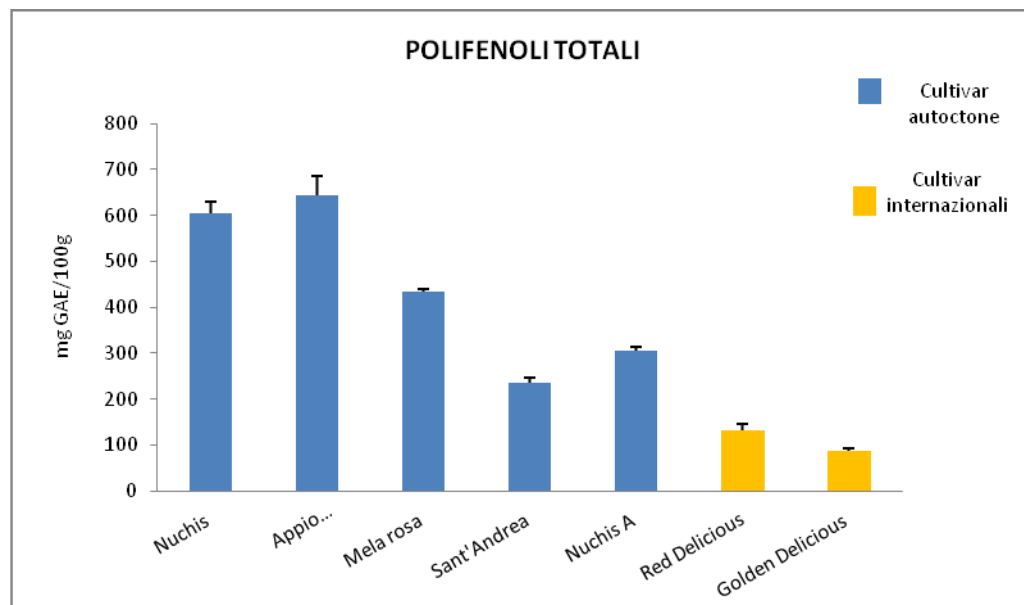


Fig. 8

Contenuto di polifenoli totali nei campioni di mela espressi come equivalenti di acido gallico per 100 g di peso fresco

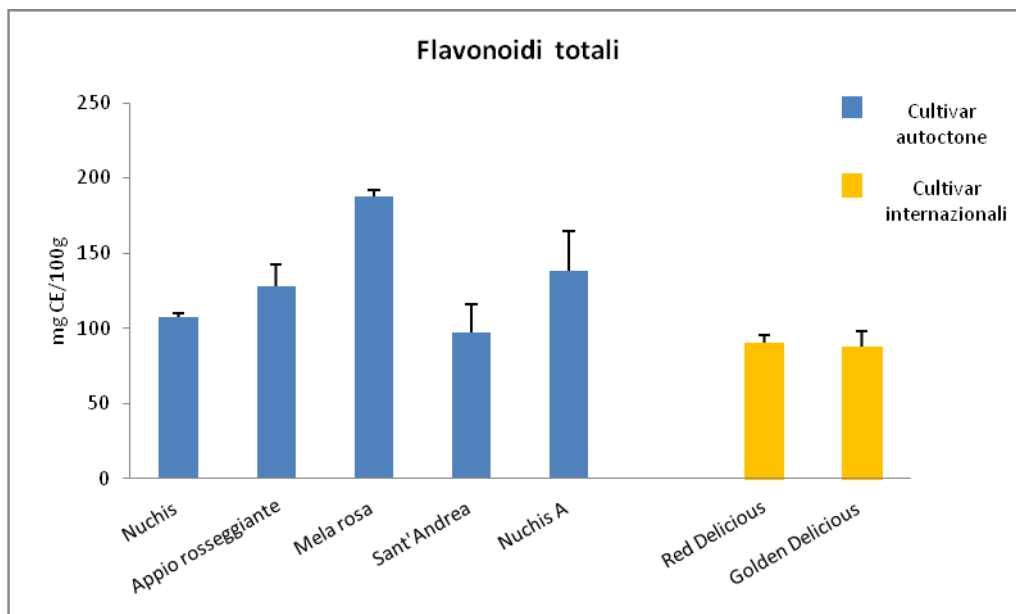


Fig. 9

Contenuto di flavonoidi totali ottenuti nei campioni di mela espressi come mg di catechina equivalenti (CE) in 100 g di peso fresco.

