

Università della Calabria

**Dipartimento di Modellistica per l'Ingegneria
Dipartimento Scienze Farmaceutiche**

***Dottorato di Ricerca in
“Ambiente, salute e processi ecosostenibili”***

Coordinatore

Ch.mo Prof. Bruno de Cindio

ESTRAZIONE ED IDENTIFICAZIONE DI PRINCIPI BIOLOGICAMENTE ATTIVI DA PIANTE ENDEMICHE

(SSD BIO/15 Biologia Farmaceutica)

Supervisor

Ch.mo Prof. Bruno de Cindio

Dott.ssa Rosa Tundis

Dottoranda

Dott.ssa Federica Menichini

INDICE

INTRODUZIONE	pag. I
---------------------------	--------

CAPITOLO 1

Il *Citrus medica* L. cv. Diamante (Cedro)

1.1. Gli agrumi.	pag. 1
1.1.1. Caratteri morfobiologici.	pag. 1
1.1.2. Esigenze pedoclimatiche.....	pag. 2
1.1.3. Raccolta e conservazione dei frutti.	pag. 3
1.1.4. Norme di qualità degli agrumi.	pag. 4
1.2. Specie e varietà.	pag. 6
1.3. Struttura degli agrumi.	pag. 9
1.4. Composizione chimica degli agrumi	pag. 12
1.5. Il <i>C. medica</i> cv Diamante: caratteristiche botaniche	pag. 18
1.6. La coltivazione del Cedro.	pag. 23
1.7. Le origini del Cedro	pag. 25
1.8. Il Cedro e la religione ebraica	pag. 28
Bibliografia	pag. 31

CAPITOLO 2

Il diabete: ricerca attuale e prospettive future

2.1. Introduzione.	pag. 33
2.1.1. Classificazione del diabete.....	pag. 34
2.2. L'insulina	pag. 37
2.3. I carboidrati.....	pag. 39
2.3.1. Metabolismo dei carboidrati: α -amilasi e α -glucosidasi	pag. 41
2.4. Estratti vegetali ad attività ipoglicemizzante	pag. 43
2.5. Composti di origine naturale ad attività ipoglicemica	pag. 51
Bibliografia	pag. 54

CAPITOLO 3

Le malattie neurodegenerative: patogenesi e trattamento

farmacologico

3.1. Introduzione.....	pag. 60
3.2. Il sistema colinergico	pag. 61
3.3. Le colinesterasi	pag. 62
3.3.1. L'enzima acetilcolinesterasi	pag. 63
3.3.2. L'enzima butirrilcolinesterasi	pag. 67
3.4. Le patologie neurodegenerative.....	pag. 69
3.4.1. Il Morbo di Alzheimer	pag. 69
3.4.2. Patogenesi del Morbo di Alzheimer	pag. 70
3.4.3. La diagnosi.....	pag. 75
3.4.4. I sintomi	pag. 78
3.4.5. Il decorso.....	pag. 78
3.4.6. Il trattamento farmacologico.....	pag. 80
3.5. Inibitori delle colinesterasi di origine naturale	pag. 83
3.6. Inibitori delle colinesterasi in altre patologie neurodegenerative.....	pag. 90
3.6.1. La demenza associata al morbo di Parkinson (PDD)	pag. 90
3.6.2. La demenza a corpi di Lewy (DLB)	pag. 91
Bibliografia	pag. 93

PARTE SPERIMENTALE..... pag. 99

CAPITOLO 4

Screening fitochimico del *Citrus medica* L. cv Diamante (Cedro)

4.1. Introduzione	pag. 100
4.2. Raccolta dei campioni di <i>Citrus medica</i> L. cv Diamante.	pag. 100
4.3. Preparazione degli estratti di <i>Citrus medica</i> L. cv Diamante	pag. 101
4.4. Isolamento degli oli essenziali di Cedro.....	pag. 104
4.4.1. Gli oli essenziali: caratteristiche chimiche e proprietà biologiche	pag. 105
4.5. Metodi di identificazione qualitativa dei costituenti di Cedro.....	pag. 110
4.6. Dosaggio quantitativo di principi attivi del Cedro.....	pag. 114

4.6.1. Dosaggio dei polifenoli totali	pag. 114
4.6.2. Dosaggio dei flavonoidi totali.....	pag. 114
4.6.3. Dosaggio quantitativo e caratterizzazione dei flavonoidi del Cedro	pag. 115
4.6.4. Analisi quantitativa dell'olio essenziale di Cedro	pag. 118
4.7. Risultati e discussione.....	pag. 119
4.7.1. Costituenti chimici degli estratti di Cedro	pag. 119
4.7.2. Composizione chimica degli oli essenziali di Cedro	pag. 126
Bibliografia	pag. 134

CAPITOLO 5

Valutazione dell'attività biologica di *Citrus medica* L. cv Diamante

5.1. Introduzione	pag. 138
5.2. Attività antiossidante.	pag. 138
5.2.1. Genesi dei radicali liberi	pag. 138
5.2.2. Danni cellulari da radicali liberi	pag. 140
5.2.3. Ruolo dei radicali nella patologia umana	pag. 143
5.2.4. Difese cellulari	pag. 144
5.2.5. DPPH test.....	pag. 146
5.2.6. β -Carotene bleaching test	pag. 147
5.3. Attività antiinfiammatoria.....	pag. 148
5.3.1. Test di inibizione della produzione di nitrossido.....	pag. 149
5.4. Test di inibizione di acetil- e butirril-colinesterasi (Ellman's test)	pag. 150
5.5. Attività ipoglicemizzante <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	pag. 151
5.5.1. Test di inibizione dell' α -amilasi.....	pag. 151
5.5.2. Test di inibizione dell' α -glucosidasi	pag. 154
5.5.3. Test di stimolazione della secrezione di insulina sulla linea cellulare β pancreatica murina MIN6.....	pag. 155
5.5.4. Studio <i>in vivo</i> dell'estratto idroalcolico dell'epicarpo di Cedro	pag. 156
5.6. Risultati e discussione.....	pag. 157
5.6.1. Attività antiossidante	pag. 157
5.6.2. Attività antiinfiammatoria.....	pag. 162
5.6.3. Attività anticolinesterasica.....	pag. 163

5.6.4. attività ipoglicemizzante <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	pag. 166
Bibliografia	pag. 174
CONCLUSIONI	pag. 179

Introduzione

L'interesse verso la rivalutazione di colture di nicchia, ma esprimenti caratteri di biodiversità estremamente marcati, è un recente item di processi agronomici miranti alla rivalutazione del patrimonio floristico locale, nonché alla proposizione di un modello di agricoltura sostenibile che coniughi la produttività alla qualità di prodotti che per le loro peculiarità rappresentano preziose fonti di principi attivi.

Tali processi di agricoltura sostenibile passano attraverso lo sfruttamento della materia prima non solo nell'ambito più tradizionale finora conosciuto, ma attraverso il suo proiettarlo in nuovi ambiti in cui meglio collocare l'offerta di prodotti di alta qualità. In questo senso il presente lavoro di ricerca ha inteso compiere il primo passo verso la riqualificazione della coltura del Cedro (*Citrus medica* L. cv Diamante), che rappresenta una sorta di endemismo in Italia ed è tipico della zona costiera alto tirrenica della provincia di Cosenza.

Nell'ambito più ampio appena descritto, il presente lavoro ha inteso fornire caratterizzazione fitochimica degli estratti dei frutti in due stadi maturativi (maturi e immaturi), dei fiori e delle foglie di *C. medica* cv Diamante (Cedro) e dell'olio essenziale ottenuto con differenti tecniche al fine di evidenziare il legame tra metodica estrattiva e composizione fitochimica.

Il frutto è stato esaminato nelle diverse componenti separatamente, al fine di individuare eventuali siti di accumulo dei principi attivi in relazione a quelli di produzione. Sono stati così oggetto di studio l'epicarpo, dal quale si ottiene, come per quasi tutti gli agrumi, l'olio essenziale dagli orticoli che lo compongono, il mesocarpo, elemento importante che diventa materia di congiunzione tra l'epicarpo e l'endocarpo, che rappresenta la parte quantitativamente più abbondante del frutto. Separatamente sono stati analizzati anche i semi al fine di determinare la variabilità del contenuto fitochimico in relazione alle altre parti del frutto e a eventuali processi biosintetici propri.

Il lavoro fitochimico è stato completato estendendo le analisi ad altre componenti della pianta, nello specifico le foglie e i fiori, al fine di individuare nuove fonti di principi attivi utili già ritrovati nei frutti ovvero evidenziare una composizione fitochimica diversa in relazione ad un metabolismo variato rispetto al frutto.

Le componenti del frutto, nonché le foglie e i fiori, sono stati in un secondo momento oggetto di un dettagliato studio mirato a valutare le potenzialità biologiche del Cedro. In particolare, è stata valutata l'attività antiossidante mediante l'impiego del DPPH test e del β -carotene bleaching test, l'attività antiinfiammatoria mediante la valutazione dell'inibizione della produzione di nitrossido, l'inibizione di acetilcolinesterasi e butirrilcolinesterasi, i due principali enzimi implicati nell'eziopatogenesi del Morbo di Alzheimer, e l'inibizione di α -amilasi e α -glucosidasi, enzimi digestivi importanti nel ridurre il picco glicemico post-prandiale in pazienti diabetici.

L'attività ipoglicemizzante dell'estratto idroalcolico dell'epicarpo dei frutti maturi, dimostratosi il più attivo nei saggi *in vitro*, è stata oggetto di più approfonditi studi tesi alla valutazione della stimolazione della secrezione di insulina sulla linea cellulare β pancreatica murina MIN6 e dei parametri metabolici *in vivo*.

Come dettagliatamente indicato nei capitoli seguenti, molto interessanti sono stati i risultati ottenuti. È stato possibile, infatti, caratterizzare sotto il profilo fitochimico differenti estratti e oli essenziali di Cedro, che hanno mostrato interessanti risultati nella valutazione dell'attività antiossidante, antiinfiammatoria e neuroprotettiva.

Tra tutti, si segnala poi l'estratto dell'epicarpo dei frutti maturi di Cedro, per l'ottima attività ipoglicemizzante *in vitro* e *in vivo*.

I risultati cui si è pervenuti confermano l'ipotesi iniziale del progetto di ricerca secondo cui gli estratti e gli oli essenziali di Cedro possano essere impiegati come principi attivi in nuove formulazioni nutraceutiche.

CAPITOLO 1

Il *Citrus medica* L. cv Diamante (Cedro)

1.1. Gli agrumi

Gli agrumi appartengono a diversi generi, di cui i principali sono *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus*. Sono coltivati prevalentemente per la produzione di frutti da destinare al consumo fresco o alla trasformazione industriale, ma anche per scopi ornamentali. Hanno luoghi di origine diversi e quasi sempre ricadenti in una vasta area dell'Asia sud-orientale. Compatibilmente con la loro scarsa resistenza alle basse temperature, si sono diffusi in molte altre parti del mondo, dal bacino del Mediterraneo all'America e al Sudafrica, attraversando la storia delle più grandi civiltà.

In Italia hanno trovato una zona d'elezione nelle regioni meridionali, per il clima mite e per il tipo di terreno. Come piante ornamentali hanno una notevole tradizione in Toscana e nelle regioni dei grandi laghi del Nord, dove è diffusa l'abitudine di costruire, all'interno delle ville, particolari strutture adatte a ospitare gli agrumi nei mesi invernali.

Gli agrumi appartengono alla famiglia delle Rutaceae, sottofamiglia Aurantioideae. La classificazione degli agrumi ha impegnato a lungo i tassonomi a causa della presenza di individui derivati da ibridazione naturale considerati da alcuni come specie a se stanti. Dell'origine di questi ibridi naturali si è persa ogni traccia, mentre di quelli ottenuti in epoca più recente si conoscono più o meno bene le specie d'origine. Il genere *Citrus* è sicuramente il più importante.

1.1.1. Caratteri morfobiologici

Si tratta di piante arboree sempreverdi, in forma di alberi o arbusti, quasi sempre munite di spine, che possono variare notevolmente in altezza a seconda della specie e del tipo di coltivazione, con un minimo di circa 1 m fino ad arrivare a un massimo di oltre 9 m di altezza.

Le foglie costituiscono una delle prime ragioni delle caratteristiche ornamentali di questa famiglia, in quanto sono molto lucenti e ricche di sostanze oleose aromatiche. Persistono sulla pianta oltre due anni, sono generalmente spiravate, oppure opposte, e

prive di stipole. Il colore delle foglie è variabile dal verde scuro delle più anziane sino a verde giallastro per le giovani foglie poste all'apice dei germogli.

I fiori (zagare), di colore generalmente bianco, sono ermafroditi con corolla costituita per lo più da cinque petali. L'apparato maschile è formato da due verticilli di quattro-cinque stami (nel genere *Citrus* sono saldati lateralmente per i filamenti e disposti in gruppi, arrivando fino a 25-40 stami); l'apparato femminile ha in genere cinque carpelli (più raramente quattro), uniti in un ovario supero diviso in cinque-dieci logge.

Il frutto è più spesso una bacca, ma può anche essere una drupa o una capsula. Il genere *Citrus* ha come frutto una bacca, detta esperidio, caratterizzata da un epicarpo o esocarpo (la parte esterna) di notevole spessore, colorato e ricco di ghiandole contenenti olio essenziale, denominato flavedo. Il mesocarpo, parte interna saldata all'epicarpo, è bianco e spugnoso ed è definito albedo. L'endocarpo, la parte più interna, è suddiviso in logge (spicchi) per mezzo di sottili membrane; all'interno si trovano cellule, le vescicole, ripiene di una soluzione acquosa di zuccheri e acidi. Entro ogni loggia si possono riscontrare da 4 a 8 ovuli i quali possono o meno originare altrettanti semi (Purseglove, 1974).

I semi, di colore biancastro, di forma ovoidale, contengono, in genere, più embrioni, di cui uno ha avuto origine dalla fecondazione, mentre i restanti sono apodittici e, pertanto, con patrimonio cromosomico identico a quello della pianta madre. L'epoca di fioritura è alquanto variabile andando da febbraio-marzo all'estate; parimenti varia l'epoca di maturazione che va dall'autunno alla primavera dell'anno successivo. Gli agrumi hanno una certa attitudine alla rifiorescenza.

1.1.2. Esigenze pedoclimatiche

Essendo piante di origine tropicale, hanno particolari esigenze nei confronti del clima; per ottenere, infatti, una produzione commerciale valida occorre che questo sia caldo, sufficientemente umido, con inverni miti e senza ampie escursioni termiche, anche se una moderata presenza di queste ultime consente nelle zone mediterranee la comparsa di pigmenti antocianici e carotenoidi, responsabili del colore, cosa che risulta impossibile, proprio per la loro assenza, nelle aree tropicali di origine.

In genere svolgono la loro attività vegetativa a temperature comprese tra i 13 e i 30 °C. Relativamente al freddo, sono danneggiati da temperature inferiori a 0 °C con intensità variabile in relazione alla specie e alla varietà. Dannose risultano anche le temperature superiori ai 38 °C, soprattutto in coincidenza di condizioni di bassa umidità relativa (Jifon and Syvertsen, 2001).

La presenza di venti forti e persistenti può provocare gravi danni alle colture di agrumi (disseccamento delle foglie e dei giovani germogli, rotture meccaniche di rami, ferite da sfregamenti sugli stessi frutti). Per ovviare a tali inconvenienti si ricorre spesso ai frangivento.

1.1.3. Raccolta e conservazione dei frutti

La raccolta va eseguita quando i frutti hanno raggiunto un grado di maturazione sufficiente: al contrario di altre specie, infatti, la maggior parte degli agrumi non può completare la maturazione dopo che i frutti sono stati staccati dall'albero.

Il momento della raccolta è determinante per la quantità totale della produzione, ma anche per la possibilità di selezionare, confezionare e conservare il prodotto, mantenendone intatte le qualità organolettiche.

La raccolta è attuata sia da terra sia con scale e i frutti, raccolti con l'ausilio di apposite forbici, per non privarli della rosetta, vengono posti in cesti di plastica o nei cesti a sacco e successivamente in cassette di plastica del contenuto medio di 20-22 kg.

Le cassette, poi, vengono portate ai bordi degli appezzamenti ed accatastate sui pallets o caricate direttamente sui mezzi di trasporto e da qui trasferite ai magazzini di lavorazione e/o di conservazione. Una volta che il prodotto è arrivato al magazzino, questo subisce una lavorazione consistente in: lavaggio, trattamento anticrittogamico, ceratura, selezione, calibratura e confezione. A tali operazioni possono, poi, esserne aggiunte altre, in dipendenza della specie e della destinazione del prodotto, così come alcune di esse possono essere eliminate. La conservazione dei frutti, che deve essere preceduta da un'efficace lotta preventiva contro le alterazioni di post-raccolta, può essere eseguita in atmosfera normale o controllata. Un'operazione tipica degli agrumi è la "deverdizzazione", che scaturisce dal fatto che i frutti di alcune specie e varietà, pur commercialmente maturi, non hanno perso

completamente il colore verde della buccia, e riguarda i limoni autunnali, le arance tardive, i mandarini, le clementine e i satsuma.

Oltre che per il consumo fresco, gli agrumi possono essere utilizzati nell'industria, per la produzione di oli essenziali, succhi, scorze in salamoia e candite, confetture, olio di semi, vino e aceto, paste aromatizzanti, alcool industriale, mangimi zootecnici, pectine e acido citrico.

1.1.4. Norme di qualità degli agrumi

Definizione dei prodotti

La presente norma (Regolamento CE N.1799/01 della Commissione del 12 settembre 2001) si applica ai seguenti frutti classificati sotto la denominazione "agrumi", destinati a essere forniti allo stato fresco al consumatore, esclusi quelli destinati alla trasformazione industriale:

- Limoni delle varietà (cultivar) derivate dalle specie *Citrus lemon* (L.) Burm. f.;
- Mandarini delle varietà (cultivar) derivate dalla specie *Citrus reticulata* Blanco, compresi i satsuma (*Citrus unshiu* Marcow.), le clementine (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.), i mandarini comuni (*Citrus deliziosa* Ten.) e i tangerini (*Citrus tangerina* Hort. ex Tan.) derivati da queste specie e dai loro ibridi, in seguito denominati "mandarini";
- Arance delle varietà (cultivar) derivate dalla specie *Citrus sinensis* L. Osb.

Caratteristiche qualitative

La norma ha lo scopo di definire le caratteristiche qualitative che gli agrumi devono presentare dopo il condizionamento e l'imballaggio, all'atto dell'immissione del prodotto nel circuito commerciale.

1) Caratteristiche minime

Per tutte le categorie gli agrumi devono essere: interi; privi di ammaccature e/o lesioni cicatrizzate estese; sani (sono esclusi i prodotti affetti da marciume o che presentino alterazioni tali da renderli inadatti al consumo); puliti, praticamente privi di sostanze estranee visibili; esenti da parassiti e da attacchi parassitari; esenti dall'inizio di asciutto

all'interno; esenti da danni e/o alterazioni esterne dovuti al gelo; privi di umidità esterna anormale; privi di odore e/o sapore estranei; privi di additivi di qualsiasi natura.

Gli agrumi devono essere stati raccolti con cura e aver raggiunto un adeguato grado di sviluppo e di maturazione rispondente alle caratteristiche proprie della varietà, dell'epoca di raccolta e della zona di produzione.

Lo sviluppo e il grado di maturazione degli agrumi devono essere tali da consentire: il trasporto e le operazioni connesse e l'arrivo al luogo di destinazione in condizioni soddisfacenti.

2) *Requisiti di maturazione*

La maturità degli agrumi è definita dal contenuto minimo di succo e dalla colorazione.

3) *Classificazione*

Gli agrumi sono suddivisi in tre categorie:

Categoria "Extra". L'agrumo di questa categoria deve essere di qualità superiore. La forma, l'aspetto esteriore, lo sviluppo e la colorazione devono presentare le caratteristiche della varietà. Deve essere privo di difetti, fatti salvi leggerissimi difetti superficiali purché non pregiudichino la qualità, l'aspetto generale del prodotto o la presentazione dell'imballaggio.

Categoria "I". L'agrumo di questa categoria deve essere di buona qualità. Deve presentare le caratteristiche tipiche della varietà o del tipo, tenuto conto dell'epoca di raccolta e delle zone di produzione: lieve difetto di forma; lieve difetto di colorazione; lievi difetti dell'epidermide congeniti alla formazione del frutto, ad esempio rameggiatura argentata, rugginosità, ecc.; lievi difetti cicatrizzati dovuti a cause meccaniche, ad esempio grandine, sfregamento, urti durante la manipolazione, ecc.

Categoria "II". Questa categoria comprende l'agrumo che non può essere classificato nelle categorie superiori, ma che soddisfa le caratteristiche minime di qualità. Sono ammessi tuttavia i difetti seguenti, purché non pregiudichino l'aspetto generale e la conservazione dei frutti: difetto di forma; difetto di colorazione; rugosità della buccia; alterazioni superficiali e cicatrizzate dell'epidermide.

1.2. Specie e varietà

Le specie di agrumi che rivestono maggiore importanza appartengono al genere *Citrus* e sono: *Citrus lemon* (Limone), *C. medica* (Cedro), *C. aurantium* (Arancio amaro), *C. sinensis* (Arancio dolce), *C. reticulata* (mandarino), *Citrus paradisi* (pompelmo), *C. grandis* (pummelo), *C. aurantifolia* (limetta).

***Citrus lemon* (Limone)**

Il Limone è il più importante frutto acidulo sia per il consumo diretto sia per la lavorazione industriale. Per quanto l'albero sia molto sensibile al gelo, può essere coltivato in aree marginali poiché l'acidità e la succosità sono raggiunte anche se la stagione della maturazione è relativamente fresca.

Alcune varietà (Eureka, Cosmopolita, Femminello e Monachello, in Italia) sono molte volte rifiorenti e per questo sono importanti per equilibrare la produzione in stagioni diverse. Altre varietà (Lisbona, Cosmopolita, Bernia, Spagna; Interdonato, Italia) sono in gran parte invernali come tutti gli altri agrumi. L'acidità dei limoni è tra il 5 e il 7% (per lo più acido citrico). Le sue virtù aromatiche e salutari lo rendono adatto ai mille usi culinari e terapeutici. Il succo contiene vitamina A e soprattutto vitamina C. Oltre all'apporto importante di vitamina C, il succo di limone, fornendo zucchero, acido citrico e citrati facilmente assimilabili, costituisce un prezioso "carburante" per l'organismo. I benefici del succo di limone, per uso interno, sono dati dalla sua abbondante quantità di acido citrico, che lo rende utile nel trattamento del diabete, nel reumatismo articolare e nell'ipertensione; ma è pure efficace nell'allergia, nel mal di mare, nelle palpitazioni nervose e, persino, come disinfettante, è un ottimo febbrifugo, cardiotonico, diuretico, antisclerotico, depurativo, antianemico ed emostatico.

***Citrus medica* (Cedro)**

È ritenuta una delle tre specie di agrumi da cui derivano tutti i *Citrus* oggi conosciuti, assieme al pummelo e al mandarino. Il Cedro è impiegato nell'industria alimentare per la preparazione di bibite e frutta candita e nell'industria farmaceutica per la produzione di olio essenziale. A differenza di tutti gli altri agrumi, possiede un albedo commestibile e molto succoso.

***Citrus aurantifolia* (Limetta)**

Conosciuta anche come lime, è probabilmente un ibrido tra il cedro e il limone, ma gli esperti non sono tutti d'accordo sulla sua origine. Prevale, comunque, l'opinione che la limetta sia stata ottenuta con ibridazioni ripetute tra vari *Citrus* e forse anche con *Fortunelle*, fino al raggiungimento di questo frutto dalle caratteristiche peculiari durature nel tempo che hanno permesso di annoverarlo come specie a sé stante nel genere dei *Citrus*. Coltivata principalmente nelle zone tropicali e subtropicali, a causa della sua sensibilità al freddo. Le limette sono frutti di piccole dimensioni, coltivati principalmente in Messico, India ed Egitto. I frutti delle varietà ibride sono più grossi e gli alberi soffrono meno il freddo (Persiano o Thaiti, Bearss senza semi). La limetta è molto acida e viene usata nella preparazione di succhi. La limetta è coltivata soprattutto per la produzione dell'olio essenziale. L'essenza è, infatti, molto simile a quella del limone ed è molto apprezzata nell'industria dei profumi e dei detergenti, ma il maggior impiego è riservato all'industria alimentare per la produzione di bibite analcoliche.

***Citrus grandis* (Pummelo)**

E' coltivato per scopi commerciali soltanto in Thailandia e nelle aree circostanti. Di nessuna applicazione commerciale nell'industria, tranne che nella preparazione di marmellata casalinga.

***Citrus paradisi* (Pompelmo)**

E' un albero da frutto il cui nome comune *pompelmo* si può riferire tanto alla pianta quanto al suo frutto. E' un antico ibrido, probabilmente tra il mandarino e il pummelo, ma da secoli costituisce specie autonoma che si propaga per talea e per innesto. Questa specie relativamente nuova è diventata di grande importanza sia nell'industria sia per il consumo come frutto fresco. Nel primo caso è utilizzato nella produzione di succhi e nella conservazione degli spicchi in scatola.