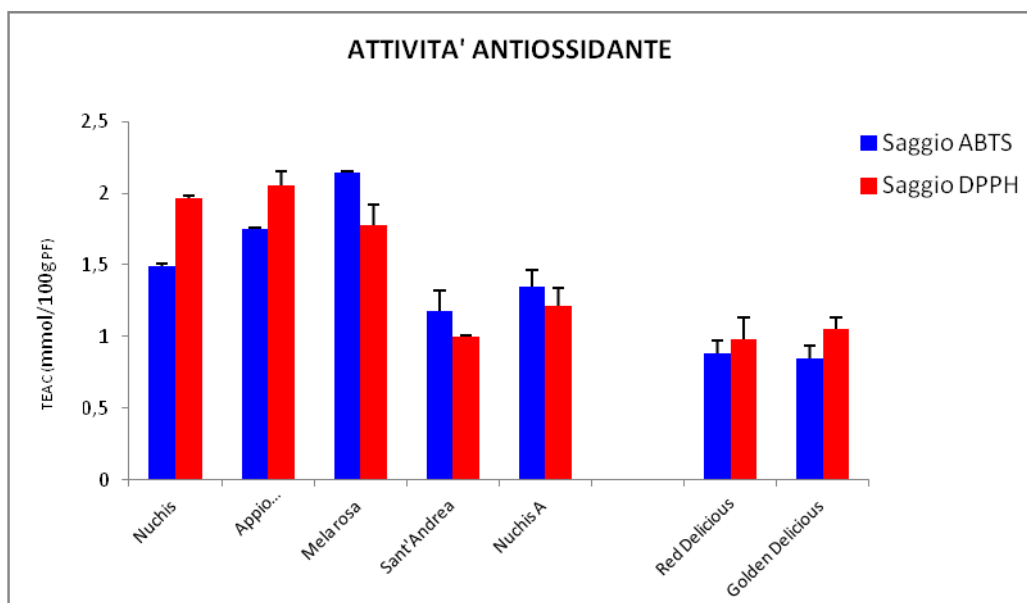


Fig. 10

Attività antiossidante espressa come trolox equivalenti, millimoli per 100 g di peso fresco, misurata con i saggi dell'ABTS e del DPPH.

4.4 Saggio di vitalità cellulare in campioni di susine

La valutazione della vitalità cellulare delle cellule HUVEC è stata fatta utilizzando due fluorofori intercalanti del DNA: ioduro di propidio (PI), Hoechst 33342 come descritto in materiali e metodi. Il controllo è rappresentato da cellule non trattate con estratti di susine.

Tutte le cellule sono state trattate con concentrazioni crescenti di estratti (30 µg/ml, 60 µg/ml, 90 µg/ml) per 24 ore.

Nella figura 11 sono mostrati i risultati in cui si può notare che quasi tutti gli estratti di susine non modificano negativamente la vitalità cellulare a tutte le concentrazioni testate, ad eccezione della concentrazione più alta delle cultivars 'Limoninca' e 'Shiro'.

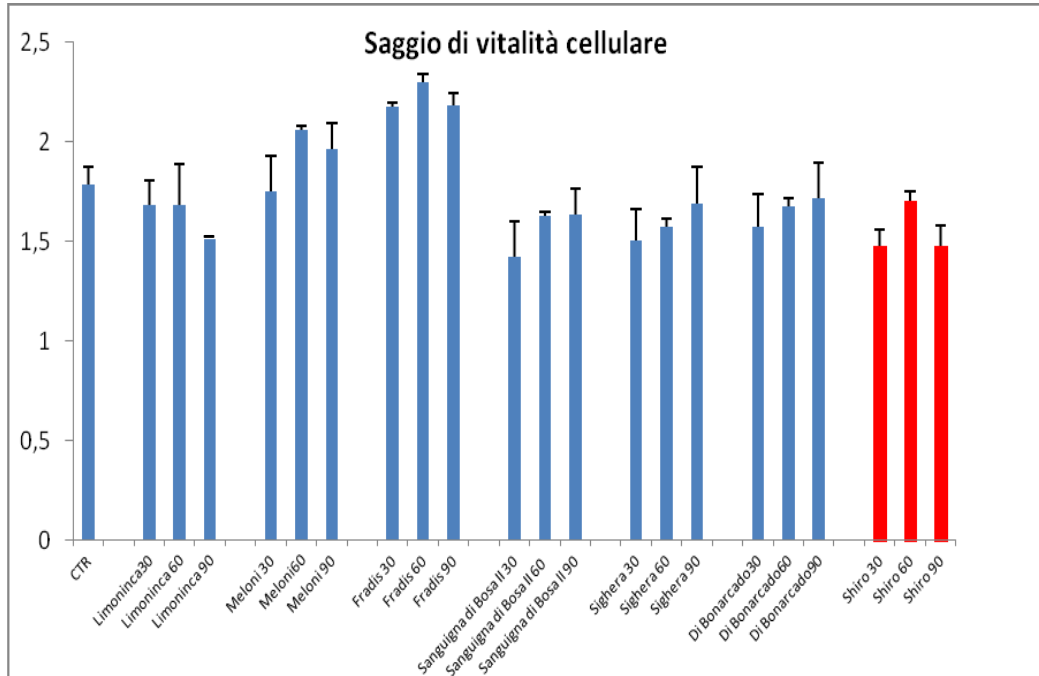


Fig. 11

Saggio di vitalità cellulare : gli estratti delle susine testati a concentrazioni crescenti non sono tossici per le cellule endoteliali (HUVEC).

4.5 Misura del danno ossidativo a breve termine

Per valutare una possibile protezione degli estratti di susine su un danno ossidativo indotto dall' H_2O_2 (100 μM) sulle cellule HUVEC, queste sono state trattate con diverse concentrazioni (30 $\mu g/ml$, 90 $\mu g/ml$, 120 $\mu g/ml$) per 24 h e aggiungendo l'acqua ossigenata nelle ultime due ore. I risultati della figura 12 mostrano che tutti gli estratti testati sono capaci di proteggere le cellule dal danno indotto dall'acqua ossigenata, a tutte le concentrazioni utilizzate, rispetto al controllo rappresentato dalle cellule trattate con la sola acqua ossigenata.

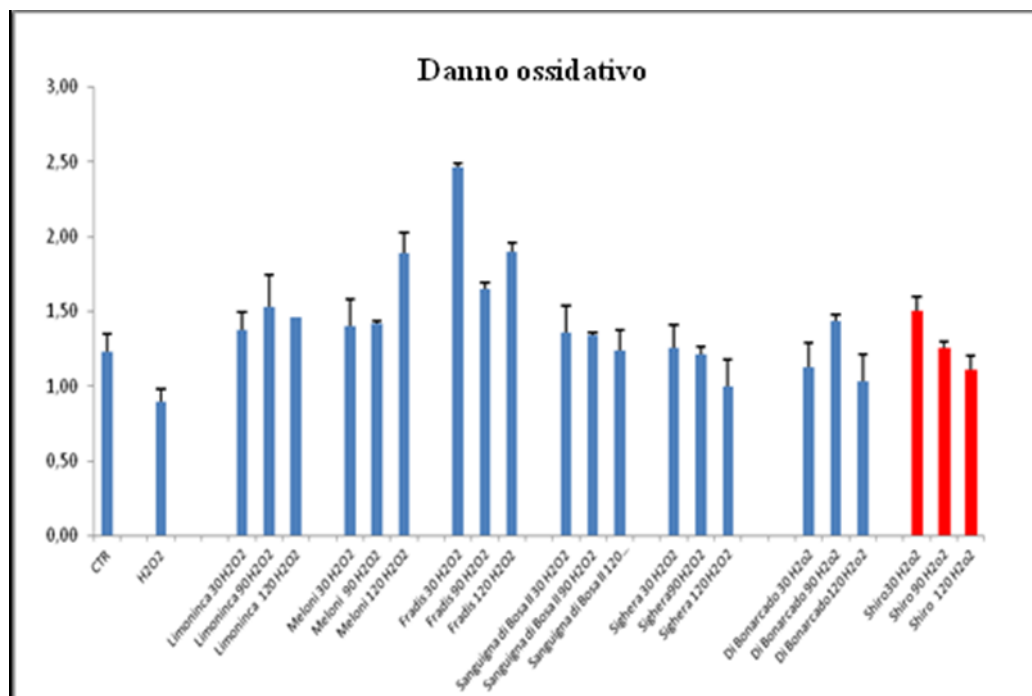


Fig. 12

Gli estratti di susine testati proteggono le cellule endoteliali (HUVEC) dal danno indotto dall'acqua ossigenata.

4.6 Misura della concentrazione intracellulare dei ROS

Si è quindi voluto analizzare gli effetti degli estratti di susine sui livelli basali dei ROS intracellulari; per questo le cellule sono state trattate per 24 ore con una concentrazione più alta, rispetto ai precedenti esperimenti, dei diversi estratti (120 µg/ml) ed al termine abbiamo misurato la fluorescenza indotta dall'aggiunta della sonda H₂DCFDA, come descritto in materiali e metodi. Solo gli estratti delle cultivar 'Limoninca', 'Meloni' e 'Sanguigna di Bosa' sembrano aumentare la concentrazione basale delle specie reattive dell'ossigeno rispetto alle cellule di controllo rappresentate dalle HUVEC non trattate. Tutti gli altri estratti analizzati non sembrano modificare i livelli basali di ROS (Figura 13).