La varietà principale, coltivata in tutto il mondo, il Marsh, si presta molto ai suddetti scopi grazie al favore universalmente riscosso, alle rese elevate, al sapore gradevole e alla mancanza di semi. Nel Texas e nella Florida si coltivano le varietà rosate (Thompson e Redblush).

Il pompelmo fa parte del gruppo degli agrumi, e nonostante non possieda tutte le virtù del limone, è un frutto molto utile, poiché è un frutto molto rinfrescante nel periodo estivo, e un buon antidoto delle malattie da raffreddamento durante la stagione fredda. Questo frutto è scarsamente calorico, ma nello stesso tempo ricco di proteine, zuccheri, sali minerali quali sodio, potassio, zolfo, calcio, magnesio, ferro, fosforo, cloro, acido citrico e vitamine B1 e C. Con il succo di pompelmo si possono preparare bevande gradevoli e salutari, in particolare un ottimo sciroppo adatto a calmare la sete dei febbricitanti e per i sofferenti di artrite.

***Citrus aurantium* (Arancio amaro)**

Il frutto è usato principalmente nella produzione di marmellata amara; dalle foglie e dai fiori è estratto l'olio essenziale.

***Citrus sinensis* (Arancio dolce)**

E' l'agrume commestibile di maggiore importanza. Le varietà hanno in genere un duplice scopo, poiché in molti casi il frutto che non possa essere venduto fresco è conservato. Le arance sono suddivise in: arancia comune, arancia pigmentata e navel. Al primo gruppo appartengono: Salustiana, Cadenera, Comune e Bernia di Spagna, Biondo e Ovale dell'Italia, Hamlin e Pineapple della Florida, Pera del Brasile, Shamouti (Jaffa) di Israele, Valencia (cosmopolita). Le varietà Pineapple e Valencia sono particolarmente adatte per la conservazione. Il secondo gruppo comprende l'arancia sanguigna, siciliana e spagnola, la cui lavorazione presenta qualche difficoltà in quanto non è facile mantenere un soddisfacente colore del succo.

Il terzo gruppo comprende il Washington Navel e varietà affini, la cui coltura si estende a tutte le zone agrumarie perché questo è un ottimo frutto da consumare fresco, ma poco adatto alla conservazione a causa del sapore amarognolo che nel tempo sviluppa.

***Citrus reticulata* (Mandarino)**

È uno dei tre agrumi originali genere assieme al cedro ed al pummelo. Di questo frutto esistono diverse varietà. I mandarini essendo frutti delicati mal sopportano il trasporto e il magazzinamento; sono, difatti, per lo più consumati freschi. I mandarini

giapponesi, utilizzati molto nella preparazione degli spicchi in scatola, sono principalmente del tipo satsuma. In Florida sono conservati soprattutto i tangerini, ad esempio della varietà Dancy. Il tangerino è il *C. reticulata* vero e proprio. Altri mandarini sono coltivati nel Bacino del Mediterraneo, e per lo più consumati freschi; questi sono della varietà a foglia lanceolata di colore biondo (classificato anche come *C. deliciosa* Tenore). Infine, per completare questo gruppo, bisogna far cenno agli ibridi. Gli ibridi di arancia dolce e mandarino comprendono clementine e tempie, di colore arancio cupo, entrambi di grande importanza. In Florida si coltivano gli ibridi di mandarino-pompelmo (tangelos). I mandarini sono comunemente consumati come frutta fresca o lavorati nella produzione di marmellate e frutta candita. Dalla buccia si estrae l'olio essenziale.

***Citrus bergamia* (Bergamotto)**

La sua zona di produzione è prevalentemente limitata alla zona fonica costiera della provincia di Reggio Calabria, a tal punto da diventarne un simbolo dell'intera zona e della città. È qui uno dei suoi migliori habitat, in nessun'altra parte del mondo vi è un luogo in cui questo agrume fruttifichi con la stessa resa e qualità di essenza; è infatti coltivato in Costa d'Avorio, Argentina, Brasile, ma la qualità dell'essenza ottenuta è di scarso valore e non comparabile con l'essenza prodotta dai bergamotti di Reggio Calabria. Predilige i terreni argilloso-calcarei e alluvionali. Il suo succo somiglia in qualche modo a quello del limone, ma ha un aroma sostanzialmente differente e caratteristico, è molto amaro per la presenza di naringina. Viene coltivato in tre varietà: *Feniminello*, *Castagnaro* e *Fantastico*. È utilizzato in aromaterapia, cosmetologia e profumeria grazie al suo olio essenziale (ricco in acetato di linalile, limonene, linalolo, bergaptene). Ha proprietà antisettiche, cicatrizzanti, combatte l'acne ed è usato contro gli stati depressivi.

1.3. Struttura degli agrumi

Gli agrumi hanno una struttura complessa, da frutti superiori quali sono. Indipendentemente dal fatto che si tratti di arance, mandarini, limoni o pompelmi, tutti gli agrumi sono simili tranne che per dimensioni e forma. I limoni sono, generalmente, oblungi con l'asse maggiore dalla parte del picciolo; i mandarini sono schiacciati ai

poli ed hanno l'asse maggiore sul piano equatoriale mentre la maggior parte delle arance tende a essere rotonda. Diverse sono pure le dimensioni, normalmente espresse sulla base del diametro equatoriale dei frutti. Le differenze nelle dimensioni, non solo tra specie differenti ma anche nell'ambito della stessa specie, richiedono specifiche attrezzature per trasformare nel modo corretto la frutta e richiedono in molti casi dei procedimenti preliminari per dividere la frutta in range di calibri.

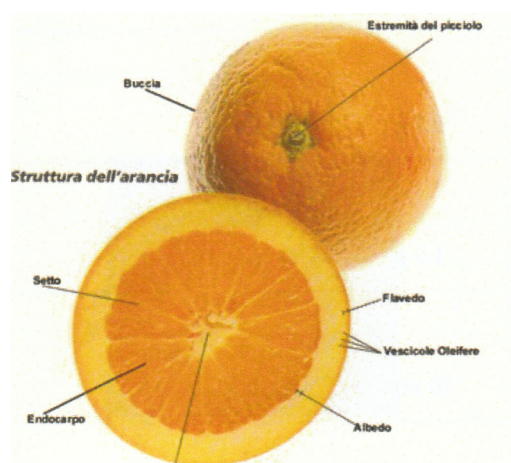


Figura 1.1. Struttura di un agrume.

Le bucce sono costituite da un'epidermide formata da cere epicuticolari a forma di piastrine. La quantità di cere dipende dalla varietà, dalle condizioni climatiche e da quelle di crescita. Questo strato di solito ospita una microflora formata prevalentemente da funghi e da batteri, più abbondante nei climi umidi. Ciò rende conto della necessità di provvedere a un opportuno lavaggio della frutta prima dei procedimenti di estrazione del succo e delle essenze, per minimizzare la contaminazione proveniente dalla superficie dei frutti. Immediatamente sotto l'epidermide si trova il flavedo di colore giallo, verde o arancio. Nel flavedo sono localizzate le vescicole oleifere che sono caratterizzate da pareti molto sottili e fragili; dentro di esse l'olio essenziale è contenuto con una pressione positiva; ciò permette il suo recupero per abrasione dello strato di flavedo. Il costituente successivo è l'albedo, formato da cellule a struttura tubolare, che formano una vera e propria rete con la maggior parte del volume tissutale compreso nello spazio intercellulare.

Lo spessore dell'albedo varia con il tipo di agrumi e con le cultivar. Ciò rende necessaria la possibilità di poter regolare gli estrattori per compensare lo spessore dello strato di albedo, soprattutto quando si desidera la migliore qualità possibile.

Segue l'endocarpo dei frutti con i carpelli entro i quali si trovano le vescicole contenenti il succo, che, da un punto di vista biosintetico, andrebbe considerato come il liquido rilasciato dal citoplasma e dai vacuoli delle cellule interne entro le vescicole. La parte più interna del frutto (core) è formata da un tessuto spugnoso simile a quello dell'albedo. Il flavedo è costituito principalmente da materiale celluloso e contiene altri componenti quali:

- ✓ oli essenziali (terpeni, sesquiterpeni alifatici e derivati ossigenati, terpeni e sesquiterpeni biciclici, composti alifatici non terpenici, idrocarburi aromatici, esteri contenenti azoto);
- ✓ costituenti del residuo non volatile dell'olio essenziale (cere paraffiniche, steroidi e triterpenoidi, acidi grassi, cumarine, psoraleni e flavoni);
- ✓ componenti accessori (pigmenti come carotenoidi, clorofille, flavonoidi, principi amari come la limonina, enzimi).

L'albedo risulta anch'esso costituito principalmente da materiale celluloso oltre che da: sostanze pectiche (pectina, protopectina, acido pectico, acidi pectinici), componenti accessori (principi amari, enzimi).

La struttura della polpa è costituita da materiale celluloso, mentre il succo contiene: carboidrati (mono e disaccaridi); acidi organici (acido citrico e malico); costituenti azotati (proteine, peptidi, amminoacidi); costituenti inorganici (ceneri); vitamine (vitamina C); lipidi; aromi volatili (alcol etilico, acetone, acetaldeide, acido formico, etc.); pigmenti (carotenoidi, clorofille, flavonoidi).

I semi sono costituiti da materiale celluloso con presenza di: proteine grezze e oli.

La composizione del mix terpenico varia in funzione della tipologia di agrume presa in esame e del genere e specie cui appartiene. Comunque, il mix di ciascuna tipologia risulta principalmente composto, in proporzioni diverse, da: limonene, pinene, mircene, linalolo, terpinene, acetato di linalile (nel bergamotto).

L'incidenza percentuale delle varie parti che costituiscono il frutto varia anch'essa in funzione della tipologia di agrume.

La resa in succo dipende, oltre che dalla specie e dalla varietà, dal grado di maturazione, dalle pratiche colturali, da fattori metereologici e dal sistema di estrazione.

In base alle attuali esperienze industriali, oltre il 60% in peso degli agrumi inviati alla trasformazione industriale per la produzione di succhi è trasformata in una miscela di residui (bucce, parte della polpa, semi) denominata “pastazzo”. Essi possono essere utilizzati allo stato fresco (es. per l'alimentazione animale) o essiccati.

1.4. Composizione chimica degli agrumi

Gli idrati di carbonio rappresentano la parte predominante dei solidi solubili degli agrumi, in forma sia di zuccheri sia di polisaccaridi. I solidi solubili nei succhi citrici sono mediamente costituiti da un 70% di zuccheri mentre i solidi della polpa sono formati da un 40% di zuccheri e da un 50% di polisaccaridi. L'aroma dei succhi è dovuto alla miscela di zuccheri, acidi e componenti aromatici specifici, alcuni delle quali sono glicosidi. Il colore dei frutti può esser dovuto a pigmenti contenenti zuccheri come gli antociani (antocianidine glicosidate) e il tessuto è controllato da polimeri a struttura di carboidrati.

Tra i monosaccaridi, i componenti fondamentali sono glucosio e fruttosio. Il galattosio si trova soltanto nei glicosidi fenolici e nei polisaccaridi; il mannosio è presente come componente dei polisaccaridi. Non si ritrovano pentosi liberi, ma soltanto come componenti di emicellulose e polisaccaridi. Lo stesso è vero per i 6-deossialdoesosi che si ritrovano, come ramnosio e fucosio, come costituenti delle sostanze pectiche. Per quanto concerne gli oligosaccaridi, il saccarosio è l'unico davvero rappresentativo negli agrumi. Nell'ambito dei polisaccaridi, l'emicellulosa degli agrumi è costituita da dilani, arabinani e galattani, mentre le sostanze pectiche sono fondamentalmente galatturonani.

Le sostanze pectiche sono il gruppo più importante di carboidrati poliuronidi degli agrumi. Esse sono costituite fondamentalmente da unità di acido alfa-*D*-galatturonico con legame (1-4) in catene estese; i gruppi carbossilici sono parzialmente o completamente salificati da cationi e alcuni possono essere esterificati con metanolo. Le sostanze pectiche possono essere classificate come:

Protopectina: rappresenta quella parte delle sostanze pectiche insolubile in acqua e che per idrolisi fornisce pectina o acidi pectinici.

Acidi Pectinici: sono acidi poligalatturonici colloidali contenenti alcuni gruppi metilestere; gli acidi pectinici sono, in alcune condizioni, capaci di formare gelatine con zuccheri e acidi e, se il tenore in metossili è sufficientemente basso, anche con certi ioni metallici.

Pectina: è quella parte di acidi pectinici idrosolubile a vario grado di etossilazione e neutralizzazione capace di formare gelatine con zuccheri e acidi.

Acidi Pectici: sono composti da acido poligalatturonico colloidale essenzialmente libero da gruppi metilestere.

Gli acidi pectinici, la parte più utilizzata delle sostanze pectiche per il loro potere gelificante, sono divisi in due gruppi di pectine: quelle ad alto metossile e quelle a basso metossile. Le prime contengono oltre il 7% di metossili e gelatinizzano in presenza di zuccheri e acidi; le seconde contengono dal 3 al 7% di metossili e formano gel stabili con piccole quantità di cationi polivalenti come il calcio, senza acidi e solidi solubili addizionali. Il potere gelificante delle pectine varia in funzione del frutto di origine, del sistema di estrazione e del grado di maturazione della frutta. Esso è descritto come la proporzione di zuccheri che una parte di pectina solida è capace di trasformare, in determinate condizioni, in gelatine di certe caratteristiche. Tra tutti gli agrumi la pectina migliore si ricava, certamente, dai limoni.

Per tutte le pectine, la viscosità dipende dalla concentrazione, dal pH, dalla dimensione della catena di acido poligalatturonico e dalla temperatura. Il grado di polimerizzazione e il contenuto di metossili influenzano il potere gelificante.

Le caratteristiche della pectina variano con il grado di maturazione dei frutti; questo è sempre necessario tenere conto durante i processi di lavorazione nel succo e di altri sottoprodotti per prevenire comportamenti anomali dei prodotti a causa della mancata razionalizzazione di alcuni dei parametri di processo.

In generale, durante il ciclo di maturazione, la proto pectina insolubile si trasforma in pectina idrosolubile e in pectinati, quindi, con l'ulteriore maturazione, questi prodotti sono convertiti in pectina a basso grado e in pectati insolubili (sovraturazione).

I cambiamenti della struttura delle pectine possono essere sia chimici sia enzimatici; solo due enzimi sono importanti per le trasformazioni della pectina degli agrumi: la

Pectinmetilesterasi (PE), enzima capace di demetossilare la pectina, e la Poligalatturonasi (PG), enzima capace di scindere le catene pectiche. Di questi due enzimi solo la PE è naturalmente presente negli agrumi; la PG viene utilizzata, come coadiuvante tecnologico, per diminuire la viscosità in determinati prodotti agrumari. La PE rappresenta un fattore importante di cui tenere conto durante la produzione di derivati agrumari. La sua capacità di demetossilare la pectina provoca grandi aumenti di viscosità di cui tenere conto durante la produzione di succhi concentrati per evitare la gelificazione del prodotto; inoltre l'azione dell'enzima si riflette anche in una instabilità e su una diminuita torbidezza del prodotto (Ingallinera *et al.*, 2005). Le pectine, infatti, sono gli stabilizzanti colloidali naturali, che danno ai succhi citrici quello che è normalmente definito come "corpo". Se questo è alterato dall'attività pectinesterasica, si verifica la chiarificazione del succo con relativa precipitazione del materiale colloidale sospeso.

Nell'ambito della composizione chimica degli agrumi, gli acidi organici giocano un ruolo importante nella crescita dei frutti e nella produzione e commercializzazione dei derivati. L'acidità totale, insieme con il contenuto zuccherino, è un importante criterio per valutare la maturazione nelle arance e nei pompelmi, mentre per il succo di limone rappresenta il fattore primario per la definizione del prezzo. L'acidità, poi, è anche un punto critico per quanto riguarda i criteri di accettazione dei consumatori; sarebbe, infatti, impossibile commercializzare un succo di arancia che avesse l'acidità di quello di pompelmo.

Gli acidi organici contenuti negli agrumi sono, in primo luogo, l'acido citrico e l'acido malico, che da soli rendono conto quasi di tutta l'acidità totale; l'acido isocitrico è contenuto in piccola concentrazione, mentre sono presenti tracce di acido ossalico, succinico, malonico, chinico, tartarico, adipico, 2-chetoglutarico e benzoico.

L'acidità totale differisce grandemente tra le varie specie e anche nelle diverse varietà della stessa specie, anche in funzione delle caratteristiche climatiche dell'area di crescita. I succhi di arancia mediterranei sono, in genere, più acidi di quelli prodotti negli USA, in Brasile o a Cuba. Gli acidi organici, infine, sono localizzati essenzialmente nel succo e sono contenuti in bassa concentrazione nelle altre parti della frutta.

I componenti azotati degli agrumi sono contenuti in concentrazione piuttosto bassa, ma sono da considerare importanti soprattutto per una valutazione delle caratteristiche di purezza dei succhi. Nell'ambito delle sostanze azotate, i componenti senza dubbio più importanti sono gli amminoacidi liberi che rappresentano circa il 70% delle sostanze azotate totali. Nei succhi di agrumi si ritrovano praticamente tutti gli amminoacidi importanti con l'unica eccezione del triptofano. Tra gli amminoacidi più abbondanti sono la prolina, l'asparagina, l'acido aspartico, la serina, l'acido glutammico, il gamma-amminobutirrico e l'arginina. Il contenuto in proteine degli agrumi è, invece, piuttosto basso; esse sono costituite prevalentemente da enzimi.

Sono state riportate diverse categorie di enzimi presenti naturalmente negli agrumi: ossidoreduttasi, transferasi, idrolasi, liasi, isomerasi e ligasi. Infine i contenuti di basi azotate, di ribonucleotidi ed acidi nucleici sono estremamente bassi.

I componenti lipidici degli agrumi possono essere distinti in tre classi: non polari, polari non ionici e polari ionici. Tra ilipidi non polari ricordiamo aldeidi, chetoni e alcoli a lunga catena, i carotenoidi e i loro esteri, gli esteri delle cere e alcuni trigliceridi. I lipidi polari non ionici sono lipidi contenenti zuccheri, quali glicosilgliceridi, mentre i polari ionici contengono gruppi funzionali reattivi quali il carbossilico, l'amminico o il fosforico; fanno parte di questa classe gli acidi grassi liberi o l'acido fosfatidico.

Nonostante il basso contenuto, la frazione lipidica ha una sua importanza per diversi fattori. Per esempio, alcune ricerche hanno dimostrato che i lipidi sono una delle cause dello sviluppo di "off-flavours" durante l'immagazzinamento dei succhi. Si pensa che siano proprio essi che sottostando a cambiamenti ossidativi sviluppano idrossiacidi e altri prodotti di decomposizione.

Riguardo alla frazione lipidica non si può non citare uno dei possibili sottoprodotti della trasformazione degli agrumi in derivati, e cioè l'olio dei loro semi.

Un'efficiente utilizzazione dei semi di agrumi è stata sempre ostacolata dalla difficoltà di separazione delle scorze, dei carpelli e della polpa; va inoltre considerato che un singolo impianto agrumario non può trattare in modo economicamente valido soltanto i propri semi per cui si dovrebbe pensare ad un impianto centrale che lavori i semi di molti stabilimenti agrumari. I semi di

agrumi secchi contengono dal 28 al 35% di olio che, non raffinato, ha un colore giallo pallido e un odore che ricorda le mandorle.

L'olio è composto per il 95 % da trigliceridi e da piccole quantità di acidi grassi liberi, idrocarburi, steroli, tocoferoli, fosfolipidi, limonina. La caratteristica chimica più importante dal punto di vista nutrizionale è la distribuzione degli acidi grassi; i sei principali sono l'acido palmitico, palmitoleico, stearico, linoleico, oleico e linolenico. Il rapporto tra acidi insaturi e quelli saturi si situa tra 3 e 5 e ciò lo rende simile all'olio di mais.

I carotenoidi prendono il nome dal rappresentante principale del gruppo, il beta-carotene; sono pigmenti molto diffusi in natura responsabili di colori brillanti che vanno dal giallo pallido al rosso profondo. I carotenoidi sono tetraterpeni formati dalla giunzione di otto catene isopreniche. Da questa struttura base si possono far derivare tutti i carotenoidi per idrogenazione, ciclizzazione, ossidazione o combinazioni di questi processi. Dal punto di vista della classificazione possono essere distinti in carotenoidi idrocarburici $C_{40}H_{56}$ e i loro derivati ossigenati, xantofille, che contengono gruppi epossidici (5,6 e 5,8 epossidi), idrossilici (monoli, dioli e polioli), etonici, metossilici e carbossilici; altri gruppi sono i carotenoidi aromatici, quelli allenici e acetilenici. Un'altra classificazione divide i carotenoidi in monociclici e aliciclici.

Una delle funzioni fisiologiche più importanti dei carotenoidi è di agire come precursori della vitamina A negli organismi animali. Quasi tutte le specie animali sono in grado di convertire enzimaticamente i carotenoidi vegetali di una certa struttura in vitamina A. Il beta-carotene, la provitamina più abbondante, fornisce due molecole di vitamina A, gli altri carotenoidi con attività provitaminica, sono caratterizzati dal fatto di possedere un anello beta-iononico intatto in una delle parti terminali della molecola, come per esempio l'alfa e il gamma-carotene, i 5,6 e i 5,8 monoepossiderivati del beta-carotene, la cripto xantina e i suoi monopossiderivati, gli apocarotenali.

I carotenoidi sono solitamente utilizzati come coloranti alimentari e come pigmenti; quelli naturali sono stati di recente soppiantati dai più economici carotenoidi sintetici.

I carotenoidi negli agrumi sono localizzati in plastidi presenti sia nel flavedo (contenente circa il 70% del totale nel frutto), sia nelle vescicole che contengono il succo. Quando il frutto è immaturo il loro colore è mascherato clorofilla, con il procedere della maturazione il colore giallo appare in tinte dal giallo pallido all'arancio

intenso a causa delle variazioni nel tipo e nella quantità dei differenti carotenoidi. Le variazioni naturali del contenuto e del tipo di carotenoidi sono grandi e in funzione di cause ambientali, di condizioni di crescita, di variazioni stagionali e del grado di maturazione (Sánchez-Moreno *et al.*, 2003).

Le variazioni compositive quali- quantitative sono diverse nel succo, nella polpa e nel flavedo, inoltre tra le varie specie esiste una differenza dei contenuti percentuali delle varie classi sul totale dei carotenoidi presenti. Per esempio i mandarini sono particolarmente ricchi in criptoxantine rispetto alle arance.

Un'altra classe strutturalmente complessa dei costituenti degli agrumi, è quella dei limonoidi, composti a struttura triterpenica contenenti un anello furanico legato al carbonio C17. Tra tutti i limonoidi, il più noto è la limonina, conosciuta come componente degli agrumi sin dal lontano 1841.

La limonina non è contenuta come tale nei succhi di agrumi; è invece presente l'alfa-lattone dell'acido limonoico, trasformato enzimaticamente in limonina. Nel campo dei derivati agrumari è sorto, quindi, il problema dello "sviluppo ritardato di un sapore amaro", causato proprio dalla limonina.

L'assenza di sapore amaro nel frutto intatto ed il ritardo con cui questo sapore si forma dopo l'estrazione del succo differenzia l'amaro della limonina da quello dei flavanoni neoesperidosidi, quali la naringina del pompelmo. La presenza di questi composti rende amaro anche il frutto intatto e dà anche un immediato sapore amaro al succo appena spremuto. Questi flavanoni non si ritrovano nelle arance dolci, nei mandarini e nei limoni; al contrario la presenza della limonina è pressoché ubiquitaria in tutti gli agrumi anche se, alla maturità, essa può non essere presente in quantità sufficiente a causare il sapore amaro ritardato nel succo.

La limonina rappresenta un problema soprattutto nel Navel, nello Shamouti e nel Biondo Comune. Non c'è modo alcuno di evitare che, una volta che il succo viene estratto, la trasformazione enzimatica proceda. Esiste una relazione diretta tra la percezione del sapore amaro e la concentrazione di limonina nel succo; in generale si può affermare che fino a una concentrazione di 6 ppm non è percepibile l'amaro, tra 6 e 11 ppm il sapore può essere definito leggermente amaro, tra 11 e 18 ppm il sapore è amaro, mentre concentrazioni superiori a 18 ppm portano a un sapore estremamente amaro. E' da notare, comunque, che la soglia di percezione è

estremamente individuale. Sicuramente gli zuccheri e gli acidi contenuti nel succo mascherano in qualche modo l'effetto della limonina; una soluzione acquosa contenente 1 ppm di limonina è, infatti, generalmente considerata amara.

I flavonoidi sono molto abbondanti negli agrumi ed hanno un "pattern" notevolmente complesso. Sono costituiti da flavanoni (inclusi i flavanonoli), flavoni (inclusi i flavonoli) e antocianine. A seconda della presenza o meno di un residuo glicosidico i flavanoni e i flavoni possono essere ulteriormente divisi in O-glicosidi e C-glicosidi.