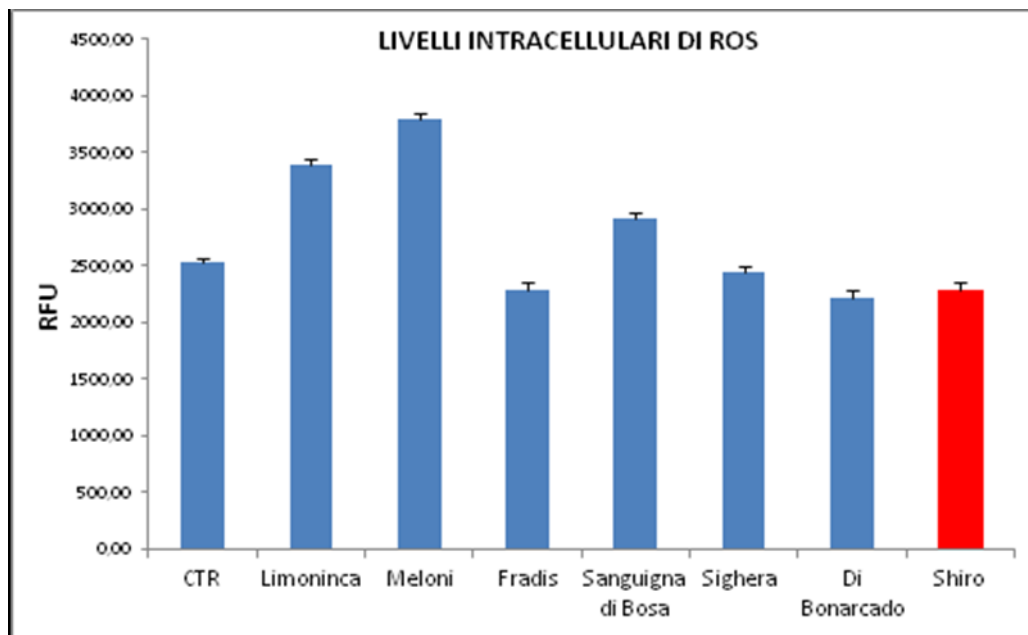


Fig. 13

Livelli dei ROS intracellulari nelle cellule endoteliali in assenza (CTR) o presenza dei diversi estratti di susina (120µg/ml) con un trattamento di 24 h.

A questo punto è stata valutata l'attività modulante delle specie reattive dell'ossigeno da parte degli estratti di susine dopo aggiunta di H₂O₂. Per questo scopo le cellule HUVEC sono state trattate con la concentrazione più alta di estratti pari a 120 µg/ml e la formazione dei ROS intracellulari è stata misurata dopo 24 di trattamento in cui, nelle ultime due ore, è stato indotto lo stress ossidativo con H₂O₂. In seguito all'induzione di tale stress, la presenza nelle cellule di tutti gli estratti di susine ha ridotto la quantità dei radicali liberi rispetto al controllo cioè all'H₂O₂ in misura diversa (Figura 14). La cultivar che ha indotto i più bassi livelli di ROS è stata la 'Fradis', accessione che negli esperimenti *in vitro* ha mostrato un contenuto maggiore di polifenoli totali e flavonoidi ed una più alta attività antiossidante *in vitro*.

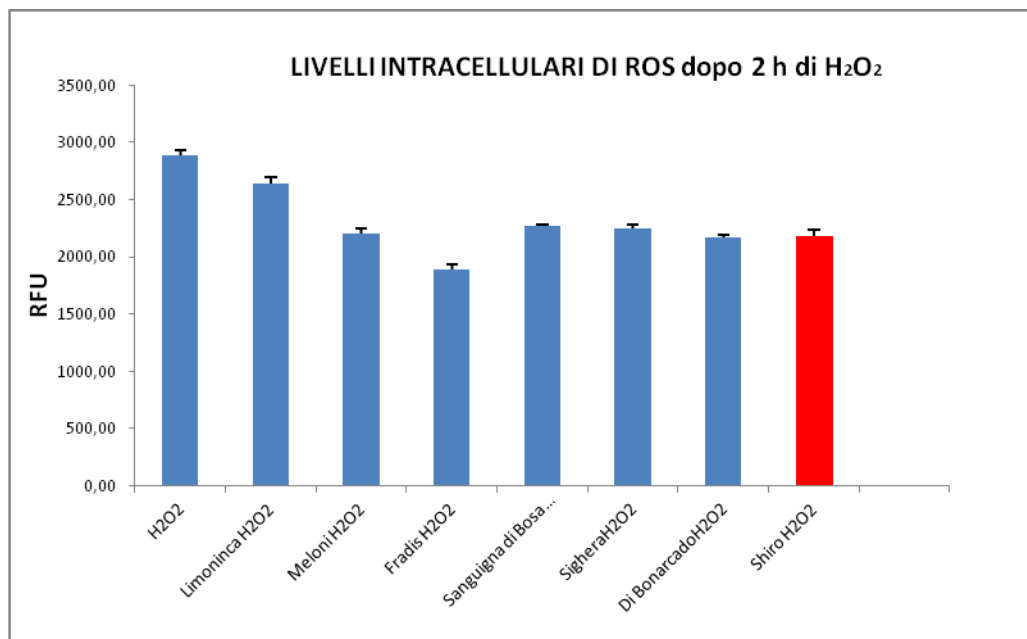


Fig. 14

Livelli dei ROS intracellulari nelle cellule endoteliali in assenza o presenza dei diversi estratti di susina (120µg/ml) dopo 24 h di trattamento con l'aggiunta di H₂O₂(100µM) nelle ultime due ore.

CONCLUSIONI

Studi epidemiologici suggeriscono un effetto protettivo di frutta e verdure contro il cancro e le malattie cardiovascolari. Varie ipotesi sono state proposte per spiegare questi effetti benefici di un maggiore consumo di verdure e frutta. Una delle più accreditate è che la frutta e verdura contengano composti che hanno effetti protettivi, indipendenti da quelli dei nutrienti e micronutrienti conosciuti. I polifenoli sono un grande gruppo di antiossidanti naturali onnipresenti in una dieta ad alto contenuto di frutta e verdura; sono un gruppo di composti caratterizzati dalla capacità di ossidarsi più facilmente rispetto ad altre specie presenti nella cellula: prevengono o rallentano, quindi, il fenomeno dell'ossidazione (3).

L'interesse per i composti fenolici alimentari è notevolmente aumentato negli ultimi tempi. Oggi le sostanze antiossidanti sono considerate indispensabili per il corretto funzionamento dell'organismo e vengono utilizzate anche come integratori alimentari per la loro azione protettiva nei confronti di tumori e patologie cardiovascolari (11). Lo scopo di questo progetto di tesi è stato quello di valutare le caratteristiche nutrizionali di differenti varietà di frutta di origine sarda e di metterle a confronto con le varietà internazionali reperite in commercio. Questo studio ha permesso non solo di effettuare un confronto tra il potere antiossidante di prodotti locali e non, ma anche di condurre uno studio, secondario, in vivo, testando gli estratti della frutta analizzata su cellule endoteliali umane di cordone ombelicale (HUVEC).

Nelle varietà di susine di origine sarda analizzate in questo lavoro, il contenuto totale di polifenoli è di gran lunga superiore a quello dei campioni di frutta di origine

internazionale utilizzati come controllo: in particolare si evidenzia il contenuto delle cultivar autoctone *Fradis* e *Meloni*. Queste due cultivar si differenziano da tutte le altre accessioni anche per il loro contenuto di flavonoidi totali e per la capacità antiossidante, estremamente elevata in vitro.

Anche nelle varietà di pere studiate, quelle di origine sarda si distinguono dal controllo per il loro contenuto di polifenoli totali: le accessioni *Mamoi* e *De Puleo*, in particolare, mostrano un contenuto elevato anche di flavonoidi totali ed hanno una capacità antiossidante in vitro nettamente superiore ai valori del controllo internazionale reperito in commercio.

Le varietà di mela con il contenuto di antiossidanti più alto risultano essere le cultivar autoctone di *Nuchis* e *Appio Rosseggiante*: queste si distinguono dalle varietà non autoctone per il loro contenuto in flavonoidi totali e per la capacità antiossidante.