Le antocianine sono rappresentate, in forma di derivati glicosidici, soltanto nelle arance sanguigne e sono assenti in tutti gli altri agrumi.

I componenti inorganici degli agrumi comprendono le ceneri, cioè quello che rimane dopo che tutti i componenti organici sono stati distrutti con il calore.

La percentuale delle ceneri e la loro composizione dipendono dalle condizioni di crescita (clima durante l'accrescimento dei frutti, tipo di terreno, piovosità) e dalla cultivar, dalle condizioni di salute della pianta e dall'origine geografica. Inoltre, la distribuzione percentuale dei vari costituenti inorganici è dipendente da diversi parametri di lavorazione come la pressione di spremitura, e il controllo della polpa. Gli elementi più rappresentati sono il Potassio, il Fosforo, il Magnesio e il Calcio, mentre a minori concentrazioni sono presenti il Sodio, il Cloro, l'Azoto e il Ferro.

Negli agrumi sono contenute anche vitamine. Oltre alla vitamina C (o acido ascorbico), che è, senz'altro, la vitamina più abbondante (un bicchiere di succo di arancia fornisce il 60% dell'assunzione giornaliera raccomandata), le altre vitamine sono: folacina, vitamina B6, tiamina, riboflavina, biotina, acido pantotenico e composti contenenti attività di tipo vitaminico A (Sánchez-Moreno *et al.*, 2003).

1.5. Il *Citrus medica* L.: caratteristiche botaniche

Il *Citrus medica* L. è un genere di Angiosperme, da non confondere con le omonime Gimnosperme (Cedro del Libano, Cedro dell'Atlante), appartenente alla sottofamiglia delle Aurantoideae, della famiglia delle Rutaceae.

E' ritenuta una delle tre specie di agrumi da cui derivano tutti i *Citrus* oggi conosciuti, insieme al pomelo (*C. maxima* o secondo Linnaeus *C. grandis*) e al mandarino (*C. reticulata*).

Il *C. medica* è un arbusto o piccolo albero sempreverde, di forma irregolare, con crescita disordinata e ramificazione bassa, lento-crescere, che raggiunge i 2.5 – 4.5 metri di altezza. Si presenta di normale vigore, ramificato alla base, di forma più arrotondata di quella assunta dai fusti del limone, con un diametro che dipende dall'età e dalla cultivar. Presenta ramoscelli angolosi e porporini da giovani, poi cilindrici, glabri, dotati di robuste e lunghe spine aculeate, poste alla base delle foglie, che provengono dalla trasformazione delle squame ascellari e che lo differenziano dal limone. Il fusto e i rami sono ricoperti da una caratteristica corteccia di colore grigio scuro, liscia, con leggere, ma altrettanto evidenti screpolature longitudinali.

Caratteristica è la troncatura terminale, che i rami più vecchi presentano alle loro estremità, dovute al fatto che il prolungamento di essi è affidato alle gemme ascellari dell'ultima foglia. Tali gemme ascellari sono protette da lunghe e resistenti spine.



Figura 1.2. L'albero di Cedro.

Il legno del Cedro, a differenza della maggior parte di quello degli altri agrumi, non è molto forte ed elastico, al contrario si presenta come relativamente fragile, per cui mal sopporta i venti. Da ciò la necessità di puntellare con pali i principali rami durante la fase di maturazione dei frutti, periodo in cui la pianta è gravata di ulteriori pesi che

potrebbe non reggere autonomamente. Tuttavia, per queste sue caratteristiche, il tronco del Cedro è usato dagli ebanisti per lavori d'intaglio.

L'apparato radicale si sviluppa dal suolo e, a sviluppo completo, può spingersi oltre la profondità di un metro. E' costituito da un fittone principale, dal quale si dipartono numerose radici avventizie, caratterizzate da un modo di vegetare piuttosto irregolare, connesso con le caratteristiche fisiche del terreno, che deve essere profondo, soffice, mediamente permeabile, in modo che non ci siano ristagni o dispersioni d'acqua (Purseglove, 1968).

Le foglie possono avere forma ovale-lanceolata, ovale-ellittica o ovale a margine dentato, ottuse o arrotondate alle estremità, cuneate o arrotondate alla base. Possono raggiungere i 15-20 cm di lunghezza e gli 8-10 cm di larghezza e, quando si spezzano, diffondono un gradevole odore citrino caratteristico, determinato dalle ghiandole odorifere assai manifeste e fortemente odorose in esse contenute. Sono lisce e presentano una nervatura principale abbastanza pronunciata, che diventa più sottile vicino all'apice. Sono sostenute da un picciolo corto, della lunghezza di 6-7 cm (Pignatti, 2002). Hanno aspetto e consistenza coriacea e presentano una doppia colorazione: di colore verde più intenso e lucido nella pagina superiore e di colore verde più pallido in quella inferiore.

Sono provviste di ghiandole oleifere che, alla più piccola incisione, emanano una fresca essenza agrumata, al pari dei fiori, grandi ed attraenti per gli insetti.

I fiori, presenti in gruppetti terminali da 3 a 30 elementi che formano piccole cime alle ascelle fogliari, sono grandi e, in boccio, rosso-violacei. Possono essere ermafroditi o, più spesso, maschili per aborto del gineceo. I fiori completi forniscono il frutto; quelli unisessuati sono destinati a cadere: ecco perché anche se i grappoli contengono più di 100 fiori, 3 soltanto sono fertili e questi sono per lo più apicali, provvisti di uno stilo grosso e carnoso. Sono composti da un calice gamosepalo a 5 lobi, racchiudente una corolla a 5 petali bianchi e carnosi, dall'interno bianco e l'esterno soffuso viola e da 3 a 30 stami filamentosi, saldati alla base in più fasci, con pistillo semplice con 13-15 logge, con uno stilo ed uno stimma lobato.

L'ovario è largo, curvato, cilindrico, slanciato nello stigma, che è talvolta persistente.

Il Cedro ha una fioritura continua, con flussi principali in primavera ed in autunno.

La fioritura è così distinta:

- 1) fioritura primaverile (marzo-maggio);
- 2) fioritura estiva (giugno);
- 3) fioritura tardiva (settembre).

La principale e più copiosa fioritura è quella estiva, in quanto fornisce il frutto dalla qualità migliore; le altre sono meno importanti perché producono Cedri che non raggiungono la completa maturazione ed assumono forma irregolare, conica e imbutiforme, per cui sono scarsamente commerciabili.



Figura 1.3. I fiori del Cedro.

I frutti provengono dall'evoluzione dell'ovario e sono botanicamente definiti come un tipo particolare di bacca, detta esperidio. Sono fragranti e ricchi di succo. Hanno forma oblunga, ovale o ellissoide, dalla superficie liscia o più spesso rugosa, bernoccolata, frequentemente con un più o meno grosso mammellone conico al peduncolo. Nel pieno sviluppo sono molto grandi, con un peso che può variare dai 500-600 g fino a 1.50-2.0 kg ed una lunghezza media di 20-30 cm.

Possiedono una polpa giallo-pallida o verdastra, non molto succosa, dal sapore acidulo o dolce. Al loro interno sono presenti numerosi semi di piccole dimensioni (9-10 mm x 4-5 mm x 3-4 mm), di colore bianco, lisci, profumati come il frutto, oblungi e appuntiti alla base.

A differenza di quanto avviene per gli altri agrumi, nei quali la poliembrionia è una caratteristica ricorrente, i semi del Cedro sono monoembrionici, cioè sviluppano una sola pianta per seme.

La buccia è molto ruvida, resistente ed eccezionalmente spessa, costituendo fino al 70% del frutto: tolti pure i semi e la pellicola tra gli spicchi, solo un 25-30% del Cedro è edibile. La sua colorazione varia notevolmente a seconda del periodo di maturazione, passando dal verde carico, quando il frutto è acerbo, al giallo dorato del frutto maturo.

Di solito è grezza e irregolare, ma qualche volta può essere liscia.

Con una sezione trasversale del frutto si evidenziano:

- 1) un epicarpo robusto, con funzione di protezione nei confronti della parete interna dell'ovario, ricco di lacune oleifere. Ha un aspetto rugoso, di colore giallo, da cui il nome flavedo, cosparso di depressioni corrispondenti agli orifizi delle ghiandole lisigene, le quali contengono un olio volatile aromatico (essenza) di gusto citrino, gradevolmente penetrante;
- 2) un mesocarpo parenchimoso, che rappresenta la zona intermedia, di colore bianco (albedo) e consistenza spugnosa, generalmente dello spessore di un quarto del diametro trasversale del frutto, ed aderente all'epicarpo, insieme al quale costituisce la buccia o scorza del frutto;
- 3) un endocarpo membranoso, che rappresenta la polpa, suddiviso in logge e spicchi (13-15), tramite una pellicola radiale, abbastanza resistente e spessa. Tali logge non si riuniscono al centro del frutto, dove si trova un tessuto simile all'albedo, ma provvisto di fasci dibro-vascolari, specialmente nella parte prossima all'inserzione pedunculare. Ogni loggia contiene cellule ripiene di succhi aciduli che formano la polpa del succo; contiene inoltre da 1 a 3 semi.



Figura 1.4. Sezione trasversale di un frutto di Cedro.

Le diverse qualità di Cedro esistenti si possono suddividere in tre grandi gruppi organolettici naturali (Ferini *et al.*, 1973; Blondel, 1978):

- a) *Cedri acidi*. Tali Cedri presentano nuovi germogli colorati in rosa, mentre il rivestimento profondo del seme si presenta scuro e la polpa fortemente acida. Ai Cedri acidi appartengono la varietà *Liscia Diamante*, conosciuta anche come Italiana o Calabrese, che è la cultivar più diffusa in Italia e anche la più ricercata dall'industria agro-alimentare nazionale ed estera; la *Limonifera*, varietà greca apprezzata anche nella andatura per le sue caratteristiche morfologiche ed organolettiche simili a quelle della *Liscia Diamante*; la varietà *Policarpa*, anch'essa coltivata in Grecia, di medie dimensioni, forma sub-sferica, che ricorda quella dell'arancia; infine, la varietà *Etrog* o *Cedro dei Giudei*, originaria della Palestina, i cui alberi sono più piccoli e meno vigorosi;
- b) *Cedri semiacidi*. Ai Cedri semiacidi appartengono la varietà *Earle*, coltivata in Portorico e Cuba, la *Digitato* o *Mano di Budda*, originaria delle regioni indo-asiatiche, coltivata a scopo religioso e ornamentale in Indovina, Cina e Giappone, la *Saigon*, coltivata in Marocco e Algeria, la *China*, con piccoli frutti, e la *Ponciro*, tipica della Provenza;
- c) *Cedri dolci*. A questo gruppo appartengono la varietà *Corsicana*, il cui nome deriva dalla Corsica, da dove si è diffusa in Provenza, Spagna meridionale, Florida e California, le varietà *Assads* e *M'Guergueb* di origine marocchina, le quali, però, hanno solo rilevanza locale.

1.6. La coltivazione del Cedro

Il terreno migliore per la coltivazione di questo agrume è quello costituito da argilla calcarea, sabbia e *humus* ricco di azoto e potassio. Per l'impianto di una cedriera bisogna sistemare il terreno, livellandone la superficie e delimitarne le corsie di servizio che consentiranno l'introduzione di mezzi meccanici. Le buche aperte nel terreno, dove verranno inserite le giovani piante, dovranno essere allineate e arricchite di letame stagionato, dopo che le radici delle stesse siano state immerse in una miscela di letame

bovino ed argilla. Nei primi anni di vita è sconsigliata ogni forma di consociazione erbacea, per evitare danni all'apparato radicale.

Una volta impiantato nelle cedriere, il Cedro mal sopporta il freddo e le gelate, per cui sarà necessario costruire dei telai per proteggerlo. Inoltre, le cedriere hanno bisogno di ripari fissi ai lati, quali palizzate in legno, siepi vive, o muri di cinta. Una volta ultimato l'impianto bisogna procedere con zappature, per lo più concentrate in autunno.

Si rimuoverà il terreno spandendovi il letame. Le piante di Cedro vanno sottoposte periodicamente a potatura, in quanto, se lasciate crescere liberamente, si svilupperebbero in una chioma irregolare con rami spinosi che andrebbero ad accavallarsi tra loro, impedendo alla pianta stessa di fruttificare.

È dunque necessario potarle vigorosamente per reciderne i rami non fruttiferi (secchioni), quelli secchi e quelli malati. Inoltre, bisognerà legare le piante affinché il vento non le faccia urtare fra loro e quindi provochi dei graffi sui frutti. La raccolta dei frutti va effettuata in giorno pieno.

Attualmente il Cedro è coltivato soprattutto nell'area mediterranea, in Medio Oriente, in India e in Indonesia, ma anche in Australia, Brasile e negli USA.

In Italia la coltivazione e la lavorazione del Cedro è diffusa in Calabria, nella "Riviera dei Cedri", piccola fascia costiera dell'alto Tirreno cosentino, che va da Diamante a Tortora, da cui proviene tutta o quasi tutta la produzione nazionale e anche europea di tale agrume. Proprio qui, infatti, il Cedro ha trovato un habitat naturale molto favorevole: il particolare microclima che si crea, a detta degli esperti, rende questi terreni pianeggianti contigui alla costa ideali per la coltivazione del prezioso e pregiato agrume.

Il Cedro, per le sue origini di basse latitudini, è l'agrume che mal sopporta il freddo e che più degli altri agrumi ha bisogno di clima mediterraneo, giusto calore e protezione. La sua attività fisiologica si svolge solo al di sopra dei 14 °C e temperature che per alcuni giorni si aggirano intorno ai 4 °C riescono a compromettere la produzione. Pertanto, le cedriere devono essere impiantate laddove la temperatura media annua non si discosta dai 12-15 °C, con medie estive di 23-25 °C e medie invernali di 6-7 °C. Inoltre, la pianta è sensibile all'azione dei venti freddi e pungenti come quelli sciroccosi e soffocanti, i quali producono squilibri fisiologici, deflorazioni, desfogliazioni e rotture dei rami. Per questi motivi, le cedriere sono impiantate di

preferenza in vallate o lungo il corso delle fiumare, non distanti dal mare, protette da canneti o da reti di polietilene. Per tutte queste ragioni l'agrume trova nella "Riviera dei Cedri" il giusto clima e le condizioni favorevoli per la sua coltivazione.

1.7. Le origini del Cedro

Sulla provenienza, la coltivazione e l'uso del Cedro mito e storia si intrecciano tra loro, conferendo a tale frutto un alone di mistero. Ancora oggi, infatti, non si conosce con assoluta certezza la terra primigenia del Cedro, e diverse sono le ipotesi circa la sua provenienza.

Molti botanici indicano, come terra di origine, l'antica Mesopotamia, altri le regioni dei grandi fiumi dell'India o la zona del Nilo o ancora la Media, come lascerebbe supporre il nome "medica"; qualcuno, infine, vede nell'Estremo Oriente la terra di origine di questo frutto, così come di altri agrumi. L'unica certezza è che il Cedro fu il primo agrume ad essere diffuso e coltivato nell'area del Mediterraneo, a cominciare dal III secolo a.C. ad opera delle truppe di Alessandro Magno (356-323 a.C.), che ne favorirono la diffusione dapprima nell'arcipelago greco e poi nel resto del Mediterraneo, nelle grandi isole italiane e successivamente sui lidi napoletani ed in Calabria (Gunther, 1959).

Alcuni studiosi affermarono, però, che furono gli Ebrei a diffonderne la coltivazione prima in Palestina e, poi, in tutte le altre regioni dove emigrarono per sfuggire alle deportazioni. Da sempre il Cedro è, infatti, legato alle tradizioni religiose ebraiche e rappresenta un frutto sacro.

Numerose sono le citazioni del Cedro nella letteratura, nel corso dei secoli e nelle varie epoche fino ai giorni nostri. La citazione più autorevole è quella della Bibbia, in cui il Cedro è citato 70 volte per bocca dei suoi maggiori profeti. La tradizione vuole che sia stato proprio Dio stesso, per bocca di Mosè, dopo la prigionia egiziana, in vista della terra promessa a prescrivere tale ritualità: "*Ora il quindicesimo del settimo mese, quando avrete raccolto i frutti della terra, celebrerete una festa al Signore per sette giorni...*". Teofrasto di Efeso, il principe dei botanici, che visse intorno al 300 a.C., nella sua opera "*Historia Plantarum*" rilasciò la seguente descrizione del "*Melo di Media*" o "*Melo di Persia*", in quelle regioni coltivato, ma non ancora diffuso in Grecia, sottolineando come fosse una pianta molto comune in Persia e nella terra di Medi:

“Questo albero ha foglie simili a quelle del corbezzolo o dell’alloro e spine come il pero ed il biancospino, ma lisce, molto acute e robuste. Il pomo non si mangia, ma è di meraviglioso odore, simile a quello delle foglie...porta poi i frutti in tutte le stagioni e, mentre se ne colgono alcuni, altri sono in fiore ed altri sono prossimi a maturare. I fiori che hanno una specie di rocca nel loro mezzo, sono fertili; quelli privi di tale rocca, sono sterili”.

Virgilio ne *“Le Georgiche”*, ai caratteri forniti da Teofrasto, aggiunge che l’albero è grande e si differenzia dall’alloro per il diverso intenso profumo che sparge intorno, ha foglie persistenti e resistenti allo scrollare dei venti, fiore saldo e tenace, e produce il salutare pomo dai sughi amari ed acri, di cui non vi è rimedio più efficace per scacciare dalle membra gli altri veleni. Parafrasando la descrizione fatta da Teofrasto, descrive, infatti, così il Cedro: *“La Media produce gli umori aciduli ed il sapore persistente del Cedro, frutto così efficace da soccorrerti scacciando dal corpo il veleno micidiale, se una matrigna senza cuore ti infetta le bevande mescolando erbe o formule magiche. L’albero è gigantesco, molto simile all’alloro che, se non emanasse da lontano un profumo diverso, lo diresti tale; le sue foglie non cadono al vento che sia, ed il fiore resiste oltre ogni limite: i medi lo usano contro l’alito cattivo e per curare l’affanno dei vecchi”.*

Un altro riferimento è contenuto in un testo del 200 d.C., il *“Deipnosophistae”* scritto da Ateneo, nel quale si racconta che Juba, re della Mauritania, nella sua *“Storia della Libi”* sostiene che il frutto era chiamato dai Libici *“Pomo dell’Esperia”*. Plinio riporta i caratteri dati da Teofrasto e da Virgilio e riferisce che *“i colluttori fatti con decotto di questo pomo e con il succo spremuto rendono soave la bocca”.*

Plutarco scrive che mangiare la frutta di Media era una vera delizia.

La conoscenza del Cedro è molto antica anche in Italia, dove fece la sua prima apparizione tra il III e il II secolo a.C. ad opera di quegli Ebrei ellenizzanti che sicuramente seguirono gli Achei fondatori delle colonie agricole della Magna Grecia, come Metaponto, Laos, Posidonia, Cuma, Paestum, Sibari e Crotone, introducendo il suo simbolismo anche nel cuore del mondo romano, come attestano i disegni e le inserzioni in greco e latino nelle catacombe ebraiche della via Nomentana e dell’Appia, ai margini della città di Roma, oppure le raffigurazioni del pomo del Cedro, insieme ad altri simboli, quali il ramo di palma, il corno d’ariete e il candelabro a sette braccia,

visibili sull'architrave della Sinagoga di Ostia Antica e risalenti al I secolo a.C. (Cutuli et al., 1985; Lota et al., 1999). Gli antichi romani chiamarono il Cedro in un primo momento "*Malus medica*", quindi "*Citrus*". Il primo riferimento nella letteratura latina risale al II secolo a.C. ad opera di Cloanzio Vero, seguito un secolo più tardi dal botanico oppio che ne parla nel suo libro "*De Silvestris Arboribus*". Fu classificato da Plinio il Vecchio, nella "*Naturalis Historia*", con il nome di "*Mela di Assiria*". A quei tempi il Cedro era usato come repellente per gli insetti nocivi come le zanzare, in maniera analoga alla citronella, ma il suo frutto non era ancora usato come alimento; il suo utilizzo a tale scopo si sarebbe diffuso solo due secoli dopo. Il primo ad impiegarlo in cucina fu, infatti, Apicio, cuoco di Tiberio, che si divertiva a deliziare con pietanze originali il palato esigente dell'Imperatore e dei suoi cortigiani. I Romani, come testimoniano pitture e mosaici rinvenuti a Ercolano e a Pompei, usavano il Cedro in cucina aggiungendolo a pezzetti al loro "*garum*" (una salsa di pesce crudo in salamoia) o a piccanti polpette di maiale, e con le foglie producevano una sorta di liquore. Il legno della pianta era ricercatissimo dagli ebanisti per le sue elegantissime venature che impreziosivano i lavori d'intaglio. Gli affreschi di Pompei ed Ercolano lo riportano dipinto nella magnificenza delle loro mura.

Anche in tempi più recenti il Cedro ha trovato ampio spazio nella letteratura. Nei secoli XI e XII fu la "Scuola Medica Salernitana", fondata da Trotula e pioniera della medicina moderna, ad iniziarne l'impiego nell'ambito farmaceutico ed alimentare, decantandone le efficaci virtù medicamentose del frutto, dei fiori, delle foglie e dei semi. Anche i monaci brasiliani lo coltivavano presso i loro monasteri insieme ad altre piante officinali, come liquirizia, mercurella, ruta e giuggiolo.

Il sacro agrume dalle valenze religiose è lodato e benedetto come pianta e come frutto anche da Gioacchino da Fiore (1130-1202), che ebbe modo di vedere personalmente, in occasione di un viaggio nel monastero dell'Abatemarco, nel territorio del Mercurio (odierno entroterra della Riviera dei Cedri, nell'alto Tirreno cosentino) quanta fatica e quanti sacrifici costasse ai contadini la sua coltivazione.

Il Boccaccio (1313-1375) lo cita nell'introduzione alla terza giornata del "*Decamerone*": "...un prato di minutissima erba...chiuso dintorno di verdissimi e vivi aranci e cedri...". Ludovico Ariosto (1474-1533) ne "*L'Orlando Furioso*" descrive in modo egregio i fiori, i frutti e la maestosità della pianta.

Nel secolo XV Pontano, Venuto, Porta, Barrio e Fra Leandro Alberti ne scrissero come di coltivazione comune in Campania, Calabria e Sicilia e Porzio riferisce che i Cedri erano anche esportati. Il Cedro è, inoltre, citato da Tasso (1544-1595), dal napoletano G.B. Marino e dal calabrese Tommaso Campanella (1568-1639).

Nel 1744 l'imperatrice Maria Teresa d'Austria impose una tassa speciale a carico degli Ebrei della Slesia, della Moravia e della Boemia per le loro importazioni di Cedro dall'Italia. Nel 1753 Linneo fece assumere alla pianta l'attuale denominazione scientifica di *Citrus medica*. E' in questo secolo che iniziò la commercializzazione del prodotto. Si hanno, infatti, notizie di negozianti di Amburgo che richiedevano i Cedri salati in botti per candirli. Giosuè Carducci (1835-1907) così esprime le sue emozioni di fronte al paesaggio ligure presso Arenano: "*O tra placidi olivi, tra i cedri e le palme sedente, bella Arenano, al riso de la ligure spiaggia*".

Gabriele D'Annunzio (1863-1938), fine conoscitore delle delizie dei sensi, fu ghiotto estimatore dei "*pannicelli*", i golosi involtini di zibibbo appassito, i cui acini sono aromatizzati con bucce di Cedro ed avvolti nelle sue foglie, legati con un giunco ed infornati. Celebre è il passo della "*Leda senza cigno*", in cui D'Annunzio parla di questi pannicelli: "*...invogli di fronde compresse e risecche, venuti in Calabria...*". I Normanni lo fecero coltivare nei loro feudi, insieme alla canna da zucchero, facendo costruire allo scopo degli acquedotti, come testimoniano i resti dell'Acquedotto Normanno a Santa Maria.

1.8. Il Cedro e la religione ebraica

La storia del Cedro e la sua diffusione nel mondo è strettamente legata alle tradizioni giudaiche. Per il popolo Ebreo, infatti, tale agrume ha da sempre avuto un profondo significato religioso (Sacerdoti, 2003).

Fin dalle epoche remotissime del Secondo Tempio, dopo il periodo dell'esilio, secondo le prescrizioni del libro del "*Levitico*", gli Ebrei conoscevano il Cedro (Etrog), al quale hanno attribuito un'importante funzione simbolica, che risulta legata alla celebrazione annuale della "*Festa delle Capanne*" (*Sukkòth*) o "*Festa dei Tabernacoli*", di cui parla il Vecchio Testamento (Lev XXIII-33), certamente la più importante e la più celebrata delle tre ricorrenze religiose ebraiche.