Nella seconda parte del lavoro si è pensato di testare gli estratti della frutta su cellule endoteliali umane di cordone ombelicale (HUVEC): l'endotelio gioca un ruolo fondamentale nella omeostasi cardiovascolare: le anomalie delle cellule endoteliali sono coinvolte nelle patologie cardiovascolari (46). La maggior parte delle patologie e l'invecchiamento degli esseri viventi sono causate da processi chimici ossidativi, dovuti ad una eccessiva produzione di radicali liberi (19). L'elevata reattività dei ROS provoca inevitabilmente danni sulla salute umana. Tra le diverse patologie che sono state associate all'elevata concentrazione di specie reattive dell'ossigeno spicca il cancro, la cui causa principale è la mutazione del DNA ad opera di radicali come OH^\bullet , già illustrata nei capitoli precedenti.

Negli esperimenti eseguiti sulle HUVEC, abbiamo trattato le cellule con concentrazioni crescenti di estratti di susine ed abbiamo valutato il loro effetto su alcuni parametri cellulari. In primo luogo abbiamo valutato la vitalità cellulare con il saggio fluorimetrico HOECHST/PI pretrattando le cellule HUVEC con varie concentrazioni di estratti di prugna provenienti dalle diverse specie. In secondo luogo abbiamo studiato l'effetto protettivo indotto dall'estratto dopo la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nelle cellule endoteliali. I risultati preliminari dimostrano che tutti gli estratti di *Prunus domestica* non hanno alcun effetto tossico sulle colture cellulari e sembrano proteggere le cellule HUVEC contro lo stress ossidativo riducendo la quantità dei radicali liberi prodotti rispetto al controllo non trattato con gli estratti di susine.

I nostri risultati preliminari dimostrano che le cultivar sarde sembrano possedere un contenuto di molecole ad azione antiossidante superiore a quello delle cultivar internazionali. In particolare la cultivar 'Fradis' si è dimostrato la più abile nell'abbassare i livelli di ROS nelle cellule; questo risultato è coerente con gli esperimenti *in vitro* poiché tale accessione ha mostrato un contenuto maggiore di polifenoli totali e flavonoidi ed una più alta attività antiossidante *in vitro*.

Poiché i modelli sperimentali utilizzati erano basati sulle cellule dei vasi (modello endoteliale), i risultati qui presentati possono fornire informazioni utili su potenziali applicazioni preventive/terapeutiche degli estratti studiati sul modello cardiovascolare. Inoltre, in linea con le nostre aspettative, le colture di cellule endoteliali rappresentano un utile modello per lo screening *in vitro* di estratti vegetali nella ricerca di proprietà antiossidanti e per rivelare meccanismi correlati. Ulteriori studi sono ora necessari per stabilire il destino delle sostanze nell'organismo e la loro importanza biologica

BIBLIOGRAFIA

1. Ames B.N. (1983) *Dietary carcinogens and anticarcinogens*. Science, 221: 1256-1264.
2. Ames B, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. *Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981 Nov;78(11):6858-62.
3. Ames B.N., Shigenaga M.K. (1992) *Oxidants are a major contributor to aging*. Ann. N.Y. Acad. Sci.663: 85–96.
4. Antolovich M, Prenzler P, Patsalides E, Mcdonal S, Robards K. *Methods for testing antioxidant activity*. Analyst. 2002 Jan;127(1):183-98.
5. Arts ICW, Hollman PCH. *Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies*. Am J Clin Nutr. 2005 Jan;81(1 Suppl):317S-325S
6. Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, Busse R *Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells*. FASEB J. 1999 Jul;13(10):1231-8
7. Beckman KB, Ames BN. *The free radical theory of aging matures*. Physiol Rev. 1998 Apr;78(2):547-81
8. Birt DF, Hendrich S, Wang W. *Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids*. Pharmacol Ther 2001;90:157-77.
9. Boveris A, Oshino N, Chance B *The cellular production of hydrogen peroxide..* Biochem J. 1972 Jul;128(3):617-30
10. Boonstra J, Post JA. *Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells*. Gene. 2004;337:1-13
11. Bravo L. *Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance*. Nutr Rev. 1998 Nov;56(11):317-33.