La ricorrenza celebra nel suo originario carattere agricolo le raccolte di fine anno (nei primi quindici giorni di Ottobre); è, quindi, anche la festa del lavoro e della fede, della gioia per il lavoro compiuto e per i frutti raccolti, durante la quale gli ebrei vivono per una settimana intera in una capanna (*sukkà*) che, secondo la tradizione orale, viene costruita all'aperto, con materiali vegetali, come rami e foglie, canne e listelli di legno, che non siano attaccati al suolo, con un tetto che permetteva di vedere il cielo, quasi a ricordo dei precari ricoveri sotto i quali i loro padri soggiornarono dopo l'esilio in Egitto, nell'inospitale deserto ed a memoria della protezione concessa da Dio al popolo di Israele. Durante questi sette giorni, fatta eccezione del sabato, gli Ebrei recano nella mano destra un ramo di palma da dattero (*lulàv*) due rami di salice di fiume (*aravà*) e tre rami di mirto (*hadas*), che agitano in ogni direzione a riconoscimento dell'onnipotenza di Dio, mentre nella sinistra recano un frutto di Cedro. Queste quattro specie vegetali hanno nella tradizione ebraica dei significati particolari, la cui simbologia è continuamente ricordata dagli israeliti. Secondo un'interpretazione allegorica, la palma eretta e diritta, paragonabile alla colonna vertebrale umana, richiama alla mente il peccato d'orgoglio, che fa sollevare la testa; il mirto, le cui foglie ricordano l'occhio umano, simboleggia il peccato della curiosità di chi si guarda attorno con invidia; il salice, la cui foglia può essere paragonata ad una bocca, serve a rendere l'uomo guardingo dal peccato della maldicenza; ed infine il Cedro, con la sua forma di cuore, suggerisce di confessare i peccati che si sono compiuti.

Secondo un'altra interpretazione del Talmud, però, le stesse piante possono significare le diverse qualità dei diversi tipi umani. Il Cedro, infatti, essendo un frutto che ha sapore e odore, rappresenta l'uomo che alla saggezza fa seguire le buone opere; la palma, con il suo frutto che ha sapore, ma non profumo, richiama l'immagine dell'uomo che alla saggezza non fa seguire le buone opere; il mirto, che ha un buon odore, ma è senza profumo, rappresenta l'uomo che opera senza possedere la saggezza; il salice, infine, privo sia di odore sia di sapore, rappresenta l'uomo privo di saggezza e di opere.

Non mancano le credenze legate alle tradizioni talmudiche, secondo cui chi sognava un Cedro doveva ritenersi amato da dio oppure una donna incinta che avesse mangiato del Cedro avrebbe avuto un figlio maschio. Tutto questo proprio secondo quanto prescritto da Dio stesso a Mosé: *“Ora il quindici del settimo mese, quando avrete raccolto i frutti della terra, celebrerete una festa al Signore per sette giorni...Prendete i*

frutti dell'albero più bello, dei rami di palma e dell'albero più frondoso, dei salici del torrente e vi rallegrerete dinnanzi al Signore, Dio vostro per sette giorni...dimorerete in capanne per sette giorni; tutti i cittadini di Israele dimoreranno in capanne, perché i vostri discendenti sappiano che io ho fatto dimorare in capanne gli Israeliti, quando li ho condotti fuori dal paese d'Egitto...".

Per gli Ebrei i frutti dell'albero più bello erano proprio i Cedri; pertanto, li elessero a frutto sacro. Senza tali frutti la "Festa delle Capanne" non si poteva fare; perciò, se ne portarono dietro i segreti della coltivazione dovunque andarono. Di secolo in secolo, questo speciale legame fra Cedro e religione ebraica non è venuto mai meno. Ancora oggi, ogni anno, nel mese di Luglio e Agosto, i rabbini vengono nella parte della Calabria più famosa per la coltivazione dei Cedri, ossia la "Riviera dei Cedri" per raccogliere e controllare personalmente i piccoli Cedri, indispensabili per la "Sukkoth", che cade nel mese di ottobre e che è per gli Ebrei di tutto il mondo l'avvenimento religioso più importante dell'anno. La cerimonia della raccolta dei Cedri è molto suggestiva e caratteristica e, soprattutto, segue tradizioni e regole strettissime. Per essere utilizzato in questa festa, però il frutto deve avere delle precise caratteristiche. I testi rabbinici elencano minuziosamente quali debbano essere tutte le qualità che rendano l'agrume sacro "kashe" o "kasher", cioè buono, adatto alla cerimonia. Esso, infatti, deve provenire da una pianta non innestata, al quarto anno di produzione; deve, inoltre, risultare perfettamente sano, senza buchi o screpolature; deve essere di colore verde e avere una forma conica, con l'apice perfettamente sano, che conservi ancora la vestigia del fiore e deve recare un pezzo di peduncolo. E', invece, inadatto ed inservibile, secondo i precetti della "Torah", un Cedro secco o rubato, o ancora proveniente da una pianta adorata o coltivata in una città scomunicata; è inservibile un frutto di offerta impura o di pianta nuova o di dubbia provenienza. Così, ogni mattina i rabbini si alzano alle 5 e vanno nelle cedriere con i contadini. Nei fondi arrivano presto e presto cominciano a lavorare.

Il rabbino va avanti lentamente, guarda con attenzione alla base, proprio nel punto in cui il tronco spunta dalla terra: se è liscio vuol dire che non c'è stato innesto e si possono raccogliere i suoi frutti. Con estrema attenzione, il rabbino esamina poi la buccia, il colore e la forma del frutto. Se tutto va bene il piccolo frutto, avvolto nella stoppa, è posto nella cassetta.

BIBLIOGRAFIA

- Blondel L. (1978). *Fruits*, 33, 695.
- Cook NC, Samman S. (1996). Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.* 7, 6676.
- Cutuli G, Di Martino E, Lo Giudice V, Pennisi L, Raciti G, Russo F, Scuderi A, Spina P. (1985). *Trattato di agrumicoltura*; Edagricole: Bologna, Italy.
- Ferini A, Giorlando A, Tuoto G. (1973). Il cedro (*Citrus medica* L.). Pàtron editore: Bologna, Italy.
- Gunther RY. (1959). The Greek Herbal of Dioscorides. Hafner: New York.
- Heim EK, Tagliaferro RA, Bobilya JD. (2002). Flavonoid antioxidant: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. Reviews: *J. Nutr. Biochem.* 13, 572-584.
- Ingallinera B, Barbagallo RN, Spagna G, Palmeri R, Todaro A. (2005). Effects of thermal treatments on pectinesterase activity determined in blood oranges juices. *Enzyme. Microb. Technol.* 36, 258-263.
- Jifon JL, Syverten JL. (2001). Effects of moderate shade on *Citrus* leaf gas exchange, fruit yield and quality. Proceedings Florida State Horticultural Society, 114, 177-181.
- Lee HS, Coates GA. (1999). Vitamin C in frozen, fresh squeezed, unpasteurized, polyethylene-bottled orange juice: a storage study. *Food. Chem.* 65, 165-168.
- Lo Piero AR, Puglisi I, Rapisarda P, Petrone G. (2005). Anthocianins accumulation and related gene expression in reti orange fruit induced by low temperature storage. *J. Agric. Food. Chem.* 53, 9083-9088.
- Lota ML, de Rocca Serra D, Tomi F, Bessiere JM, Casanova J. (1999). Chemical composition of peel and leaf essential oils of *Citrus medica* L. and *C. limonimeditica* Lush. *Flav Frag. J.*, 14, 161-166.
- Miller NJ, Rice-Evans CA. (1997). The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food. Chem.* 60, 331-337.
- Pignatti S. (2002). *Flora d'Italia*, Edagricole, Bologna

- Purseglove JW, Reuther W, Webber HJ, Batchelor LD. (1968). The *Citrus* industry. Volume II. University of California.
- Purseglove JW. (1974). Tropical crops. Dicotyledons. Volume 1 and 2 combined. English language book society and Longmans. London.
- Sacerdoti A. (2003). *Guida all'Italia ebraica*. Marsilio Editore, Venezia.
- Sánchez-Moreno C, Plaza L, De Ancos B, Cano MP. (2003). Vitamin C, provitamin A carotenoids and other carotenoids in high-pressurized orange juice during refrigerated storage. *J. Agr. Food Chem.* 51, 647-653.
- Tim Cushnie TP, Lamb AJ. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 26, 343-356.
- Walle T. (2004). Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology Medicine* 36, 829-837.

CAPITOLO 2

Il diabete: ricerca attuale e prospettive future

2.1. Introduzione

Il diabete è una sindrome metabolica con inappropriata iperglicemia dovuta a un difetto assoluto di secrezione insulinica dalle cellule β delle isole di Langerhans pancreatiche oppure alla riduzione dell'efficacia dell'insulina, o all'associazione di entrambi questi difetti (Greenspan and Strewler, 2000).

L'incidenza della malattia diabetica fu estremamente rara fino a quando lo zucchero, dalla seconda metà del secolo, non è diventato un genere alimentare a basso costo.

Nonostante ciò la condizione patologica del diabete è conosciuta, in campo medico, da almeno quattromila anni. Infatti, la prima trattazione si è avuta nel papiro egizio di Ebers, scritto intorno al 1550 a.C. e, in seguito, in testi indiani risalenti al 800-600 a.C. Testimonianza delle conoscenze del diabete si hanno anche nell'antichità classica greca e romana, grazie ai lavori del medico ellenistico Areteo di Cappadocia (120-200 d.C.) che scrisse il trattato "Sul diabete", il quale rimase un classico testo per l'insegnamento e la pratica medica di questa malattia sino alla fine del XVIII secolo. Nel 1761, infatti, fu ripreso dall'italiano Morgagni che descrisse la diagnosi, la terapia e persino le cause della malattia diabetica nelle sue varie manifestazioni.

Il termine diabete deriva dal greco "*diabetis*" e significa "*passare attraverso*". A questo fu aggiunto il termine mellito in quanto, nei pazienti affetti da tale malattia, le urine hanno una alta concentrazione di zucchero, e pertanto sono dolci.

Il diabete mellito si manifesta nell'uomo con alcuni sintomi evidenti, quali aumento della diuresi (poliuria), cui si accompagna aumento della sete (polidipsia) e della fame, associata ad una diminuzione del peso corporeo. Tra i segni umorali, il più precoce e caratteristico è un persistente aumento della glicemia, che si presenta già elevata in condizioni di digiuno e cresce fortemente dopo i pasti.

Il tasso di glucosio circolante si aggira normalmente intorno ad un valore molto stabile, che è di 1 g per 1000 ml di sangue, con lievi oscillazioni in più dopo i pasti, ed in meno in condizioni di digiuno. In quest'ultimo caso la costanza del livello glicemico è assicurata dalla continua immissione in circolo di glucosio dal fegato. Nella sindrome

diabetica la glicemia si mantiene costantemente al di sopra del valore sopra citato e può giungere fino a 2-4 g per 1000 ml.

La capacità dell'organismo di mantenere le concentrazioni di glucosio in circolo stabile è garantita dalla presenza di due ormoni: l'insulina e il glucagone.

Quando la glicemia si abbassa, come avviene durante il digiuno, il pancreas secreta il glucagone che a livello epatico stimola l'idrolisi del glicogeno in glucosio provocando l'innalzamento degli zuccheri nel sangue.

In risposta ad alti livelli di glucosio, il pancreas secreta l'insulina, la quale determina un abbassamento di glucosio nel torrente circolatorio, stimolandone il suo ingresso nel fegato, nei muscoli e nel tessuto adiposo dove viene immagazzinato sotto forma di glicogeno. Nel tessuto adiposo, inoltre, l'insulina facilita la formazione di lipidi bloccandone l'utilizzo ai fini energetici. Pertanto, l'incapacità del pancreas di produrre insulina, così come una dieta troppo ricca in carboidrati che rende insufficiente la quantità di ormone secreto dal pancreas, o alterazioni nella "pathway" d'azione dell'ormone sono alla base del diabete mellito.

2.1.1. Classificazione del diabete

La classificazione del diabete fatta nel 1979, dalle varie società di diabetologia e accettata ancora oggi dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) si basa; sia sull'eziologia della malattia sia sulla terapia farmacologica utilizzata per il trattamento del diabete.

Il diabete è classificato in: diabete mellito di tipo 1 o insulino-dipendente (IDDM) e diabete mellito di tipo 2 o non insulino-dipendente (NIDDM).

La prima forma è tipica dell'età giovanile, ma compare occasionalmente anche in adulti non obesi ed è caratterizzata da una grave o totale riduzione della produzione di insulina dovuta alla distruzione immunomediata delle cellule β del pancreas. Il diabete di tipo 1 è una forma grave e si associa a chetosi; infatti, poiché l'organismo non ricava sufficiente energia dal glucosio nei tessuti, inizia ad utilizzare il grasso di riserva. Ciò causa un aumento nel sangue di corpi chetonici, composti che rendono il sangue acido e interferiscono con la respirazione. Se non trattato, questo tipo di diabete risulta letale: la morte da coma diabetico rappresenta, infatti, l'inevitabile conclusione della malattia se non viene seguita la terapia insulinica.

Il diabete di tipo 2 è la forma più comune di diabete e si sviluppa prevalentemente negli adulti anche se può occasionalmente esordire in età infantile.

Nel diabete non insulino-dipendente, il pancreas produce una considerevole quantità di insulina che risulta, comunque, insufficiente per le necessità dell'organismo, soprattutto perché i tessuti sono spesso resistenti agli effetti dell'ormone. Un alto livello di glicemia, ad esempio, rende inattivi i recettori bersaglio dell'insulina presenti nelle cellule dell'organismo. I pazienti non sono dipendenti dalla terapia insulinica esogena per la loro sopravvivenza. Le cause scatenanti l'insorgenza della malattia vanno ricercate in fattori ereditari e ambientali.

Negli anni si è scoperta l'esistenza di un fattore di trasmissione ereditario, non ancora ben chiaro, che espone a tali patologie alcune popolazioni più delle altre. In questi casi ciò che viene trasmesso non è il diabete ma la tendenza ad ammalarsi di diabete.

All'ereditarietà si affiancano aspetti caratteristici della persona, quali l'obesità. Ricordiamo che le cellule hanno bisogno di zucchero per vivere. Quanto maggiore è il numero di cellule da alimentare tanto maggiore sarà il fabbisogno di insulina. Nell'obeso, quindi, l'insulina viene prodotta non più in quantità sufficiente. Oggi i bambini e gli adolescenti tendono a diventare obesi con più frequenza ed il diabete di tipo 2 è comune anche nei giovani.

La vita sedentaria, lo stress e le malattie che inducono l'organismo a risposte importanti ricadono, invece, nell'elenco dei fattori ambientali scatenanti. Anche l'età gioca un ruolo rilevante: l'invecchiamento dell'organismo, infatti, si riflette sulla funzionalità di tutti gli organi e, soprattutto, sul pancreas che invecchiando non è più in grado di rispondere prontamente alle richieste ricevute.

Le persone affette da diabete di tipo 2 sono, quindi, generalmente persone della seconda o terza età, con un peso superiore a quello ideale, spesso con genitori, nonni o zii diabetici. I sintomi non sono così evidenti come nel diabete di tipo 1 e vengono ignorati. La scoperta del diabete solitamente avviene durante un check-up. Per questo motivo, la diagnosi di tale forma di diabete è piuttosto tardiva ed è facile riscontrare la presenza di complicanze in stato avanzato di sviluppo.

Esiste poi un diabete gestazionale (o gravidico) che colpisce circa il 4% delle donne in gravidanza. È un'alterazione del metabolismo dei carboidrati che si verifica durante la gravidanza, stimolata dalle modificazioni ormonali e metaboliche di tale periodo.

Vi sono seri rischi associati al diabete gravidico sia per la madre sia per il bambino.

In particolar modo, nella madre il diabete può essere associato a infezioni, chetoacidosi diabetica e ipertensione. Tuttavia, un buon controllo routinario è sufficiente per evitare queste complicanze. Nel bambino, oltre a un più elevato rischio di morte al momento del parto o post-partum, possono manifestarsi malformazioni congenite e macrosomia (peso eccessivo alla nascita, cioè sopra i 4.5 kg). Inoltre, i bambini nati da madri diabetiche possono soffrire di problemi respiratori e metabolici e, pertanto, devono essere tenuti sotto stretto controllo dopo la nascita.

Attualmente, il diabete non è una malattia curabile in modo definitivo, anche se la ricerca nel campo sta facendo passi da gigante. Si può, però, condurre una vita assolutamente "normale", evitando le complicazioni che a lungo andare potrebbe portare (problemi di circolazione, occhi, reni, ecc.) agendo fondamentalmente su quattro fronti:

- Uso di insulina iniettata dall'esterno (per il tipo 1), o di antidiabetici orali (per il tipo 2);
- Attività fisica;
- Educazione all'igiene e al controllo;
- Sana alimentazione.

Per quanto riguarda quest'ultimo punto, il diabete può essere in qualche modo controllato riducendo l'assorbimento dei carboidrati, anche se una dieta troppo ridotta in carboidrati è anch'essa fonte di disfunzioni metaboliche; infatti, ciò può causare accumulo di corpi chetonici, eccessivo catabolismo delle proteine tissutali e perdita di cationi, specialmente ione sodio.

In entrambe le forme di diabete, il protrarsi per molti anni di una condizione in cui i livelli di glicemia si mantengono moderatamente alti, può alla fine causare malattie ai reni, compromissione della vista e opacizzazione del cristallino. La riduzione del flusso ematico agli arti, con disturbi come l'intorpidimento degli stessi e la perdita della funzionalità, in casi gravi può richiedere l'amputazione. Altre patologie connesse con il

diabete sono l'aumento del rischio di attacco cardiaco e ictus. In caso di gravidanza, il diabete è associato a mortalità elevata del feto e ad anomalie congenite.

Sebbene l'uso delle piante medicinali per il trattamento del diabete è enormemente diminuito in seguito all'introduzione dell'insulina e dei farmaci ipoglicemizzanti orali, una commissione esperta dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha raccomandato studi medici e scientifici più approfonditi degli agenti ipoglicemici di origine vegetale (WHO, 1985).

2.2. L'insulina

L'insulina fu purificata e cristallizzata da Abel entro qualche anno dalla scoperta dell'efficacia degli estratti pancreatici nel trattamento del diabete. Le cellule β delle isole di Langerhans sintetizzano l'insulina partendo da un precursore costituito da una singola catena polipeptidica, detto proinsulina. Nella conversione della proinsulina umana in insulina, quattro amminoacidi basici e il restante peptide di connessione, o peptide C, vengono asportati per proteolisi. Questo distacco dà origine alle due catene polipeptidiche (A e B) che costituiscono la molecola di insulina, la quale contiene un ponte disolfuro all'interno di una delle due subunità (catena A) e due ponti disolfuro che uniscono le due subunità. La catena A è costituita di solito da 21 residui amminoacidici e la catena B da 30. Sebbene la sequenza di amminoacidi dell'insulina si sia conservata in gran parte invariata nel corso dell'evoluzione, essa presenta variazioni importanti che ne spiegano le differenze sia nella potenza biologica sia nell'immunogenicità (Gammeltoft, 1984).

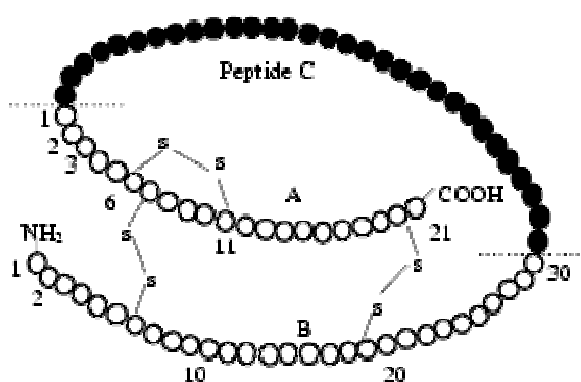


Figura 2.1. Struttura della proinsulina.

La struttura cristallina rivela che le due catene dell'insulina formano una struttura altamente ordinata con più regioni ad α -elica sia nella catena A sia nella catena B. Le catene isolate dell'insulina sono inattive. In soluzione, l'insulina può esistere come monomero o dimero o come esamero costituito da un trimero di dimeri. Due ioni Zn^{2+} sono coordinati nell'esamero, e questa forma di insulina è immagazzinata presumibilmente nei granuli delle cellule β del pancreas. Si ritiene che lo ione Zn^{2+} abbia un ruolo funzionale nella formazione dei cristalli e che la cristallizzazione faciliti la conversione della proinsulina in insulina, nonché l'immagazzinamento dell'ormone. Nelle preparazioni molto concentrate usate per la terapia, l'insulina è nella forma esamera. Quando l'ormone è assorbito e la concentrazione scende a livelli fisiologici (nanomolari), l'ormone si dissocia in monomeri, e il monomero è molto probabilmente la forma attiva biologicamente dell'insulina.

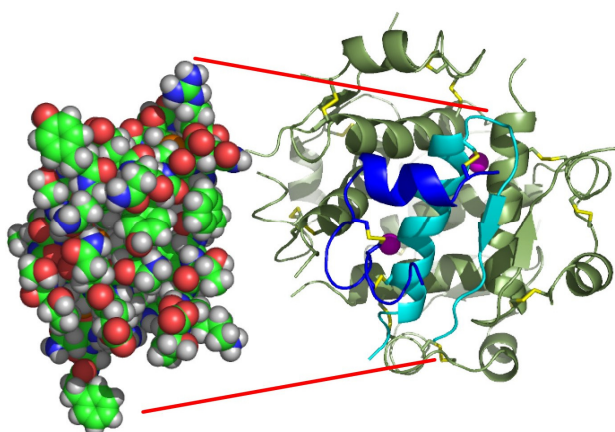


Figura 2.2. Struttura tridimensionale dell'insulina.

La secrezione dell'insulina è un processo regolato strettamente, destinato ad assicurare una glicemia stabile durante il digiuno e l'alimentazione. Questa regolazione è ottenuta mediante l'interazione coordinata di varie sostanze nutritive, ormoni gastrointestinali, ormoni pancreatici e neurotrasmettitori.

La secrezione dell'insulina è promossa da glucosio, amminoacidi, acidi grassi e corpi chetonici. Le isole di Langerhans sono riccamente innervate sia da fibre nervose adrenergiche sia da fibre nervose colinergiche. La stimolazione dei recettori α_2 -adrenergici inibisce la secrezione dell'insulina, mentre gli agonisti β_2 -adrenergici e la stimolazione dell'attività vagale promuove la liberazione dell'ormone. In generale, ogni

condizione che attiva il sistema nervoso autonomo (come l'ipossia, l'ipotermia, un intervento chirurgico, ustioni gravi) sopprime la secrezione dell'insulina per stimolazione dei recettori α_2 -adrenergici (Porte and Halter, 1981).

Nell'uomo il glucosio è lo stimolo principale alla secrezione dell'insulina ed è un fattore permissivo per le azioni di molti altri secretagoghi (Meglasson and Matschinsky, 1986). Il glucosio è più efficace nell'indurre la secrezione dell'insulina quando è somministrato per via orale che quando è somministrato per via endovenosa. Ciò è dovuto al fatto che l'ingestione del glucosio (o del cibo) induce la liberazione di ormoni gastrointestinali e stimola l'attività vagale (Brelje and Sorenson, 1988). Numerosi ormoni gastrointestinali promuovono la secrezione dell'insulina; i più potenti sono il peptide inibitorio gastrointestinale (GIP) e il peptide-1 glucagone-simile. Stimolano la liberazione di insulina anche la gastrina, la secretina, la colecistochinina, il polipeptide vasoattivo intestinale, il peptide liberatore della gastrina e l'enteroglucagone.

Quando è stimolata dal glucosio, la secrezione dell'insulina è bifasica: la prima fase raggiunge un massimo dopo 1-2 minuti ed è di breve durata, mentre la seconda fase ha un'insorgenza ritardata, ma una durata più lunga. Il meccanismo esatto con cui il glucosio e gli altri secretagoghi stimolano la liberazione dell'insulina non è del tutto chiaro. Sebbene alcuni ricercatori abbiano ipotizzato l'esistenza di un "glucorecettore" sulla cellula β , la maggior parte di essi ritiene che la stimolazione della liberazione dell'insulina per opera del glucosio richieda il suo ingresso nella cellula β e il suo metabolismo (Meglasson and Matschinsky, 1986).

2.3. I carboidrati

I carboidrati sono una grande famiglia di sostanze organiche naturali, e rientrano in questa classe i prodotti che presentano struttura con formula generale $C_nH_{2n}O_n$ nei composti più semplici e $(C_6H_{10}O_5)_n$ in quelli più complessi, ossia gli idrati di carbonio, e le sostanze da essi derivate per semplici reazioni di ossidazione o di riduzione. Una tipica classificazione viene effettuata in base alla loro struttura chimica che li distingue in carboidrati semplici e complessi. I primi, comunemente detti zuccheri, comprendono i monosaccaridi (glucosio, fruttosio) costituiti da una sola molecola di zucchero, e i disaccaridi (saccarosio, lattosio, maltosio) formati da due molecole di zucchero unite da un legame covalente. Questi hanno la caratteristica di entrare subito in circolo, cioè

vengono assorbiti senza subire alcun processo digestivo, rifornendo immediatamente l'organismo di carica energetica. Gli zuccheri semplici sono presenti negli alimenti primari o, in forma raffinata, utilizzati come tali (saccarosio, il comune zucchero da cucina), o incorporati in alimenti e bevande (sciroppo di glucosio) per aumentare la gradevolezza grazie al loro gusto dolce. I carboidrati complessi comprendono i polisaccaridi (amido, cellulosa) costituiti da molte molecole di zucchero legate fra loro. Tali composti prima di poter essere assorbiti dal nostro organismo devono essere idrolizzati dagli enzimi digestivi in molecole più semplici e, per questo motivo, sono fornitori di energia a lento rilascio.

I carboidrati presentano una duplice funzione: plastica ed energetica, in quanto entrano nella costituzione di strutture essenziali per gli organismi viventi e forniscono energia consentendo al cuore, al cervello e ai muscoli lo svolgimento delle loro funzioni. Il corpo umano utilizza tale classe di composti organici sotto forma di glucosio. Quest'ultimo può essere trasformato in glicogeno, il principale zucchero di riserva negli animali superiori, che viene immagazzinato principalmente nel fegato e nei tessuti muscolari. Il glicogeno è un polimero di residui di glucosio molto grande e ramificato. La maggior parte dei residui di glucosio sono legati tra loro da legami glicosidici α -1,4, mentre le ramificazioni sono formate da legami glicosidici α -1,6 presenti circa ogni dieci unità. Queste ramificazioni servono ad aumentare la solubilità del glicogeno e a rendere le unità che lo compongono più facilmente rimovibili.

L'amido è, invece, il principale polisaccaride vegetale di riserva contenuto nelle patate, nei cereali, nelle farine e nei legumi. L'amido può essere distinto in due forme diverse: l'amilosio, che è costituito da residui di glucosio legati da legami α -1,4, e l'amilopectina che è la forma ramificata costituita da legami α -1,6 ogni trenta legami α -1,4, quindi questa molecola è simile al glicogeno ma possiede un minor numero di ramificazioni.

Quando è consumato un alimento a base di carboidrati si verifica un innalzamento, seguito da una diminuzione, della quantità di zucchero nel sangue; questo fenomeno è chiamato risposta glicemica.

2.3.1. Metabolismo dei carboidrati: α -amilasi e α -glucosidasi

I carboidrati, sia polisaccaridi sia oligosaccaridi, prima di poter essere assorbiti devono essere idrolizzati nei loro costituenti a più basso peso molecolare, i monosaccaridi. Tale reazione di idrolisi è catalizzata dagli enzimi α -amilasi (Fig. 2.3) e α -glucosidasi.

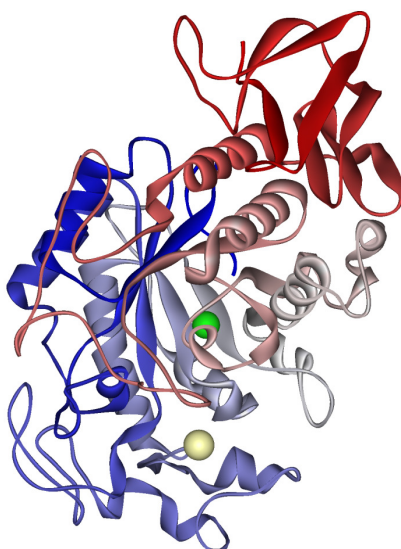


Figura 2.3. Enzima α -amilasi salivare.

Le α -amilasi sono enzimi presenti nei vegetali e nella maggior parte degli animali, uomo compreso, ed esistono in due forme isoenzimatiche, una prodotta dalle ghiandole salivari (HSA) e l'altra dal pancreas (PPA).

Le α -amilasi umane sono state ampiamente studiate da un punto di vista chimico-clinico in quanto importanti come indicatori di disfunzioni del tessuto d'origine, infatti misurare l'attività dell' α -amilasi in urina, saliva ed altri fluidi biologici è uno strumento diagnostico utile per valutare le malattie del pancreas e delle ghiandole salivari (Greenberger *et al.* 1991; Salt *et al.* 1976).

Le sequenze primarie delle α -amilasi di origine sia salivare sia pancreatica sono altamente somiglianti, e mostrano anche un alto livello di somiglianza strutturale.

Le α -amilasi sono proteine composte da 496 amminoacidi in una singola catena polipeptidica e legano inoltre ioni calcio e cloro (Feller *et al.*, 1996; Numao *et al.*, 2002). Le sequenze dei due isoenzimi sono identiche al 97% (Nishide *et al.*, 1986), anche se alcune delle sostituzioni, dei 15 amminoacidi interessati, avvengono nella regione del sito attivo (Brayer *et al.*, 1995). È stato trovato anche un alto livello di

omologia per le loro strutture terziarie, con entrambi gli isoenzimi composti da tre domini strutturali (Fig. 2.4). Il Dominio A (residui 1-99, 170-404) è il più ampio ed adotta una struttura a cilindro ad otto giri (α/β)₈, e in esso sono presenti i tre residui catalitici del sito attivo Asp197, Glu233, Asp300. Il Dominio B (residui 100-169) esiste come un'escursione del Dominio A e contiene un sito legante il calcio. Il Dominio C (residui 405-496) sembra essere un dominio indipendente dagli altri due con funzione ancora sconosciuta (Ramasubbu *et al.*, 1996; Brayer *et al.*, 1995).

Il sito attivo degli isoenzimi delle α -amilasi è ben definito ed è presente, nel Dominio A, come una profonda crepa a forma di V. Il sito attivo è costituito da sei subsiti: quattro leganti lo zucchero (-4, -3, -2, -1), e due leganti l'aglicone (+1, +2). In seguito al legame del substrato con il sito attivo dell'enzima, il legame glicosidico che viene scisso dall'enzima è tra il sito (-1) e (+1) (Nagamine *et al.*, 1998; Omichi *et al.*, 1991).

L' α -amilasi secreta nella saliva è responsabile dell'iniziale degradazione dell'amido e del glicogeno contenuti nei carboidrati, scissione che avviene in bocca e che prosegue nell'intestino ad opera dell' α -amilasi secreta dal pancreas. L'amido viene così idrolizzato in maltosio, destrine e piccole quantità di glucosio, ma l'amilopectina e il glicogeno vengono degradati solo parzialmente poiché l'enzima scinde solo i legami α (1→4) e non quelli α (1→6) localizzati nei punti di ramificazione. Per essere idrolizzata completamente l'amilopectina richiede l'azione di un enzima deramificante, l' α (1→6)-glucosidasi. Esso espone un nuovo gruppo di catene contenenti legami α (1→4) che possono essere attaccate dall' α -amilasi finché non sono raggiunte nuove ramificazioni α (1→6). Il risultato finale dell'azione sequenziale di questi due enzimi è la completa degradazione dell'amido o del glicogeno con formazione di glucosio e maltosio. Il glucosio è assorbito, rilasciato nel flusso sanguigno e trasportato ai vari tessuti per essere utilizzato (Van Holde).

L'inibizione di questi enzimi potrebbe determinare una ridotta digestione dei carboidrati ed un minor assorbimento di glucosio, migliorando il controllo glicemico nel paziente diabetico in quanto viene ridotto l'alto picco ematico del glucosio nel periodo post-prandiale (Hamdan *et al.*, 2004).

Sostanze in grado di inibire le amilasi sono state estratte da numerose specie vegetali e sono ampiamente utilizzate nel trattamento del diabete (Grayer *et al.*, 2002).

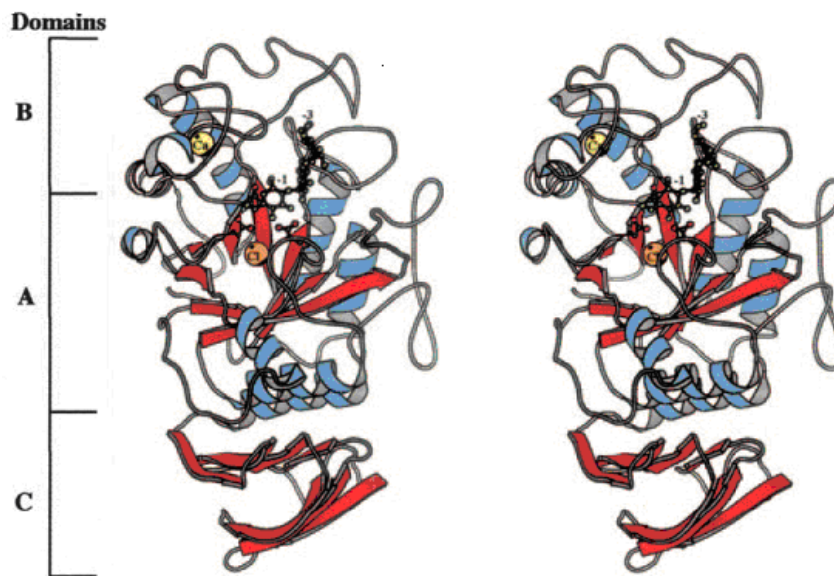


Figura 2.4. Struttura dell'enzima α -amilasi

2.4. Estratti vegetali ad attività ipoglicemizzante

Molteplici specie vegetali sono impiegate da secoli nel tentativo di curare malattie e continuano oggi a giocare un ruolo importante tra i più recenti progressi nel trattamento di patologie di rilevante impatto sociale come il diabete mellito.

Un approccio terapeutico al trattamento del diabete di tipo 2 consiste nel ridurre l'iperglicemia post-prandiale. Questo è possibile, come già sottolineato, ritardando l'assorbimento del glucosio attraverso l'inibizione degli enzimi che idrolizzano i carboidrati, α -amilasi e α -glucosidasi, nel tratto digestivo. Inibitori di tali enzimi ritardano la digestione dei carboidrati, causando una riduzione nella velocità di assorbimento del glucosio e conseguentemente riducendo il picco glicemico post-prandiale. Per tali motivi, la ricerca di composti ipoglicemici più efficaci e più sicuri continua a essere un'importante area di ricerca attiva soprattutto nel campo dei prodotti naturali.

Numerosi sono negli ultimi anni gli studi condotti su specie vegetali raccolte in tutto il mondo. Deutschländer e collaboratori (2009) hanno recentemente valutato l'attività ipoglicemizzante di tre piante, *Pteronia divaricata*, *Euclea undulata* var. *myrtina* e *Elaeodendron transvaalense*, utilizzate nella medicina tradizionale del Sud Africa per il trattamento del diabete. L'estratto in acetone della *P. divaricata* ha dimostrato di inibire

l' α -glucosidasi con un valore di IC₅₀ di 31.22 μ g/ml. Gli estratti in acetone di *E. undulata* and *E. transvaalense* inibiscono l' α -amilasi con valori di IC₅₀ rispettivamente di 2.80 e 1.12 μ g/ml.

Gli estratti acquoso, cloroformio e metanologico ottenuti dalle foglie e della radici di sei piante conosciute per le loro proprietà antidiabetiche dal punto di vista etnobotanico, sono stati testati per valutare le loro proprietà ipoglicemizzanti (Bhat *et al.*, 2008). Le piante oggetto di studio sono state *Azadirachta indica*, *Murraya koenigii*, *Ocimum tenuiflorum*, *Syzygium cumini*, *Linum usitatissimum* and *Bougainvillea spectabilis*.

L'estratto in cloroformio di *O. tenuiflorum*, *B. spectabilis*, *M. koenigii* e *S. cumini* hanno mostrato significative proprietà inibitorie sull'enzima α -glucosidasi. L'estratto in cloroformio della *M. koenigii* ha dimostrato di inibire significativamente (valori di IC₅₀ 1.96, 1.06 e 2.68 μ g/ml) anche l' α -amilasi porcina pancreatica e le glucosidasi murine pancreatica e intestinale. Tale estratto si caratterizza per un basso contenuto in fenoli per cui l'attività inibitoria è da attribuirsi ad altre classi di principi attivi. L'estratto metabolico della stessa pianta ha evidenziato inibizione (IC₅₀ di 1.96 μ g/ml) solo della glucosidasi intestinale murina.

In maniera simile, i tre estratti di *O. tenuiflorum* inibiscono l' α -amilasi porcina e le glucosidasi murine pancreatica ed epatica. Una buona attività inibitoria è stata ottenuta anche con l'estratto cloroformico di *S. cumini* e *B. spectabilis* nei confronti dell' α -amilasi porcina e delle glucosidasi murine pancreatica e intestinale. Gli estratti metanologico e acquoso (IC₅₀ di 2.60 e 1.80 μ g/ml) della *A. indica* (IC₅₀ di 3.17 e 6.21 μ g/ml) hanno mostrato inibizione della glicosidasi epatica ed intestinale con valori di IC₅₀ superiori a quello dell'acarbosio. *L. usitatissimum* è una pianta nota nella medicina popolare per la sua capacità di abbassare i livelli plasmatici di trigliceridi e colesterolo e i suoi effetti ipolipidemici (Bhathena *et al.*, 2003). L'estratto acquoso (IC₅₀ di 3.21 μ g/ml) e metanologico (IC₅₀ di 18.62 μ g/ml) hanno inibito la glucosidasi pancreatica di topo con valori di IC₅₀ superiori a quello dell'acarbosio.

Recentemente, gli estratti in metanolo, *n*-esano e cloroformio di *Calamintha organifolia*, *Satureja thymbra*, *Prangos asperula*, *Sideritis perfoliata*, *Asperula glomerata*, *Hyssopus officinalis*, *Erythraea centaurium*, *Marrubium radiatum* e *Salvia acetabulosa*, raccolte in Libano, sono stati oggetto di studio per valutare il loro potenziale utilizzo come inibitori degli enzimi α -amilasi e α -glucosidasi (Loizzo *et al.*,

2008a). L'estratto in metanolo del *M. radiatum* ha mostrato la maggiore attività inibitoria su entrambi gli enzimi con valori di IC₅₀ di 61.1 and 68.8 µg/ml, rispettivamente. Gli estratti in *n*-esano e cloroformio ottenuti dalla stessa pianta non inibiscono l' α -amilasi, mentre hanno una buona attività sull' α -glucosidasi (valori di IC₅₀ rispettivamente di 114.7 e 128.5 µg/ml). Novaes e collaboratori nel 2001 hanno dimostrato un'ottima attività ipoglicemizzante *in vivo* del *M. vulgare*, usato nella medicina tradizionale brasiliana e messicana. Un recente studio clinico su pazienti affetti da diabete di tipo 2 ha dimostrato che l'estratto delle foglie di *M. vulgare* riduce il livello di glucosio plasmatico fornendo la base scientifica del suo utilizzo nella medicina popolare (Herrera-Arellano et al., 2004). L'estratto in metanolo della *S. acetabulosa* ha fornito valori di IC₅₀ di 76.9 e 91.2 µg/ml rispettivamente per α -glucosidasi e α -amilasi.

L'attività dell'estratto in *n*-esano della *S. acetabulosa* su entrambi gli enzimi è minore, con valori di IC₅₀ di 205.5 e 212.0 µg/ml rispettivamente per α -amilasi e α -glucosidasi. L'utilizzo di cloroformio come solvente d'estrazione riduce drasticamente l'effetto inibitorio sull' α -amilasi, mentre fornisce un piccolo effetto sulla capacità della *S. acetabulosa* ad inibire l' α -glucosidasi. L'estratto in *n*-esano e cloroformio della *C. origanifolia* hanno mostrato la maggiore attività di inibizione sull' α -glucosidasi (IC₅₀ rispettivamente di 63.5 e 102.1 µg/ml). Entrambi gli estratti inibiscono anche l' α -amilasi con valori di IC₅₀ rispettivamente di 94.1 e 91.6 µg/ml.

Dell'*E. centaurium* il solo estratto in cloroformio esibisce una buona attività inibitoria su entrambi gli enzimi con valori di IC₅₀ di 64.9 e 74.9 µg/ml rispettivamente per α -amilasi e α -glucosidasi. Gli estratti di *H. officinalis* sono risultati attivi solo sull' α -glucosidasi, con valori di IC₅₀ compresi tra 127.3 e 908.4 µg/ml. L'estratto in metanolo e *n*-esano della *A. glomerata* hanno dimostrato di inibire l' α -glucosidasi con valori di IC₅₀ rispettivamente di 128.5 e 190.5 µg/ml, rispettivamente. Un debole effetto inibitorio è stato riscontrato sull'enzima α -amilasi con valori di IC₅₀ rispettivamente di 209.7 e 330.9 µg/ml per l'estratto in metanolo e *n*-esano.

Un recente studio (Subramanian *et al.*, 2008) ha fornito evidenze *in vitro* per la potenziale inibizione degli enzimi α -glucosidasi e α -amilasi, seguite da studi *in vivo* su

ratti, dell'estratto etanolico della *Andrographis paniculata* (Fig. 2.5) e del suo maggiore costituente, l'andrografolide.



Figura 2.5. Parti aeree della *Andrographis paniculata*.

L'estratto della pianta ha mostrato un apprezzabile effetto inibitorio dell' α -glucosidasi con un valore di IC_{50} di 17.2 mg/ml e una debole attività sull' α -amilasi (IC_{50} di 50.9 mg/ml). L'andrografolide ha esibito una comparabile attività su entrambi gli enzimi α -glucosidasi e α -amilasi (IC_{50} rispettivamente di 11.0 mg/ml e 11.3 mg/ml).

Gli studi condotti *in vivo* hanno dimostrato che sia l'estratto di *A. paniculata* sia l'andrografolide riducono significativamente il picco glicemico in ratti diabetici. L'inibizione dell' α -glucosidasi potrebbe essere considerata uno dei possibili meccanismi dell'attività antidiabetica dell'estratto di *A. paniculata*.

Differenti piante medicinali brasiliane e messicane sono state studiate per valutare il loro potenziale ipoglicemico (Teixeira *et al.*, 2007). Tra queste si segnalano in particolare *Cecropia obtusifolia*, *Equisetum myriochaetum*, *Acosmium panamense* e *Malmea depressa*. L'estratto in butanolo della *C. obtusifolia* ha mostrato la maggiore attività inibitoria sull' α -glucosidasi con un valore di IC_{50} di 14 μ g/ml), seguito dall'estratto della *M. depressa* (IC_{50} di 21 μ g/ml) (Andrade-Cetto *et al.*, 2008).

La natura di alcuni composti identificati in questi estratti (fenoli, flavonoidi e loro glicosidi) è in accordo con quelli menzionati da Jung *et al.* (2006) come inibitori dell' α -glucosidasi. Sette piante medicinali delle Mauritius, quali *Coix lacryma-jobi*, *Aegle marmelos*, *Artocarpus heterophyllus*, *Vangueria madagascariensis*, *Azadirachta indica*, *Eriobotrya japonica* and *Syzygium cumini*, sono state oggetto di studio per valutare i

possibili effetti sull'inibizione dell' α -amilasi *in vitro* (Kotowaroo *et al.*, 2006). I risultati hanno evidenziato come soltanto l'*A. heterophyllus* è in grado di inibire significativamente l' α -amilasi. Con lo scopo di confermare gli effetti osservati, l'inibizione dell'enzima è da parte dell'estratto della pianta è stata investigata *in vitro* usando plasma di ratto. I risultati hanno evidenziato come l'estratto acquoso delle foglie inibisca significativamente l'enzima. La maggiore attività inibitoria (27.20%) è stata osservata alla concentrazione di 1 mg/ml.

L'estratto metanolico di tre specie di *Salsola*, *S. soda*, *S. kali* e *S. oppositifolia*, è (Fig. 2.6.) stato preparato e testato *in vitro* con lo scopo di valutare la capacità di inibizione dell' α -amilasi (Tundis *et al.*, 2007a).



Figura 2.6. Parti aeree di *Salsola kali*, *S. soda* e *S. oppositifolia*.

Tutti gli estratti hanno dimostrato di possedere una buona attività con valori di IC_{50} di 0.65-0.28 mg/ml. Ogni estratto è stato, quindi sottoposto a un processo di bio-frazionamento. Come primo step l'estratto è stato consecutivamente partizionato con *n*-esano, diclorometano, acetato di etile ed etere dietilico. Le frazioni in *n*-esano delle tre specie di *Salsola* hanno mostrato valori di IC_{50} compresi tra 0.32 e 0.76 mg/ml. Confrontando l'attività della frazione in diclorometano delle tre piante, la *S. kali* è risultata la più interessante con un valore di IC_{50} di 0.05 mg/ml. Le frazioni in acetato di etile ottenute da tutte le specie esibiscono la maggiore attività. Tra queste, la frazione in acetato di etile della *S. kali* mostra il valore migliore (IC_{50} di 0.02 mg/ml).

Anche alcune specie di *Senecio*, *S. inaequidens*, *S. vulgaris* e *S. leucanthemifolius*, hanno mostrato attività inibitoria nei confronti dell' α -amilasi (Conforti *et al.*, 2006;

Tundis *et al.*, 2007b). In particolare, l'estratto metanolico di *S. inaequidens*, *S. vulgaris* ha dimostrato di possedere una buona attività con una percentuale di inibizione dell' α -amilasi del 92.9% e del 82.5% alla concentrazione di 1 mg/ml rispettivamente per *S. inaequidens* e *S. vulgaris*. L'estratto metanolico del *S. leucanthemifolius* si caratterizza per una percentuale di inibizione del 78% alla medesima concentrazione di 1 mg/ml.

Una significativa attività è posseduta anche dall'estratto in diclorometano delle tre specie oggetto di studio.

Proseguendo il lavoro di ricerca di piante ad attività ipoglicemizzanti endemiche della Calabria, sono state studiate le diverse frazioni ottenute dal bio-frazionamento dell'estratto metanolico della *Cardamine battagliae* (Conforti *et al.*, 2008). In particolare, la frazione in *n*-esano ha mostrato un'interessante attività inibitoria sull' α -amilasi con un valore di IC₅₀ di 0.055 mg/ml. Tale attività può essere ascritta allo stigmaterolo, uno dei maggiori costituenti della frazione e del quale è stata dimostrata in precedenza la buona attività ipoglicemizzante (Alexander-Lindo *et al.*, 2004). Interessante è anche l'attività della frazione in diclorometano con un valore di IC₅₀ di 0.12 mg/ml.

Il genere *Capsicum* appartiene alla famiglia Solanaceae e comprende circa ventisette specie e oltre 2000 varietà di piante perenni e annuali, delicate e rustiche, a portamento suffruticoso o arbustivo, tra le quali troviamo anche il comune peperone (Andrews, 1995; Dewitt *et al.*, 1996). Il *Capsicum annuum* è la specie da cui derivano la maggior parte delle varietà sia di peperone sia di peperoncino. Oltre a tale specie sono da annoverarsi: *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. pubescens* e *C. baccatum*. La specie *C. chinense* comprende i peperoncini più piccanti in assoluto, quali l'*Habanero*, il *Naga Dorset* e lo *Scotch Bonnet*. La caratteristica principale del *C. chinense* è a prescindere da forma e livello di piccantezza, l'odore simile a un'albicocca ed un sapore fruttato. La pianta è simile a un piccolo albero, a crescita lenta, che può però arrivare fino a 2 metri d'altezza. I fiori, bianchi o verdastri, con stami viola, possono essere campanulati, altro elemento distintivo della specie. Le foglie, larghe, carnose e rugose possono avere una leggera peluria sulla pagina inferiore. Essendo di grande interesse la valutazione del contributo nutraceutico di un prodotto destinato all'alimentazione come il peperoncino (Tolan *et al.*, 2001; Nettleton *et al.*, 2008), è stata recentemente valutata l'attività

ipoglicemizzante del *C. chinense* Habanero (Fig. 2.7.) in due stadi di maturazione (Menichini *et al.*, 2009).

L'estratto etanolic dei frutti maturi della varietà di peperoncino ha esibito un valore di IC_{50} di 130.67 $\mu\text{g/ml}$ nei confronti dell' α -amilasi. L'enzima α -glucosidasi è inibito maggiormente dall'estratto ottenuti dai frutti immaturi (IC_{50} 149.56 $\mu\text{g/ml}$). Con lo scopo di identificare i composti ai quali ascrivere l'attività, è stata oggetto di studio anche la frazione lipofila dei due estratti. I frutti immaturi hanno dimostrato maggiore selettività nell'inibizione dell' α -amilasi con un valore di IC_{50} di 9.88 $\mu\text{g/ml}$. In questo stadio di maturazione i peperoncini sono caratterizzati da un alto contenuto nel terpene fitolo e differenti acidi grassi.



Figura 2.7. I frutti di *Capsicum chinense* Habanero.

In precedenza lo stesso gruppo di ricerca aveva valutato il potenziale ipoglicemizzante del *C. annuum* var. *acuminatum* su entrambi gli enzimi digestivi (Loizzo *et al.*, 2008b). L'estratto ottenuto dai frutti maturi del *C. annuum* var. *acuminatum* non ha esibito attività inibitoria sull' α -amilasi, mentre si è dimostrato attivo nei confronti dell' α -glucosidasi con un valore di IC_{50} di 143.7 $\mu\text{g/ml}$.