12. Cai H. and Harrison D. G. *Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress*. Circ. Res. 2000; 87, 840–844
13. Cavalli-Sforza, L.L., Menotti, P., Piazza, A., 1994. *The History and Geography of Human Genes*. Princeton University Press, Princeton, NJ.
14. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, et al. (1998) *Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders*. Blood 91: 3527-3561
15. Cook N.C., Samman S. (1996) *Flavonoids Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources*. Nutritional Biochemistry, 7: 66–76.
16. Cuzzocrea S., Riley D. P, Caputi A. P., Salvemini D. *Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury*. Pharmacol Rev (2001); 53, 135-159
17. Czacot H. (2000) *Biological activities of flavonoids A review*. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 950(4): 3–13.
18. G.D'hallewin, E. Canu, S.Pinna, A.M. Posadino, G.F. Pintus, M.G. Molino, E. Sotgiu, A. Baralla, S. Pasella, L. Deiana *Prunus domestica fruit extract exhibit anti-oxidant activity in Human Umbilical Endothelial Cells*. EFFoS Annual Meeting – Bio-Based Technologies in the Context of European Food Innovation Systems - Bologna, 12-15 Novembre 2013
19. D'Archivio M, Filesi C, Di Benetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. *Polyphenols, dietary sources and bioavailability*. Ann Ist Super Sanita. 2007;43(4):348-61.
20. Deiana L, L. Ferrucci, G.M. Pes, C. Carru, G. Delitala, A. Ganau, S. Mariotti, A. Nieddu, S. Pettinato, P. Putzu, C. Franceschi, and G. Baggio. *AKEntAnnos. The Sardinia Study of Extreme Longevity. Aging Clin. Exp. Res.*, 1999; 11(3): 142-149
21. Deiana L, Pes GM, Carru C, Ferrucci L, Franceschi C, Baggio G. *The "Oldest Man on the Planet"*. J Am Geriatr Soc 2002 Dec;50(12):2098-9
22. Del Caro A, Piga A, Pinna I, Fenu PM, Agabbio M (2004) *Effect of drying conditions and storage period on polyphenolic content, antioxidant capacity, and ascorbic acid of prunes*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 4780-4784

23. Droge, W. *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol. Rev. 2002; 82, 47–95
24. Dong-Yun S, Yu-Ru D, Shan-Lin L, Ya-Dong Z, Lian W. *Redox stress regulates cell proliferation and apoptosis of human hepatoma through Akt protein phosphorylation*. FEBS Lett. 2003 May 8;542(1-3):60-4
25. Finkel T. *Reactive oxygen species and signal transduction* IUBMB Life. 2001 Jul;52(1-2):3-6.
26. Frei B. *Reactive oxygen species and antioxidant vitamins* Am J Med. 1994 Sep 26;97(3A):5S-13S
27. Fridovich I. *The biology of oxygen radicals*. Science. 1978;201:875-880
28. Fridovich I (1998). *Oxygen toxicity, a radical explanation*. The J. Experimental Biol. 201: 1203–1209.
29. Fremont L, Belguendouz L and Delpal S. *Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids*. Life Sci. 1999;64:2511- 2521
30. Gemma C, Vila J, Bachstetter A, Bickford PC. *Oxidative Stress and the Aging Brain: From Theory to Prevention*. In: Riddle DR, editor. *Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms*. Boca Raton (FL): CRC Press; 2007. Chapter 15.
31. Genestra M. *Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants*. Review. Cell Signal. 2007;19:1807-19
32. Gimeno E, Fito M, Lamuela-Raventos RM, Castellote AI, Covas M, Farre M, de La Torre-Boronat MC, Lopez- Sabater MC. *Effect of ingestion of virgin olive oil on human low-density lipoprotein composition*. Eur J Clin Nutr. 2002 Feb;56(2):114-20.
33. Giordo R, Cossu A et al.(2013) *Different redox response elicited by naturally occurring antioxidants in human endothelial cells*. Open Biochem J. 2013 Apr 19;7:44-53
34. Guo CJ, Yang JJ, Wei JY, Li YF, Xu J, et al. (2003) *Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay*. Nutrition Research 23: 1719-1726.
35. Halliwell B, Whiteman M. *Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?* Br J Pharmacol. 2004 May; 142(2): 231–255.

36. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* 2007;35:1147-50.
37. Halliwell B, Gutteridge JMC (1989). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts *Arch Biochem Biophys.* 1986 May 1;246(2):501-14
38. Harman D. Aging A theory based on free radical and radiation chemistry. *Journals of Gerontology;* 11, 3 (1956) 298-300.
39. Havsteen B.H. (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* 96: 67-202.
40. Hollman P.C.H., Hertog M.G.L., Katan M.B. (1996) Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry* 57(1): 43–46.
41. Kuntz S., Wenzel U., Daniel H. (1999) Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *European Journal of Nutrition* 38(3):133–142.
42. Irani K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ. Res.* 2000; 87, 179–183.
43. Ishiwata K, Yamaguchi T, Takamura H, Matoba I (2004) DPPH radical-scavenging activity and polyphenol content in dried fruits. *Food Science and Technology Research* 10: 152-156.
44. Y.H. Datta, B.M. Ewenstein. Regulated secretion in endothelial cells: biology and clinical implications. *Thromb Haemost.* 86 (2001) 1148-1155
45. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest.* 1973 Nov;52(11):2745-56.
46. Jakobisiak M, Lasek W, Golab J Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunol Lett.* 2003 Dec 15;90(2-3):103-22