Le bacche dello *Juniperus oxycedrus* (Fig. 2.8.) sono utilizzate come spezie soprattutto nella cucina europea e per il loro profumo. La pianta è riconosciuta anche nella medicina tradizionale per il trattamento di differenti patologie, tra cui iperglicemia e obesità (Sanchez de Medina *et al.*, 1994). Sulla base di tale impiego, l'olio essenziale della pianta è stato testato dal punto di vista biologico e studiato nella sua composizione fitochimica con lo scopo di evidenziare i componenti responsabili dell'attività. I risultati

ottenuti hanno dimostrato come l'olio essenziale ricavato dalla corteccia abbia un'interessante attività ipoglicemizzante per inibizione dell' α -amilasi, con un valore di IC_{50} di 3.49 μ l/ml, a differenza dell'olio essenziale ottenuto dalle bacche meno attivo ($IC_{50} > 25 \mu$ l/ml) (Loizzo *et al.*, 2007).



Figura 2.8. Particolare delle parti aeree dello *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus*.

Diversi sono gli studi realizzati negli ultimi anni per valutare la potenziale attività ipoglicemizzante di alcune specie come *Rhus coriaria* e *Bunium persicum* (Statti *et al.*, 2006), e la farina ottenuta dall'*Amaranthus caudatus* (Conforti *et al.*, 2005).

L'estratto metanolico di *R. coriaria* e *B. persicum* ha mostrato una percentuale di inibizione dell' α -amilasi rispettivamente del 36% e del 48.3% (alla concentrazione di 100 μ g/ml). Notevoli differenze sono state individuate nell'attività dell'estratto in acetato di etile, che ha mostrato l'87% di inibizione alla concentrazione di 50 μ g/ml per *R. coriaria* e del 40% di inibizione alla concentrazione di 250 μ g/ml per *B. persicum*.

Risultati simili sono stati invece ottenuti per l'estratto in *n*-esano con percentuali di inibizione del 72.3% e del 76.6% alla concentrazione di 250 μ g/ml rispettivamente per *B. persicum* e *R. coriaria*. I principi attivi presenti in letteratura come principali costituenti di piante appartenenti al genere *Rhus* sono gallotannini idrolizzabili e flavonoidi, come quercetina, mircetina e kampferolo. Probabilmente l'inibizione dell' α -amilasi è legata alla presenza di tali composti, descritti in precedenza come inibitori dell'enzima (Kim *et al.*, 2000; Kandra *et al.*, 2004). Nell'estratto di *B. persicum* è più significativa la presenza di terpeni, noti dalla letteratura per possedere attività ipoglicemizzante *in vivo* (Agarwal *et al.*, 1991; Marles *et al.*, 1995).

Due varietà di *Amaranthus caudatus*, l'Oscar blanco e la Victor red, sono state sottoposte a macerazione con metanolo e successivo bio-frazionamento con solventi a differente polarità e testate per valutarne l'attività ipoglicemizzante (Conforti *et al.*, 2005). L'estratto ha mostrato una percentuale di inibizione dell' α -amilasi del 50.5% per l'A. *caudatus* var. Oscar blanco e del 28% per l'A. *caudatus* var. Victor red alla concentrazione di 25 $\mu\text{g/ml}$. Notevoli differenze sono state evidenziate anche nell'attività dell'estratto in etile acetato con percentuali di inibizione dell'87% alla concentrazione di 50 $\mu\text{g/ml}$ per la varietà Oscar blanco e dell'84% alla concentrazione di 250 $\mu\text{g/ml}$ per la varietà Victor red. Risultati sovrapponibili sono stati, invece, ottenuti per gli estratti in n-esano (90% di inibizione alla concentrazione di 100 $\mu\text{g/ml}$) per entrambe le varietà.

2.5. Composti di origine naturale ad attività ipoglicemica

Differenti principi attivi, in particolar modo appartenenti alle classi dei flavonoidi e dei tannini, sono stati testati come inibitori degli enzimi α -glucosidasi e α -amilasi.

I flavonoidi, ampiamente distribuiti sia nelle piante medicinali sia negli alimenti, e nelle spezie, sono utilizzati sin dai tempi antichi per il trattamento di numerose malattie come il diabete, le malattie coronariche e il cancro. Numerosi componenti di questa famiglia di principi attivi sono stati isolati e testati per valutare la loro attività antidiabetica, ottenendo interessanti risultati.

Luteolina, amentoflavone, luteolina-7-*O*-glucoside e daidzeina hanno mostrato una importante attività inibitoria nei confronti sia dell' α -glucosidasi sia dell' α -amilasi; tra questi la luteolina è il flavonoide con la maggiore attività antidiabetica, attività che può essere paragonata a quella dell'acarbiosio, un inibitore non competitivo dell'enzima α -amilasi utilizzato per il trattamento del diabete e dell'obesità (Tadera *et al.*, 2006).

Alcuni flavoni glucosidici, come lonicerina e roifolina, isolati dalla *Lonicera japonica* e la luteolina-7-*O*-glucoside, isolata da *Salix gracilistyla*, hanno dimostrato di inibire significativamente l'enzima α -glucosidasi, mentre altri flavoni glucosidici, come baicalina (da *Scutellaria baicalensis*), pectolarina (da *Cirsium nipponicum*) e linarina (da *Lycopus lucidus*) non hanno evidenziato alcuna attività inibitoria enzimatica (Kim *et al.*, 2000). L'esperidina (da *Citrus unshiu*), un flavano glucoside, ha evidenziato una debole attività inibitoria nei confronti sia dell' α -glucosidasi sia dell' α -amilasi.

I biflavoni ginkgetina, isoginkgetina e bilobetina (da *Ginkgo biloba*) non hanno mostrato alcuna attività inibitoria enzimatica, ad eccezione dell'amentoflavone che per i suoi gruppi OH legati ai C₇, C₄" e C₄"' hanno dato inibizione relativamente alta per l' α -glucosidasi ma non per l' α -amilasi (Tanaka *et al.*, 2004).

Genisteina e daidzeina, isoflavoni abbondantemente presenti nella soia, hanno una forte attività inibitoria verso entrambi gli enzimi, mentre la genistina, il glucoside della genisteina, ha mostrato una debole azione inibitrice (Kim *et al.*, 2000).

La presenza di gruppi polidrossilici nelle loro molecole e la struttura chimica dei flavonoidi sembrano essere i fattori responsabili dell'inibizione dell' α -glucosidasi.

L'attività di questo enzima può essere inibita, oltre dai flavonoidi, anche dall'*N*-paracumaril tiramina e kotalanolo (Jong-Sang *et al.*, 2000).

I tannini sono prodotti naturali dall'elevato peso molecolare in grado di legarsi fortemente ai carboidrati e alle proteine. Hanno diversi effetti biologici: sono agenti chelanti, agenti precipitanti le proteine e agenti antiossidanti. Sono utilizzati per il trattamento della gotta, per i reumatismi o per l'artrosi.

Anche i tannini, testati per valutare l'attività antidiabetica, si sono mostrati potenti inibitori dell'enzima α -amilasi contenuto nella saliva, con un'attività pari a quella dell'acarbiosio (Kandra *et al.*, 2004).

La valutazione dell'attività antidiabetica comprende lo studio, sia *in vitro* sia *in vivo*, di altre specie vegetali con costituenti organici differenti dai suddetti flavonoidi e con meccanismi di azione diversi dall'inibizione degli enzimi α -glucosidasi e α -amilasi.

Dalla *Peucedanum japonicum* (Umbelliferae) sono stati isolati e caratterizzati due principi attivi, una cumarina (peucedanol-7-*O*- β -D-glucopiranoside) e un ciclitolo. In seguito alla somministrazione di una dose di 5.8 mg/Kg, la cumarina ha mostrato una riduzione dell'iperglicemia postprandiale del 39% mentre il ciclitolo del 34% (Lee *et al.*, 2004).

Gli steroli stigmast-4-en-3-olo e stigmast-4-en-3-one, costituenti dell'estratto in esano ottenuto dalla corteccia di *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae), sono probabilmente responsabili del significativo abbassamento del livello ematico di glucosio esercitato da tale estratto (Alexander-Lindo *et al.*, 2004).

L'acido kaurenoico, un diterpene isolato dalle foglie, dai fiori, dai fusti e dalle radici di *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*, Asteraceae) sembra essere responsabile del potenziale effetto ipoglicemico di tale specie vegetale (Bresciani *et al.*, 2004).

L'inibizione della proteina tirosina fosfatasi 1B, esercitata dall'estratto ottenuto dalle foglie di *Psidium guajava* (Myrtaceae), potrebbe essere il meccanismo d'azione con cui tale pianta svolge l'attività antidiabetica (Oh *et al.*, 2005).

L'effetto ipoglicemico dell'estratto acquoso di *Teucrium polium* (Labiatae) è stato studiato *in vivo* in ratti diabetici, i quali, in seguito alla somministrazione di una singola dose di tale estratto, hanno registrato un aumento della concentrazione plasmatica di insulina. Questo risultato evidenzia che l'estratto acquoso, probabilmente senza trasformazione metabolica, sia in grado di ridurre i livelli di glucosio nel sangue stimolando la secrezione di insulina da parte del pancreas (Esmaeili *et al.*, 2004).

BIBLIOGRAFIA

- Agarwal SG, Ghosh S, Jamwal PS, Raina AK, Thapp RK. (1991). Comparative studies on the major volatiles of kalazira (*Bunium persicum* seed) of wild and cultivated sources. *Food Chem.* 41, 129-134.
- Alexander-Lindo RL, Morrison EY, Nair MG. (2004). Hypoglycaemic effect of stigmast-4-en-3-one and its corresponding alcohol from the bark of *Anacardium occidentale* (cashew). *Phytotherapy Res.*, 18, 403-407.
- Andrade-Cetto A, Becerra-Jiménez J, Cárdenas-Vázquez R. (2008). Alfa-glucosidase inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *J. Ethnopharmacol.*, 116, 27-32.
- Andrews J. Peppers, the Domesticated Capsicums. UT Press, Austin, Utah. 1995.
- Bernfeld P. (1955). Analyses α and β . *Methods in Enzymology*, 1, 149-158.
- Bhat M, Zinjarde SS, Bhargava SY, Kumar AR, Joshi BN. (2008). Antidiabetic Indian plants: a good source of potent amylase inhibitors. *Evid Based Complement Alternat Med.* 5, 303-312.
- Bhathena SJ, Ali AA, Haudenschild C, Latham P, Ranich T, Mohamed AI, Hansen CT, Velasquez MT. (2003) Dietary flaxseed meal is more protective than soy protein concentrate against hypertriglyceridemia and steatosis of the liver in an animal model of obesity. *J. American Clin. Nutr.* 22, 326-327.
- Brayer GD, Luo Y, Withers SG. (1995). The structure of human pancreatic α -amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes, *Protein Sci.* 4, 1730-1742.
- Brelje TC, Sorenson RL. (1988). Nutrient and hormonal regulation of glucose-stimulated insulin secretion in isolated rat pancreases. *Endocrinology* 123, 1582-1590.
- Bresciani LF, Yunes RA, Burger C, De Oliveira LE, Bof KL, Cechinel-Filho V. (2004). Seasonal variation of kaurenoic acid, a hypoglycemic diterpene present in *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*, Asteraceae). *Naturforsch.*, 59, 229-232.
- Conforti F, Statti G, Loizzo MR, Sacchetti G, Poli F, Menichini F. (2005). *In vitro* antioxidant effects and inhibition of α -amylase of two varieties of *Amarantus caudatus* seeds. *Biol. Pharm. Bull.* 28,1098-1102.

- Conforti F, Loizzo MR, Statti G, Menichini F. (2005). Antioxidant activity and inhibition of α -amylase of methanolic extract and fractions from *Achillea ligustica* All. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 1791-4.
- Conforti F, Loizzo MR, Statti GA, Houghton PJ, Menichini F. (2006). Biological properties of different extracts of two *Senecio* species. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 57, 1-8.
- Conforti F, Vaccaro A, Loizzo MR, Statti GA, Autelitano G, Menichini, F. (2008). Effects on free radicals and inhibition of alpha-amylase of *Cardamine battagliae* (Cruciferae), an apocendemic Calabrian (southern Italy) plant. *Nat. Prod. Res.* 20, 101-107.
- Deuschländer MS, van de Venter M, Roux S, Louw J, Lall N. (2009). Hypoglycaemic activity of four plant extracts traditionally used in South Africa for diabetes *J. Ethnopharmacol.*, in press.
- Dewitt D, Bosland P. W. *Peppers of the World: An Identification Guide*. Ten Speed Press, Berkeley. 1996.
- Esmaeili MA, Yazdanparast R. (2004). Hypoglycaemic effect of *Teucrium polium*: studies with rat pancreatic islets. *J. Ethnopharmacol.* 95, 27-30.
- Feller G, le Bussy O, Houssier C, Gerday C. (1996). Structural and functional aspects of chloride binding to *Alteromonas haloplanctis* α -amylase, *J. Biol. Chem.* 271, 23836-23841.
- Forey P, Lindsay R. (1989). *Plantes médicinales, éd. Gründ*
- Gammeltoft S. (1984). Insulin receptors: binding kinetics and structure-function relationship of insulin. *Physiol. Rev.* 64, 1321-1378.
- Grayer JK, Yadan S, Vots V. (2002). Medicinal plant of India with antidiabetic potential. *J. Ethnopharmacol.* 81, 81-100.
- Greenberger NJ, Toskes PP. (1991). *Harrison's Principles of Internal Medicine*, Vol. 2, 12 th ed., McGraw-Hill, New York, p. 1369.
- Greenspan FS, Strewler GJ (2000), *Endocrinologia Generale e Clinica*, PICCIN.
- Hamdan II, Afifi F, Taha MO. (2004). *In vitro* alpha amylase inhibitory effect of some clinically used drugs. *Pharmazie* 54, 799-801.
- Herrera-Arellano A, Aguilar-Santamaria L, Garcia-Hernandez B, Nicasio-Torres P, Tortoriello J. (2004). Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare*

- leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics. *Phytomedicine* 11, 561-566.
- Jong-Sang K, Chong-Suk K, Kun Ho S. (2000). Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 2458-2461.
- Jung M, Park M, Chul HL, Kang Y, Seok-Kang E, Ki-Kim S. (2006). Antidiabetic agents from medicinal plants. *Curr. Med. Chem.* 13, 1203-1218.
- Kim JS, Kwon CS, Son KH. (2000). Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 2458-2461.
- Kotowaroo MI, Mahomoodally MF, Gurib-Fakim A, Subratty AH. (2006). Screening of traditional antidiabetic medicinal plants of Mauritius for possible alpha-amylase inhibitory effects *in vitro*. *Phytoter. Res.* 20, 228-231.
- Kandra L, Gyemant G, Zajacz A, Batta G. (2004). Inhibitory effects of tannin on human salivary α -amylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319, 1265-1271.
- Lebovit H. (1998). Alpha glucosidase inhibitors as agent in treatment of diabetes. *Diabetes Rev* 6, 132-145.
- Lee SO, Choi SZ, Lee JH, Chung SH, Park SH, Kang HC, Yang EY, Cho HJ. (2004). Antidiabetic coumarin and cyclitol compounds from *Peucedanum japonicum*. *Arch. Pharm. Res.* 27, 1207-1210.
- Loizzo MR, Tundis R, Conforti F, Saab AM, Statti AG, Menichini F. (2007). Comparative chemical composition, antioxidant and hypoglycaemic activities of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* L. berry and wood oils from Lebanon. *Food Chem.* 105, 572-578.
- Loizzo MR, Saab AM, Tundis R, Menichini F, Bonesi M, Piccolo V, Statti GA, de Cindio B, Houghton PJ, Menichini F. (2008b) *In vitro* inhibitory activities of plants used in Lebanon traditional medicine against angiotensin converting enzyme (ACE) and digestive enzymes related to diabetes. *J. Ethnopharmacol.* 119, 109-116.
- Loizzo MR, Tundis R, Menichini F, Statti AG, Menichini, F. (2008b). Influence of ripening stage on health benefits properties of *Capsicum annuum* var. *acuminatum* L.: *in vitro* studies. *J. Med. Food* 11, 184-189.
- Marles RJ, Farnsworth N.R. (1995). Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine* 2, 137-189.

- Meglason MD, Matschinsky FM. (1986). Pancreatic islet glucose metabolism and regulation of insulin secretion. *Diabetes Metab. Rev.* 2, 163-214.
- Menichini F, Tundis R, Bonesi M, Loizzo MR, Conforti F, Statti G, De Cindio B, Houghton PJ, Menichini F. (2009). The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. *Food Chem.* 114, 553-560.
- Nagamine Y, Omichi K, Ikenaka, T. (1988). Investigation of the active site of human salivary alpha-amylase from the modes of action on modified maltooligosaccharides. *J. Biochem.* 104, 409-415.
- Nettleton JA, Steffen LM, Ni H, Liu K, Jacobs DR. Jr. (2008). Dietary patterns and risk of incident type 2 diabetes in the Multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA) *Diabetes Care* 31, 1777-1782.
- Nishide T, Emi M, Nakamura Y, Matsubara K. (1986). Corrected sequences of cDNAs for human salivary and pancreatic α -amylases. *Gene* 50, 371-372.
- Novaes AP, Rossi C, Poffo C, Pretti Júnior E, Oliveira AE, Schlemper V, Niero R, Cechinel-Filho V, Bürger C. (2001). Preliminary evaluation of the hypoglycemic effect of some Brazilian medicinal plants, *Therapie* 56, 427-430.
- Numao S, Maurus R, Sidhu G, Wang Y, Overall CM, Brayer GD, Withers SG. (2002) Probing the role of the chloride ion in the mechanism of human pancreatic α -amylase, *Biochemistry* 41, 215-225.
- Oh WK, Lee CH, Lee MS, Bae EY, Sohn CB, Oh H, Kim BY, Ahn JS. (2005). Antidiabetic effects of extracts from *Psidium guajava*. *J. Ethnopharmacol.* 96, 411-415.
- Omichi K, Hase S, Ikenaka T. (1991). Examination of aglycone-binding site of human salivary alpha-amylase by means of transglycosylation reactions. *J. Biochem.* 109, 410-415.
- Perfumi M, Arnold N, Tacconi R. (1991). Hypoglycemic activity of *Salvia fruticosa* Mill. from Cyprus. *J Ethnopharmacol.* 34, 135-40.
- Porte D, Halter JB. (1981). The endocrine pancreas and diabetes mellitus. In *Textbook of Endocrinology*, 6th ed. (Williams R.H. ed.) W. B. Saunders Co., Philadelphia, 716-843.

- Ramasubbu N, Paloth V, Luo Y, Brayer GD, Levine MJ. (1996). Structure of human salivary α -amylase at 1.6 Angstromresolution: implications for its role in the oral cavity. *Acta Crystallogr. D52*, 435-446.
- Salt WB, Schenker S. (1976). Amylase-its clinical significance: A review of the literature. *Medicine* 55, 269-289.
- Sanchez de Medina F, Gamez MJ, Jimenez I, Jimenez J, Osuna JI, Zarzuelo A. (1994). Hypoglycemic activity of Juniper "berries". *Planta Med.* 60, 197-200.
- Statti G, Loizzo MR, Nadjafi F, Menichini F. (2006). Hypoglycaemic activity of two spices extracts: *Rhus coriaria* L. and *Bunium persicum* Boiss. *Nat. Prod. Res.* 20, 882-886.
- Subramanian R, Asmawi ZM, Sadikun A. (2008). *In vitro* alpha-glucosidase and alpha-amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. *Acta Biochimica Polonica* 55, 391-398.
- Tadera K, Minami Y, Takamatsu K, Matsuoka T. (2006). Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by flavonoids. *J Nutr Sci Vitaminol.* 52, 149-53.
- Tanaka S, Han LK, Zheng YN, Okuda H. (2004). Effects of the flavonoid fraction from *Ginkgo biloba* extract on the postprandial blood glucose elevation in rats. *Yakugaku Zasshi*, 124, 605-11.
- Teixeira VL, Rocha FD, Houghton PJ, Kaplan MAC, Pereira RC. (2007). Alpha-amylase inhibitors from Brazilian seaweeds and their hypoglycemic potential. *Fitoterapia* 78, 35-36
- Tolan I, Ragoobirsingh D, Morrison EY. (2001). The effect of capsaicin on blood glucose, plasma insulin levels and insulin binding in dog models. *Phytother. Res.* 15, 391-394.
- Tundis R, Loizzo MR, Statti GA, Menichini F. (2007a) Inhibitory effects on the digestive enzyme α -amylase of three *Salsola* species (Chenopodiaceae) *in vitro*. *Pharmazie*, 2007a, 62, 473-475.
- Tundis R, Loizzo MR, Statti GA, Houghton PJ, Miljkovic-Brake A, Menichini F. (2007b). *In vitro* hypoglycemic and antimicrobial activities of *Senecio leucanthemifolius* Poiret. *Nat. Prod. Res.* 21, 396-400.
- UTET (2004). *Dizionario medico*, 28, 1492-1498.
- Van Holde M. (1998). *Biochimica*, Casa editrice Ambrosiana.

World Health Organization Study Group (1985). Diabetes mellitus, *WHO Technical Report*, 727.

Zarzuelo A, Risco S, Gamez MJ, Jimenez J, Camara M, Martinez MA. (1990). Hypoglycemic action of *Salvia lavandulifolia* Vahl. spp. *oxyodona* contribution to studies on the mechanism of action. *Life Sci.* 47, 909-15.

CAPITOLO 3

Le malattie neurodegenerative: patogenesi e trattamento farmacologico

3.1. Introduzione

Le patologie neurodegenerative, nella loro varietà, sono tutte caratterizzate dalla perdita e dal deterioramento dei neuroni del Sistema Nervoso Centrale (SNC).

I maggiori disordini neurodegenerativi sono il Morbo di Alzheimer, il Morbo di Parkinson e la demenza a corpi di Lewy.

Il morbo di Parkinson è caratterizzato dalla perdita dei neuroni che producono il neurotrasmettitore dopamina con presenza di bassi livelli nella substantia nigra, area del cervello coinvolta nella regolazione dei movimenti. La mancanza di dopamina provoca una prevalenza dell'innervazione colinergica eccitatoria con tre manifestazioni caratteristiche: tremore, aumento del tono muscolare (ipertonia) e difficoltà a compiere movimenti volontari (acinesia).

L'approccio terapeutico mira ad aumentare i livelli della dopamina mediante la somministrazione di precursori del neurotrasmettitore mancante come la L-idrossifenilalanina (L-DOPA) o inibendo la classe degli enzimi deputata alla sua degradazione: le monoaminossidasi (MAO).

Oltre alle manifestazioni tipiche a livello motorio, il morbo di Parkinson comporta anche problemi a livello psichico con la cosiddetta "demenza associata al morbo di Parkinson" (PDD), il cui trattamento prevede l'utilizzo di inibitori delle colinesterasi, tra cui la rivastigmina.

Gli inibitori delle colinesterasi trovano impiego come trattamento farmacologico in un'altra importante forma di demenza: la demenza a corpi di Lewy.

Il morbo di Alzheimer è, invece, la forma più comune di demenza senile, caratterizzata da una profonda perdita della memoria, che comporta diverse difficoltà nella conduzione delle normali attività quotidiane.

I pazienti, per lo più ultrasessantenni, mostrano segni di disorientamento e di perdita globale delle facoltà intellettive con modificazioni della personalità e del comportamento. La malattia ha un decorso lento, ma inesorabilmente progressivo e

nelle fasi più avanzate si accentuano le complicanze a livello comportamentale con agitazione psicomotoria, aggressività, ostilità, episodi di vagabondaggio conseguenti all'incapacità di orientarsi nei luoghi oltre che nel tempo.

I pazienti manifestano disinteresse per l'ambiente circostante e per la cura di loro stessi, il che porta a denutrizione e disidratazione e facilità nelle infezioni e nelle cadute.

Nelle fasi più avanzate del morbo gli ammalati non sono più in grado di percepire, pensare, parlare e muoversi.

La terapia per il Morbo di Alzheimer comprende oltre che antipsicotici e sonniferi per regolare il ritmo sonno-veglia, farmaci inibitori dell'acetilcolinesterasi (AChE) l'enzima che degrada l'acetilcolina (ACh). L'acetilcolina è il neurotrasmettitore che risulta carente nelle regioni ippocampale e corticale del cervello dei malati.

Per il numero sempre crescente (si stimano circa 20 milioni di malati in tutto il mondo), per lo più di anziani, che si ammala di Alzheimer, la malattia suscita sempre più grande interesse per la ricerca di farmaci che ne inibiscano l'inevitabile decorso.

3.2. Il sistema colinergico

Il neurotrasmettitore coinvolto nella trasmissione colinergica è l'acetilcolina. Essa viene sintetizzata nel terminale presinaptico partendo dall'acetil coenzima A e dalla colina, reazione catalizzata dall'enzima colina-acetiltransferasi (ChAT). L'acetilCoA proviene dal metabolismo del glucosio e del piruvato, mentre la colina, in parte sintetizzata a partire dalla serina, è ottenuta da fosfolipidi di membrana quali fosfatidilcolina e lecitina; la maggior parte della colina è, però, ricavata dal riciclo conseguente alla degradazione dell'acetilcolina che avviene per idrolisi enzimatica.

La concentrazione del neurotrasmettitore nei terminali resta costante grazie alla regolazione della sua sintesi, che aumenta in condizioni di elevati stimoli.