47. Landis GN, Tower J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech Ageing Dev.* 2005;126:365-79.
48. Lee K W and Lee H J. The roles of polyphenols in cancer chemoprevention. *Biofactors* 2006; 26:105-121.
49. Lum H, Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001 Apr;280(4):C719-41
50. Marrugat J, Covas MI, Fito M, Schroder H, Miro-Casas E, Gimeno E, Lopez-Sabater MC, de la Torre R, Farre M. Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation - a randomized controlled trial. *Eur J Nutr.* 2004 Jun;43(3):140-7. Epub 2004 Jan 6
51. Masella R, Giovannini C, Vari R, Di Benedetto R, Coni E, Volpe R, Fraone N, Bucci A. Effects of dietary virgin olive oil phenols on low density lipoprotein oxidation in hyperlipidemic patients. *Lipids.* 2001 Nov;36(11):1195-202.
52. Masaki H. Role of antioxidants in the skin: Anti-aging effects. *Journal of Dermatological Science*; 58, 2 (2010) 85-90.
53. Manzocco, L., S. Calligaris, D. Mastrocola, M. C. Nicoli & C. R. Lerici: Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *J Agric Food Chem.* 2000 Oct;48(10):4576-80.
54. McCall MR, Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radic Biol Med.* 1999 Apr;26(7-8):1034-53
55. Naasani I, Oh-Hashi F, Oh-Hara T, Feng WY, Johnston J, Chan K, Tsuruo T. Blocking telomerase by dietary polyphenols is a major mechanism for limiting the growth of human cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 2003 Feb 15;63(4):824-30.
56. Nishikawa, M: Reactive oxygen species in tumor metastasis. *Cancer Lett*, 266, 53-59 (2008)
57. Nordberg J, Arnér ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* 2001;31:1287-1312.
58. Orrenius, S., V. Gogvadze & B. Zhivotovsky: Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47, 143-83 (2007)

59. Ovaskainen ML, Törrönen R, Koponen JM, Sinkko H, Hellström J, Reinivuo H, Mattila P. Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults. *J Nutr.* 2008 Mar;138(3):562-6.
60. Pasciu V, Posadino AM et al. (2010) Akt downregulation by flavin oxidase-induced ROS generation mediates dose-dependent endothelial cell damage elicited by natural antioxidants *Toxicol Sci.* 2010 Mar;114(1):101-12
61. Pignatelli P. et al (2006) Polyphenols synergistically inhibit oxidative stress in subjects given red and white wine. *Atherosclerosis.* 188: 77-83
62. Poulain M et al. Identification of a geographic area characterized by extreme longevity in the Sardinia island: the AKEA study *Exp Gerontol.* 2004 Sep;39(9):1423-9
63. Robards K., Antolovich M. (1997) Analytical chemistry of fruits bioflavonoids A review. *Analyst* 122:11R-34R.
64. Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2005;45(4):287-306.
65. Seifried H, Anderson D, Fischer E, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *Journal of Nutritional Biochemistry;* 18, 9 (2007)
66. Singleton VL, RossiJAJ. Colorimetry of total phenolic with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture;* 16, 3 (1965) 144-158.
67. Surveswaran S, Cai YZ, Xing J, Corke H, Sun M. Antioxidant properties and principal phenolic phytochemicals of Indian medicinal plants from Asclepiadoideae and Periplocoideae *Nat Prod Res.* 2010 Feb;24(3):206-21
68. Tyler DD .Role of superoxide radicals in the lipid peroxidation of intracellular membranes *FEBS Lett.* 1975 Mar 1;51(1):180-3
69. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000 Dec;(279(6):L1005-28

70. Thannickal VJ. The paradox of reactive oxygen species: injury, signaling, or both? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003 Jan;284(1):L24-5
71. Tkaczyk J., Vízek M. Oxidative Stress in the Lung Tissue– Sources of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defence. *Prague Med Rep.* 2007;108(2):105-14.
72. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology.* 2003;189:41-54.
73. Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izackovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006 Mar 10;160(1):1-40. Epub 2006 Jan 23.
74. Valko M, Izackovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J.. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.* 2004 Nov;266(1-2):37-56
75. Willcox, B. J., Curb, J. D., and Rodriguez, B. L. Antioxidants in cardiovascular health and disease: key lessons from epidemiologic studies. *Am J Cardiol.* 2008 May 22;101(10A):75D-86D.