Una volta sintetizzata, la maggior parte dell'acetilcolina è immagazzinata in vescicole di deposito presenti nei terminali presinaptici ad opera di una proteina trasportatrice specifica: Vesicular Acetylcholine Transporter (VAT).

L'ACh è immagazzinata nelle vescicole grazie all'azione di una pompa che scambia la carica positiva dell'azoto con un protone; la quota di ACh presente in queste vescicole è l'unica a svolgere l'azione di neurotrasmettitore. La restante parte è liberata nel citosol, dove è idrolizzata ad acetato e colina (Fig. 3.1).

La colina presente nel vallo sinaptico è trasportata nei terminali presinaptici ad opera di specifici sistemi di ricaptazione ad alta e bassa affinità. Di questi, quello ad alta affinità è deputato alla ricaptazione della colina che viene riciclata per la sintesi di nuova ACh.

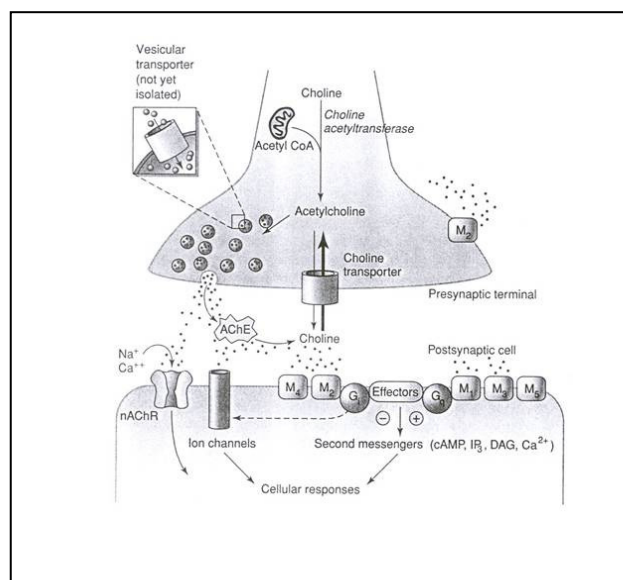


Figura 3.1. La sinapsi colinergica.

Il rilascio di acetilcolina dalle vescicole avviene in seguito a depolarizzazione di membrana con apertura dei canali al calcio e rilascio esocitosico dell'ACh. Una volta rilasciata nella sinapsi, l'acetilcolina può agire su auto-recettori presenti sulla stessa membrana presinaptica o su etero-recettori posti sulla membrana post sinaptica. L'ACh agisce su due classi recettoriali distinte: i recettori nicotinici e quelli muscarinici, i cui capostipiti sono rispettivamente la nicotina e la muscarina.

3.3. Le colinesterasi

Le colinesterasi sono gli enzimi che catalizzano la reazione d'idrolisi dell'acetilcolina. Si presentano in forma omodimerica, con un complesso proteico α,β -idrolasi (Houghton *et al.*, 2006) con un sito anionico che lega la testa cationica dell'ACh e un sito catalitico che ne determina l'idrolisi. Sono note due forme di colinesterasi: l'acetilcolinesterasi (AChE) e la butirrilcolinesterasi (BChE).

L'acetilcolinesterasi (vera o specifica) agisce specificamente sull'ACh, è situata sulle terminazioni nervose colinergiche e nelle giunzioni neuromuscolari, nei muscoli scheletrici e nella membrana eritrocitaria.

La butirrilcolinesterasi (pseudo-colinesterasi) è, invece, meno selettiva nei confronti di acetilcolina e butirrilcolina (BCh) (Fig. 3.2), presenta maggiore affinità nei confronti della butirrilcolina ed è presente principalmente nel fegato, nel plasma, nell'intestino, nel cuore, nei reni e nei polmoni ma si trova anche nel sistema nervoso. Entrambe le forme enzimatiche si riscontrano nei neuroni e nella glia. L'attività della BChE risulta essere di notevole importanza qualora venga a diminuire l'attività della AChE, fungendo da "riserva" (Ballard *et al.*, 2005).

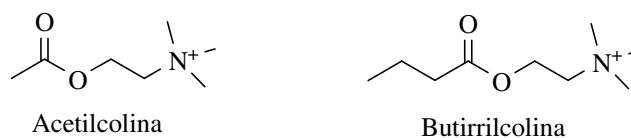


Figura 3.2. Struttura chimica di Acetilcolina (ACh) e Butirrilcolina (BCh).

3.3.1. L'enzima acetilcolinesterasi

L'acetilcolinesterasi (Fig. 3.3) è l'enzima che svolge la funzione di idrolisi dell'ACh in acetato e colina. E' uno degli enzimi più efficienti che si conoscano in quanto idrolizza 5000 molecole di acetilcolina per secondo per sito enzimatico, e ha la funzione di inattivare prontamente l'ACh presente nello spazio intersinaptico.

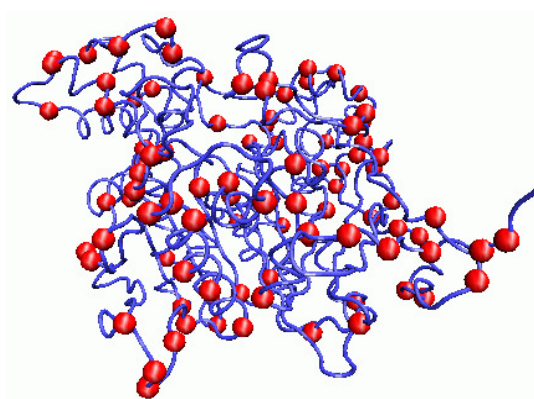


Figura 3.3. Acetilcolinesterasi.

L'AChE esiste in numerose forme molecolari con differenti domini C-terminali, risultanti da "splicing alternativo", classificate come segue:

- **S** ("Soluble") nel veleno dei serpenti;
- **R** ("Readthrough") ancorata mediante fosfolipidi di membrana. Recenti studi hanno dimostrato che questa isoforma enzimatica ha effetti neuroprotettivi rispetto alla tossicità indotta dalla fibrille β amiloidi (Berson *et al.*, 2008)
- **H** ("Hydrophobic") ancorata mediante glicofosfoinositolo (GPI);
- **T** ("Tail") con una coda di collagene, presente nei muscoli e nel tessuto nervoso di tutti i vertebrati;

L'AChE può avere diverse organizzazioni molecolari, si riconoscono infatti le seguenti forme Globulari (omomeriche) (Fig. 3.4):

- G1: monomeri (es. T1);
- G2: dimeri (es. H2 o T2);
- G4: tetrameri delle subunità T (T1, T2, T4);

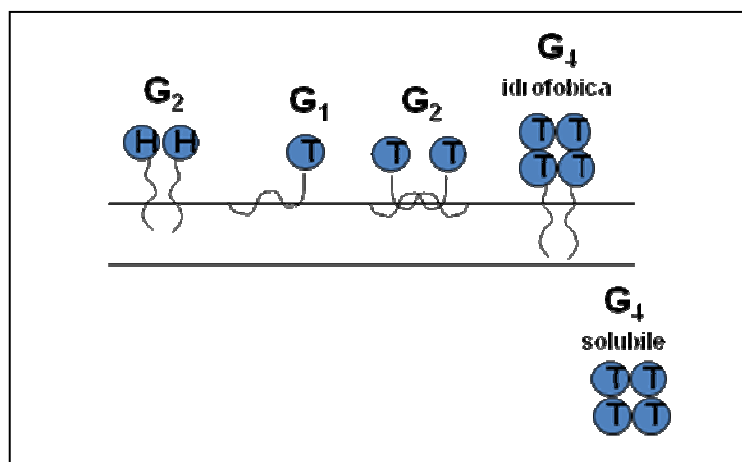


Figura 3.4. Forme globulari di AChE.

Nelle forme asimmetriche (eteromeriche) un diverso numero (X) di tetrameri si lega ad una coda di collagene che lega l'enzima all'eparansolfato della membrana basale; tra queste vi sono:

X= 1 (T₄-ColQ) → forma A₄

X= 2 (T₈-ColQ) → forma A₈

X= 3 (T₁₂-ColQ) → forma A₁₂ (giunzione neuromuscolare)

Per l'attacco della forma A12 dell'AChE alla membrana basale, recenti studi hanno dimostrato che mutazioni a carico del dominio C-terminale compromettono l'ancoraggio della coda di collagene (ColQ) e che sia il dominio C-terminale sia il dominio di legame per l'eparansolfato sono essenziali per l'ancoraggio di ColQ alla membrana basale (Kimbell *et al.*, 2004).

Tra le forme eteromeriche vi sono i PRiMA-tetrameri (Proline Rich Motif Attachments).

La struttura attualmente nota dell'AChE umana risale agli studi effettuati sulla TcAChE ottenuto dalla Torpedo Californica. La forma più diffusa è un omodimero (GP1-G2) con una struttura primaria che presenta omologia di sequenza del 74.6% con la forma enzimatica umana.

Il sito attivo dell'enzima è contenuto in una tasca ("gorge") all'interno di una complessa struttura di β -filamenti circondati da 12 α -eliche. Questo è costituito da un sito anionico che attrae la carica positiva dell'ACh e da un sito esterasico che lega il gruppo carbonilico dell'ACh (Fig. 3.5).

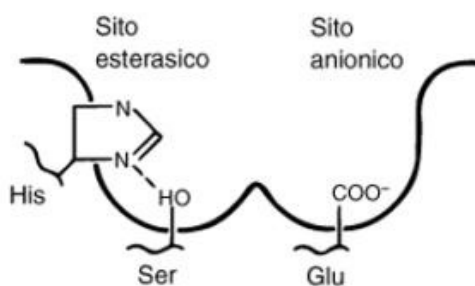


Figura 3.5. Sito anionico e sito esterasico dell'AChE

Quest'ultimo è composto dalla triade catalitica (His440, Ser200, Glu327) che, prima dell'interazione con il substrato, prevede la formazione di un legame idrogeno fra un azoto imidazolico dell'istidina e un idrogeno della serina. Tale interazione polarizza il legame idrogeno-ossigeno (Fig. 3.6) della stessa serina al fine di rendere l'atomo d'ossigeno più suscettibile a formare un legame con il carbonio carbonilico dell'ACh e a cedere l'idrogeno.

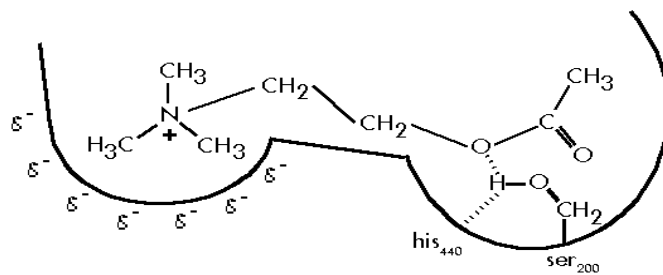
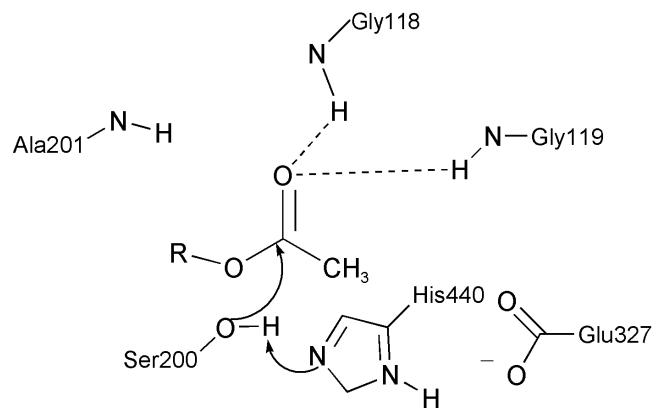


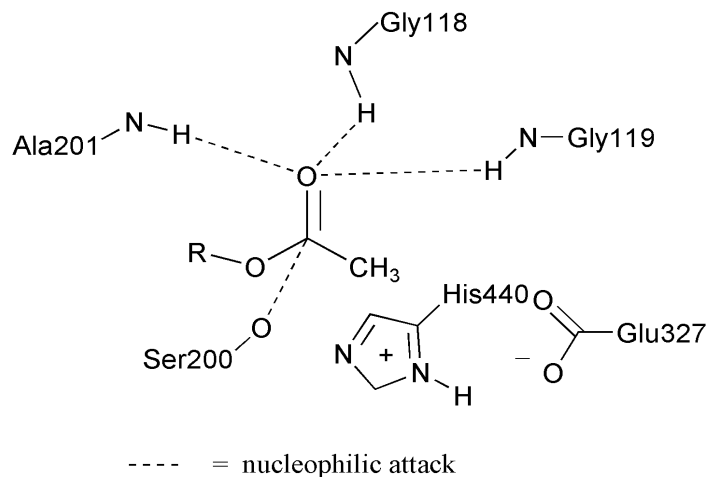
Figura 3.6. Polarizzazione legame idrogeno-ossigeno.

Il meccanismo d'azione prevede:

- l'attacco di un gruppo ossidrilico della serina (ser200) al carbonile dell'ACh



- il protone della serina è accettato dall'azoto imidazolinico di un residuo di istidina (His440);
- il protone legato all'azoto del nucleo imidazolinico passa sull'anione carbossilato di un glutammato (Glu327);
- allo stesso tempo, la carica negativa che si forma sull'ossigeno carbonilico dell'ACh è stabilizzata da ponti idrogeno con i residui Gly118, Gly119 e Ala201.



- oltre al *sito anionico* sono stati individuati altri due siti importanti per l'interazione enzima-substrato: il *sito acilico* costituito da due residui fenilalaninici (Phe288, Phe290) che limita le dimensioni dei substrati che possono interagire con il sito attivo (Zhang *et al.*, 2002) e il *sito anionico periferico* (PAS) che, lontano dal sito catalitico, varia notevolmente nelle differenti forme di AChE. Studi biochimici hanno dimostrato che l'AChE induce la formazione di fibrille di sostanza amiloide attraverso l'interazione con il sito anionico periferico dell'enzima formando complessi AChE- Peptide β amiloide (Abeta) ad alta tossicità. La neurotossicità indotta dal complesso acetilcolinesterasi-Abeta è maggiore di quella indotta dal peptide Abeta da solo (Inestrosa *et al.*, 2008).

Diventa, quindi, interessante la prospettiva di creare nuovi farmaci che agiscano oltre che sul sito attivo dell'enzima anche sul sito anionico periferico.

3.3.2. L'enzima butirrilcolinesterasi

In un cervello normale, l'AChE provvede all'80% dell'attività colinesterasica, mentre la BChE (Fig. 3.7) contribuisce a quest'attività per il restante 20%. Mentre, infatti, l'AChE è altamente selettiva per l'ACh, la BChE è meno substrato-specifica (è ancora oggetto di dibattito quale sia il suo substrato naturale), e provvede al metabolismo di diversi substrati inclusi alcuni peptidi neuroattivi (Taylor *et al.*, 1994). Questa minore specificità è principalmente dovuta alle diverse dimensioni e composizione dell'"active site gorge" dei due enzimi.

In particolare, il “*gorge*” dell’AChE presenta dimensioni più ridotte rispetto quello della BChE, a causa della presenza di diversi aminoacidi aromatici le cui catene laterali sporgono nel lume.

Nella BChE, invece, questi residui sono sostituiti da aminoacidi alifatici che lasciano, quindi, uno spazio maggiore, seppure con una forma più definita, per l’entrata e l’accomodazione del substrato. Questa differente composizione aminoacidica, inoltre, conferisce un diverso gradiente elettronegativo al gorge dei due enzimi, più idrofilo e fortemente polarizzato per l’AChE, più idrofobo e meno polarizzato per la BChE.

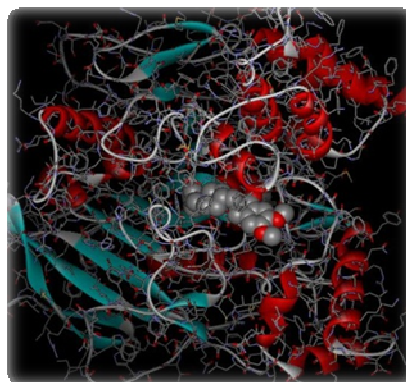


Figura 3.7. Butirilcolinesterasi

La butirrilcolinesterasi è un enzima co-regolatore nel sistema colinergico e la sua attività risulta notevolmente aumentata nel morbo di Alzheimer ed è associata con tutte le lesioni neuropatologiche caratteristiche della malattia. La ratio BChE/AChE nelle zone corticali affette da Morbo di Alzheimer, passa da 0.5 a 11 (Giacobini *et al.*, 1992). La BChE, come l’AChE, sembra essere coinvolta nella formazione delle placche senili, svolgendo un ruolo di maturazione delle stesse. Quando la BChE viene aggiunta al β amiloide in un tessuto in coltura essa ne aumenta la neurotossicità, confermando il potenziale ruolo dell’inibizione della BChE nell’AD. Inibitori selettivi della BChE rappresentano, infatti, un’importante terapia, determinando notevoli miglioramenti nella funzione cognitiva di topi in età avanzata e comportando un aumento del “long-term potentiation” (meccanismo implicato nella formazione della memoria) (Greig *et al.*, 2005).

L'importanza dell'uso di inibitori selettivi della BChE è stata dimostrata da recenti studi che hanno provato come derivati aril-amidici delle fenotiazine presentino un alto potenziale, in quanto capaci e di superare la barriera emato-encefalica e di aumentare inoltre i livelli di acetilcolina e facendo decrescere la formazione delle placche amiloidi tipiche del Morbo di Alzheimer (Darvesh *et al.*, 2007).

3.4. Le patologie neurodegenerative

Le patologie neurodegenerative si manifestano nelle società industrializzate e post-industrializzate, dove l'aspettativa di vita è piuttosto lunga. Il fattore comune di queste malattie è, infatti, l'avanzata età in cui solitamente si evidenziano i sintomi che comprendono demenza, tremori, perdita della memoria.

Le principali forme di demenza comprendono la demenza a corpi di Lewy (DLB), la demenza associata al morbo di Parkinson (PDD) e la malattia di Alzheimer (AD). La DLB rappresenta la seconda causa di demenze degenerative dopo l'AD, essendo presente nel 10-15% dei riscontri autoptici. La sintomatologia è caratterizzata dalla fluttuazione della cognitivtà, dai sintomi extrapiramidali, da allucinazioni visive in genere ben strutturate.

Dal punto di vista clinico, non è sempre facilmente distinguibile dalla demenza che complica la PDD; in genere un decadimento cognitivo che insorge entro un anno orienta la diagnosi verso una DLB. D'altronde una PDD è presente nel 10-80% dei parkinsoniani. Una corretta diagnosi è fondamentale per poter attuare un precoce intervento terapeutico.

3.4.1. Il Morbo di Alzheimer

Il morbo di Alzheimer prende il nome dal neurologo tedesco Alois Alzheimer, che nel 1907 ne descrisse i sintomi e gli aspetti neuropatologici. Il medico evidenziò particolari agglomerati nel tessuto cerebrale di una donna morta in seguito ad un'insolita malattia mentale. Questi agglomerati furono poi definiti "placche amiloidi". Dall'analisi post-mortem di tessuti cerebrali di pazienti affetti da Alzheimer, si è potuto riscontrare un accumulo extracellulare di una proteina, chiamata β -amiloide. Nei soggetti sani la β -amiloide è prodotta dalla APP (proteina progenitrice dell'amiloide) in

una reazione biologica catalizzata dall' α -secretasi che produce una β -amiloide costituita da 40 amminoacidi.

Per motivi non totalmente chiariti, nei soggetti malati l'enzima che interviene sull'APP non è l' α -secretasi ma una sua variante, la β -secretasi, che porta alla produzione di una β -amiloide anomala, costituita da 42 amminoacidi invece che 40. Tale β -amiloide non presenta le caratteristiche biologiche della forma naturale e tende a depositarsi in aggregati extracellulari sulla membrana dei neuroni. Tali placche neuronali innescano un processo infiammatorio che richiama macrofagi e neutrofilii i quali produrranno citochine, interleuchine e TNF alfa, che danneggiano irreversibilmente i neuroni e in modo particolare comportano una progressiva distruzione dei neuroni colinergici, responsabile di tutti i disordini cognitivi, di memoria e dell'apprendimento caratteristici della malattia (Fig. 3.8).

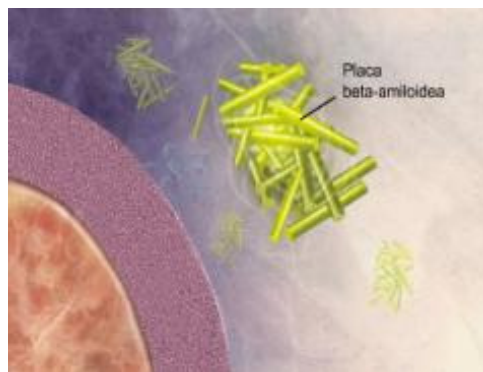


Figura 3.8. Placca β -amiloide

3.4.2. Patogenesi del Morbo di Alzheimer

Nel morbo di Alzheimer si riconoscono quattro principali eventi patogenici:

- ✓ Eventi primari: alterazioni genetiche, processi neuronali di apoptosi che portano a morte neuronale e disfunzioni cerebrali;
- ✓ Eventi secondari: formazione delle placche senili dovute all'aggregazione di β amiloide, iperfosforilazione della proteina *tau* con formazione di ammassi neurofibrillari, perdita sinaptica;
- ✓ Eventi terziari: deficit neurotrasmettitoriale, alterazioni neurotrofiche, processi neuro-infiammatori;

- ✓ Eventi quaternari: accelerata morte neuronale dovuta a reazioni di eccito tossicità, alterazioni nell'omeostasi del Ca^{2+} , formazione di radicali liberi, disfunzioni cerebrovascolari.

Tra la formazione delle placche di β -amiloide e l'iperfosforilazione della proteina *tau* sembra che il primo evento sia la "cascata amiloide". Infatti, il peptide (β A) isolato da Glenner e Wong nel 1984, lungo 42-43 aminoacidi, in grado di assemblarsi in strutture filamentose come dimostrato da Lansbury, determina una alterazione neurofibrillare. In particolare, gli aggregati β A extracellulari attivano una successione di eventi che porta le chinasi intracellulari a fosforilare in eccesso la proteina *tau*, con conseguente cambiamento delle sue proprietà chimiche ed avvio della formazione delle strutture neuro fibrillari (Haass *et al.*, 2007).

Placche amiloidi

La β A deriva da una proteina più grande, la proteina precursore dell'amiloide (APP), codificata dal cromosoma 21.

Le tappe fondamentali della sintesi dei peptidi β A (39-43 residui aminoacidici), a partire da APP, sono catalizzate da due enzimi: β -secretasi e γ -secretasi.

La β -secretasi, individuata nel 1999 (Vassar *et al.*, 1999), appartiene alla famiglia delle aspartil-proteasi. Gli inibitori di tale enzima non sono adatti alla sperimentazione clinica; le molecole risultano, infatti, troppo grandi per attraversare la barriera emato-encefalica.

La γ -secretasi è, invece, considerata l'enzima capostipite di una nuova classe di proteasi che trattengono acqua nella membrana cellulare per svolgere l'azione enzimatica. I geni presenilina 1 e 2, identificati da gruppo di Peter St. George-Hyslop come responsabili di gravi forme della malattia ad insorgenza precoce, codificano per un costituente della γ -secretasi. Il gene della presenilina 1, situato sul cromosoma 14, la cui mutazione aumenta l'attività delle secretasi β e γ e risulta responsabile del 4% dei casi precoci di malattia (con età d'insorgenza tra 28 e 50 anni).

Le mutazioni della presenilina aumentano i livelli di γ -secretasi e sono associate ad una forma aggressiva ed ereditaria dell'AD. Gli inibitori di questo enzima sono piccole molecole in grado di attraversare la barriera emato-encefalica; tuttavia, nella maggior parte dei casi non sono impiegabili a scopo terapeutico per gli effetti dannosi che

produrrebbero. Infatti, l'inibizione della γ -secretasi determina il blocco del recettore Notch, una proteina di superficie che genera un frammento endocellulare che si dirige verso il nucleo al quale invia un segnale specifico per definire la specializzazione cellulare. Placche senili si trovano anche nelle persone più anziane ma sane, sebbene in quantità molto ridotte. L'area ippocampale e limbica sono tra le più colpite dalla formazione di tali aggregati.

Matasse neurofibrillari

All'interno dei neuroni si producono particolari strutture anomale dette grovigli neuro fibrillari (o matasse neurofibrillari). Sono fasci di filamenti elicoidali che si accumulano in matasse del corpo cellulare (Fig. 3.9).

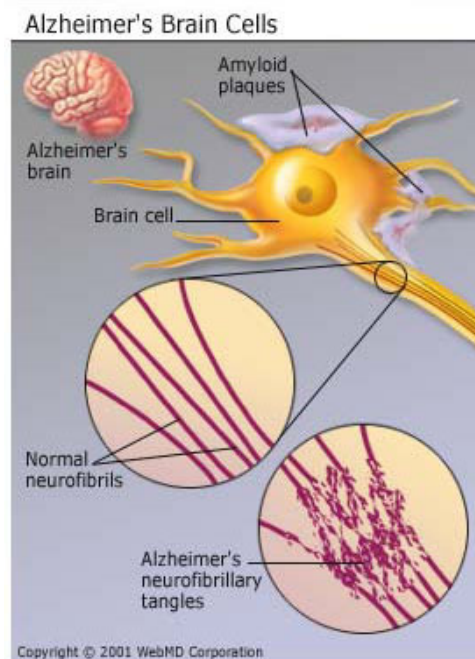


Figura 3.9. Matasse neurofibrillari e placche amiloidi in cellule neuronali

Le matasse si formano in neuroni di grandi dimensioni come nell'ippocampo, corteccia olfattiva, amigdala, nuclei del proencefalo basale e parecchi nuclei del tronco (anche *locus coeruleus* e del rafe).

Queste formazioni non assomigliano alle proteine normali del citoscheletro, ma sembrano derivare da strutture normali. Le matasse neurofibrillari si osservano anche in altre forme degenerative quali la sindrome di Down e la demenza dei pugili. Anche nel

cervello di persone normali si osservano qualche volta questi processi. Un gruppo di ricercatori italiani ha individuato un meccanismo molecolare riconducibile all'insorgenza del morbo di Alzheimer e al processo di "suicidio" progressivo dei neuroni.

La ricerca ha messo in evidenza il coinvolgimento di una proteina alterata, chiamata *tau*, nel processo di apoptosi, processo che, in pazienti normali avviene in modo controllato, ma che nei pazienti affetti da AD diventa incontrollato e si auto propaga.

I ricercatori hanno mostrato *in vitro*, che i frammenti 151 e 421 della proteina *tau* sono in grado di condurre alla morte i neuroni dell'ippocampo.

Questi frammenti proteici sono il risultato di processi post-traduzionali il che induce a pensare che non siano coinvolte mutazioni a carico del gene che codifica per *tau*. Mutazioni genetiche si ritrovano, invece, in altre forme di demenza associate al cromosoma 17.

La sua iperfosforilazione causa un disassemblamento dei microtubuli che compromette il micro-trasporto assonale e la funzione sia neuronale sia sinaptica. L'aggregazione della proteina *tau* produce fibrille insolubili in forma di strie aggrovigliate, il cui accumulo danneggia ulteriormente il tessuto (Fig. 3.10).

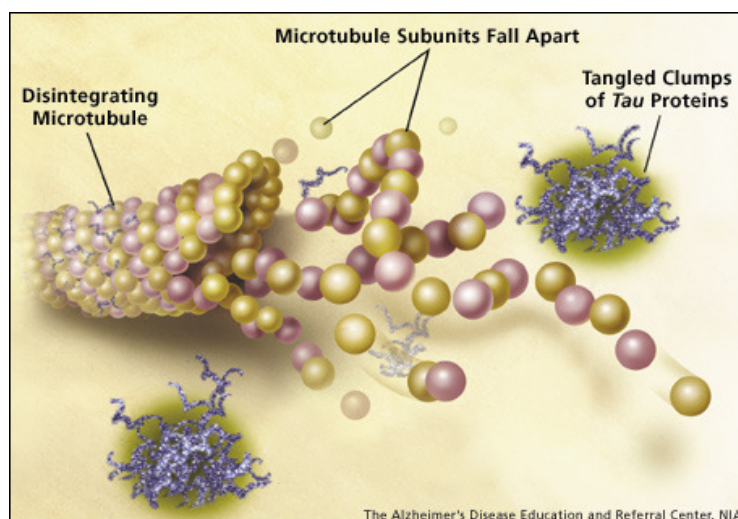


Figura 3.10. Disassemblamento microtubulare e proteina *tau*.

In uno studio precedente, gli autori avevano mostrato che le *tau* costituiscono un substrato per la proteasi apoptotica caspasi-3, un enzima coinvolto nei processi di morte cellulare. Secondo gli autori, la neurodegenerazione sarebbe perpetuata da un "processo

autocatalitico” nel quale anche un modesto stimolo pro-apoptotico (in grado di attivare la caspasi-3) favorirebbe la divisione di *tau* generando i frammenti pro-apoptotici.

Questo effetto è significativamente potenziato dall'incubazione con il peptide amiloide A-beta 25-35, un peptide incluso nei frammenti A-beta che costituiscono le placche senili extraneuronali.

Infiammazione

Tutti gli studi fisiopatologici condotti confermano l'accumulo di microglia intorno alle placche di β -amiloide (t'Veld *et al.*, 2001). Queste cellule eliminano fibre e prodotti di degradazione cellulare nel cervello, ma in questo processo rilasciano radicali liberi e citochine che attivano gli astrociti. Questi ultimi (la popolazione cellulare di maggiore dimensione nel Sistema Nervoso Centrale) provvedono al supporto metabolico dei neuroni ma conducono a un'attivazione ossidativa e danno in questo modo avvio alla cascata infiammatoria (Maccioni *et al.*, 2001).

Numerosi approcci antinfiammatori sono stati studiati per trattare l'AD. I cortisonici non si sono dimostrati efficaci, il celecoxib, un inibitore selettivo della ciclo-ossigenasi 2 (COX-2), non è risultato associato all'arresto della progressione della malattia, ma come altri antinfiammatori non steroidei (FANS) è risultato associato ad un effetto protettivo sul decorso confermando l'importanza del processo infiammatorio nella patogenesi (Ferencik *et al.*, 2001).

Atrofia cerebrale

Nei pazienti affetti da Alzheimer si osserva sovente una pronunciata atrofia corticale; si osserva una perdita di cellule nervose nelle aree cerebrali vitali per la memoria e per altre funzioni cognitive. Il lobo frontale, la parte anteriore del lobo temporale, il lobo parietale e l'ippocampo sono generalmente i più colpiti (Fig. 3.11).

A livello macroscopico, con l'evolvere della malattia, si assiste a livello dell'encefalo alla progressiva atrofia delle circonvoluzioni con corrispondente allargamento delle cavità ventricolari.

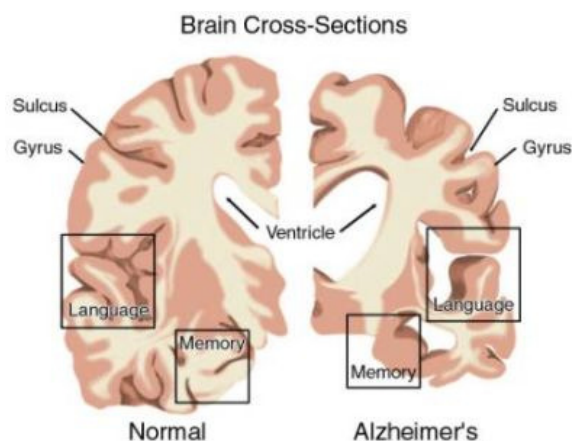


Figura 3.11. Comparazione di cervello normale e affetto da Alzheimer

Degenerazione dei neuroni colinergici del nucleo di Meynert

Le proiezioni di questo nucleo (struttura sottocorticale) si portano alla corteccia, all'ippocampo, all'amigdala, al bulbo olfattivo, al talamo e al tronco del encefalo. Il nucleo riceve afferenze dall'ipotalamo, l'amigdala, il mesencefalo e altri nuclei. La degenerazione del nucleo di Meynert può spiegare la grave diminuzione della concentrazione di ACh nella corteccia.

Degenerazione sinaptica

Nel cervello di soggetti affetti da Morbo di Alzheimer si riscontra la degenerazione delle strutture sinaptiche: vi è una diminuzione del numero di sinapsi, e carenza di sostanze proteiche presenti nelle sinapsi di cellule sane.

3.4.3. La diagnosi

Una delle richieste più sentite nella pratica clinica attuale è la possibilità di identificare i soggetti a rischio di sviluppare la malattia e lo sviluppo di strategie che possano modificare la progressione dell'espressione sintomatologica.

I fattori di rischio conosciuti per lo sviluppo della patologia includono l'età avanzata, condizioni di malnutrizione, dimensioni ridotte del cranio, traumi cranici pregressi e sesso femminile.

La diminuzione della sensibilità sensoriale con particolare riguardo alla vista e all'udito possono condurre il soggetto a perdita della capacità di relazione, depressione

con un aumento di rischio di demenza. Molti soggetti presentano lievi segni di deterioramento cognitivo, ma utilizzano strategie compensative nelle attività quotidiane. Solo il 20% di questi soggetti andrà incontro a demenza (Wolf *et al.*, 1998). Una valutazione standardizzata capace di fornire indicazioni specifiche sullo sviluppo della malattia di Alzheimer non è ancora disponibile. I test cognitivi proposti su una popolazione anziana non selezionata producono molti falsi positivi per le differenze culturali, di scolarità e legate al tono dell'Umore del soggetto.

Attualmente si considera che i soggetti a rischio di sviluppare la malattia dovrebbero essere sottoposti ogni 6-12 mesi a valutazioni cognitive come il Mini-Mental Status Examination o il Clock Drawing Test (Suderland *et al.*, 1989) (Fig. 3.12).

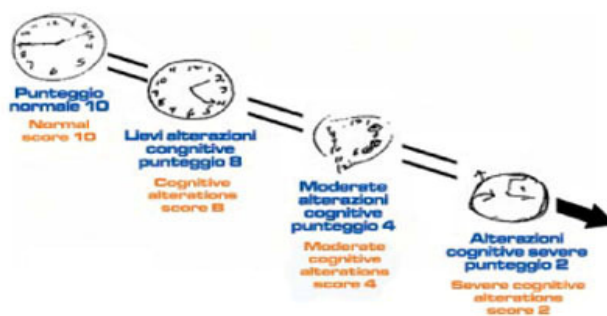


Figura 3.12. Clock Drawing Test

Nel caso si osservi un declino di tre punti tra una valutazione e l'altra i soggetti devono essere considerati a rischio di esordio.

Bisogna comunque chiarire che l'unico metodo certo di diagnosi del morbo di Alzheimer resta la biopsia o l'autopsia post-mortem.

Bioimmagini

Le neuroimmagini (TC e RM) possono aumentarne l'accuratezza di una diagnosi prettamente clinica (Fig. 3.13). Anche se non specifica, la misurazione dell'atrofia dell'ippocampo può aggiungere un'ulteriore conferma. La PET con l'uso del 18-F-fluoro-deossi-glucosio si è rivelata sensibile e specifica nel differenziare l'AD dai soggetti normali di pari età, oltre che tra varie forme di demenza degenerativa.

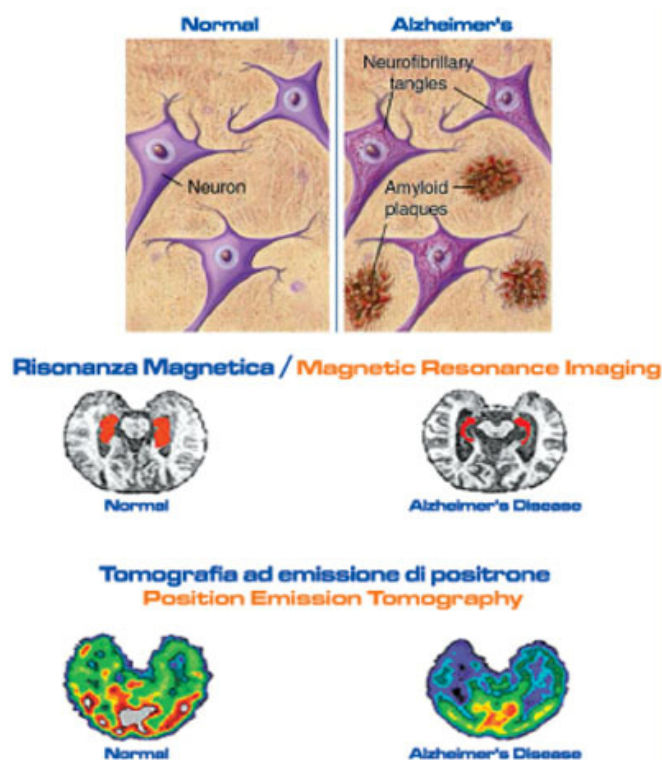


Figura 3.13. Risonanza Magnetica e Pet per la diagnosi del Morbo di Alzheimer.

Più recentemente alcuni derivati tioflavinici (Tioflavin PIB) si sono dimostrati capaci di marcare la presenza di placche di A β fibrillare nel SNC di cave di laboratorio.

Anamnesi

- ✓ Anamnesi familiare, per verificare precedenti neurologici, demenziali o depressivi nella famiglia del paziente.
- ✓ Anamnesi remota, per conoscere eventuali patologie sofferte dal paziente nella sua vita. Pare, ad esempio, che i traumatizzati cranici abbiano maggiori probabilità di sviluppare la demenza di Alzheimer. L'analisi remota è inoltre utile per compiere un'analisi differenziale: se il paziente ha sofferto, in passato, di depressione, è possibile che i sintomi siano da attribuire a pseudodemenza depressiva.
- ✓ Anamnesi recente dei sintomi che hanno portato il paziente o i suoi familiari alla valutazione neuropsicologica.

È importante poter contare, nella diagnosi, sulla testimonianza di un parente in modo da poter verificare la veridicità delle informazioni riportate dal paziente. La correttezza

e l'accuratezza che il paziente dimostra nel rispondere alle domande del medico costituiscono un ottimo strumento qualitativo per valutare il suo livello cognitivo. Se il paziente riesce a riportare correttamente le patologie remote, i sintomi recenti, gli esami e le visite cui è stato sottoposto difficilmente si può sospettare un quadro demenziale. In questo caso, se il paziente riferisce un tono depresso dell'umore, è lecito ipotizzare una forma di pseudodemenza depressiva.

3.4.4. I sintomi

I principali sintomi sono:

- ✓ Amnesia: in particolare amnesia anterograda, cioè i pazienti tendono ad avere un buon ricordo degli eventi remoti, ma non a ricordare gli eventi recenti;
- ✓ Aprassia: difficoltà nel compiere le azioni comuni;
- ✓ Anomia: l'incapacità a denominare un oggetto, pur riconoscendolo;
- ✓ Disorientamento spazio-temporale: l'incapacità di riconoscere il luogo in cui si trova o di ricordare la data, il giorno, il mese o l'anno;
- ✓ Acalculia: l'incapacità di svolgere elementari operazioni matematiche;
- ✓ Agrafia: la difficoltà di scrittura;
- ✓ Cambiamenti nel tono dell'umore: tendenza a mostrare repentini, marcati ed ingiustificati cambiamenti dell'umore, che vanno dalla depressione, all'euforia, al pianto. E' comune un'insorgenza d'ansia, insonnia, agitazione;
- ✓ Sintomi psicotici e modificazione della personalità: l'assunzione di comportamenti bizzarri, rozzi, eccentrici o aggressivi, comunque significativamente differenti dal profilo di personalità pre-morbo. Fra i sintomi psicotici si annoverano allucinazioni, paranoia, pensieri non realistici e deliri (solitamente di persecuzione);
- ✓ Perdita della capacità di giudizio: compiere errori di giudizio o di valutazione grossolane nelle attività quotidiane o nel proprio lavoro;
- ✓ Perdita totale degli interessi e di iniziativa.

3.4.5. Il decorso

Il Morbo di Alzheimer una malattia progressiva che si sviluppa a stadi, distruggendo gradualmente le funzioni cognitive.

Nella fase iniziale il sintomo più comune può essere una lieve smemoratezza: in particolare la persona può presentare difficoltà nel ricordare eventi recenti, i nomi di persone o di oggetti conosciuti e nell'eseguire nuovi compiti, oppure può ripetere le stesse domande durante le conversazioni. Si assiste al calo delle capacità di esercitare abilità funzionali o sociali complesse come ad esempio pagare i conti o gestire le finanze o programmare una cena per gli ospiti. I malati possono avere difficoltà nel lavoro e possono mostrare cambiamenti di personalità o diventare depressi.

Nella fase intermedia i problemi di linguaggio e di movimento diventano manifesti: appaiono la parafasia e l'anomia, cioè i pazienti diventano incapaci di trovare le parole giuste per definire gli oggetti, fino a non sapere più esprimersi del tutto.

Il danno della memoria si accentua e in più si aggiungono episodi confusionali transitori, errori di valutazione e trascuratezza (si smarriscono facilmente e non hanno una chiara comprensione di ciò che accade intorno a loro). Emerge anche aprassia costruttiva e aprassia d'abbigliamento, per cui i malati iniziano ad avere problemi a vestirsi in modo adeguato senza essere controllati, a curare l'igiene personale e dimenticare di svolgere semplici compiti, come ad esempio lavarsi i denti o pettinarsi.

Con il passare del tempo gli individui perdono interesse a ciò che li circonda, per la prima volta possono presentare alterazioni dell'umore, improvvise ed imprevedibili alterazioni della personalità o scoppi di ira inusuali per loro.

La fase finale è caratterizzata da grave confusione e disorientamento. I malati sviluppano seri problemi di mobilità, diventano incontinenti, incapaci di camminare e cadono con frequenza; perdono la capacità di parlare in modo chiaro e di svolgere le abituali attività quotidiane, come mangiare.

Possono avere luogo allucinazioni e deliri. Si rende necessaria un'assistenza totale. La gravità del quadro demenziale può aumentare la probabilità di insorgenza di altre patologie organiche e riduce di molto l'aspettativa di vita. Queste condizioni intervengono dopo 7-10 anni dall'insorgenza della malattia, anche se la progressione può essere più o meno rapida (da un minimo di tre a un massimo di quindici anni).

3.4.6. Il trattamento farmacologico

Inibitori delle colinesterasi

Il trattamento sintomatico del Morbo di Alzheimer è centrato sull'aumento della neurotrasmissione colinergica. Gli anticolinesterasici classici avevano due proprietà che li rendevano pressoché inutilizzabili: mancanza di specificità tra effetti periferici e centrali e un'emivita plasmatica e biologica troppo breve.

Questo comportava la necessità di somministrare dosi i cui effetti periferici sgraditi superavano di gran lunga ogni eventuale efficacia benefica di tipo cognitivo.

I nuovi farmaci inibitori delle colinesterasi (AChE-I) come tacrina, donepezil, rivastigmina e galantamina si sono dimostrati efficaci nel ritardare la progressione della malattia. La tacrina è stata il primo anticolinesterasico utilizzato sistematicamente in clinica nell'AD.

Nel 1998 un'analisi condotta sulla tacrina da Qizilbash e collaboratori ha permesso il raggiungimento delle seguenti conclusioni: "L'inibizione delle colinesterasi da tacrina sembra ridurre il deterioramento delle capacità cognitive durante i primi tre mesi di trattamento e determina un miglioramento clinico globale. Gli effetti osservati sulle misure dei disturbi comportamentali erano di discutibile significato clinico, e l'autonomia funzionale non era influenzata in maniera significativa. La rilevanza clinica e i benefici dell'inibizione della AChE restano controverse e sono necessari trial clinici di maggiore durata". La tacrina è oggi praticamente obsoleta per la mancanza di selettività sulle acetilcolinesterasi cerebrali, che ne riduce la validità in termini di sicurezza in clinica. Essa blocca, infatti, sia l'AChE sia la BChE e possiede un effetto inibitorio sui colinocettori M1 e M2. Manifesta, inoltre, un'importante tossicità epatica con aumento reversibile dei livelli di AST (aspartato aminotransferasi) e di ALT (alanina aminotransferasi) tali da richiedere la riduzione della dose o la sospensione del trattamento (Rice *et al.*, 2001).

I principi attivi che sono impiegati oggi sono dotati di un'emivita plasmatica tale da consentire una, o al massimo, due somministrazioni giornaliere e una certa selettività per le AChE del Sistema Nervoso Centrale.

Il donepezil (Aricept®) è un inibitore reversibile dell'AChE che può essere somministrato una sola volta al giorno. La posologia prevede una somministrazione di 5 mg al giorno per via orale alla sera. Il trattamento deve proseguire per almeno un mese

prima di poter riscontrare le prime risposte cliniche. La dose potrà essere aumentata a 10 mg/die sempre in un'unica somministrazione giornaliera. Il farmaco non dovrebbe essere somministrato in gravidanza e comporta vari effetti collaterali: nausea, vomito, anoressia, diarrea, stanchezza, insonnia, cefalea, vertigini, rash cutaneo, prurito, blocco seno-atriale e atrio-ventricolare ed epatite.

La galantamina (Reminyl®), è un alcaloide terziario, inibitore selettivo, competitivo e reversibile dell'AChE. In aggiunta, questo inibitore aumenta l'azione intrinseca dell'ACh sui recettori nicotinici, probabilmente legandosi ad un sito allosterico del recettore. Di conseguenza, si può ottenere una aumentata attività nel sistema colinergico associata ad un miglioramento della funzione cognitiva nei pazienti con demenza di tipo Alzheimer. Deve essere somministrata due volte al giorno preferibilmente al mattino e alla sera. La dose iniziale raccomandata è di 8 mg/die. Il farmaco mostra vari effetti collaterali, tra cui insufficienza epatica e renale importanti oltre a nausea, vomito, diarrea, dolori addominali, dispepsia, anoressia, astenia, calo di peso, cefalea, sonnolenza tremore, sincopi e bradicardia grave.

La rivastigmina (Exelon®) è un inibitore dell'AChE di tipo carbamidico, che facilita la neurotrasmissione colinergica, rallentando l'inattivazione dell'acetilcolina rilasciata dai neuroni colinergici funzionalmente integri. La rivastigmina interagisce con il suo enzima bersaglio formando un complesso a legame covalente che inattiva temporaneamente l'enzima.

Nell'uomo, una dose orale di 3 mg riduce l'attività dell'acetilcolinesterasi a livello del liquido cerebrospinale di circa il 40% nella prima ora e mezza dalla somministrazione. L'attività dell'enzima ritorna ai livelli basali dopo circa 9 ore dal raggiungimento dell'effetto inibitorio massimo.

Nei pazienti con malattia di tipo Alzheimer, l'inibizione dell'AChE a livello del liquido cerebrospinale ad opera della rivastigmina è risultata dipendente dalla dose fino a 6 mg somministrata due volte al giorno, che è stata la massima dose testata. La dose iniziale raccomandata è di 1.5 mg due volte al giorno. Se questa dose risulta ben tollerata per almeno due settimane di trattamento, potrà essere aumentata a 3 mg due volte al giorno. Successivi aumenti a 4.5 e poi a 6 mg due volte al giorno dovranno sempre basarsi sulla buona tollerabilità, per almeno due settimane, della dose in corso di somministrazione. Se durante il trattamento compaiono effetti avversi (es. nausea,

vomito, dolore addominale, perdita dell'appetito) o perdita di peso, questi potrebbero rispondere alla sospensione di una o più dosi del farmaco. In caso di persistenza degli effetti collaterali la dose giornaliera deve essere temporaneamente ridotta alla dose precedente ben tollerata. Gli effetti avversi più frequenti sono astenia, anoressia, vertigini, nausea, sonnolenza e vomito. Le donne sono risultate maggiormente sensibili a nausea, vomito, perdita dell'appetito e perdita di peso. Altri frequenti effetti avversi sono stati dolore addominale, traumi accidentali, agitazione, confusione, depressione, diarrea, dispepsia, cefalea, insonnia, infezioni delle vie respiratorie superiori e infezioni delle vie urinarie. Comuni sono anche: aumentata sudorazione, malessere, perdita di peso e tremore.

Raramente compaiono casi di angina pectoris, ulcera gastrica e duodenale, emorragia gastrointestinale, bradicardia, convulsioni, rash e sincope, blocco atrioventricolare.

Eparino-inibitori

L'eparina è un eteropolisaccaride a struttura octaciclica che svolge nel sangue la funzione di anticoagulante naturale, ma che è anche in grado di legarsi ai peptidi β A aumentandone criticamente la capacità di aggregarsi e formare depositi di amiloide. Il contrasto dell'azione eparinica sembra avere un buon effetto sulla riduzione delle placche. L'Alzhemed®, prodotto dalla Neurochem, è una piccola molecola in grado di legarsi su β A agli stessi siti dell'eparina, prevenendone l'effetto aggregante. Alcuni chiamano eparino-mimetico questo farmaco, ma la definizione non è corretta perché, considerando il meccanismo d'azione, si dovrebbe, al più, parlare di inibitore competitivo. L'Alzhemed® sembra avere scarsa o nulla tossicità ed è giunto alla III fase di sperimentazione clinica (Aisen *et al.*, 2007).

Farmaci antinfiammatori

In uno studio condotto da Martin e collaboratori, pubblicato nell'edizione on line degli Archives of Neurology nel 2008, afferma che a fronte di molte evidenze contrarie né il celecoxib né il naproxene sarebbero in grado di preservare la funzionalità mentale. Precedenti studi avevano attestato un potenziale ruolo dei farmaci antinfiammatori nell'inibire la produzione di alcune molecole coinvolte nel processo infiammatorio.

Secondo alcuni con un ruolo generale, poiché il processo degenerativo alla base della malattia di Alzheimer è essenzialmente infiammatorio, secondo altri con un ruolo più specifico di inibizione diretta della sintesi della proteina beta-amiloide. Il nuovo trial clinico evidenzia come i FANS fino a quattro anni di assunzione non rallentano il declino della funzionalità mentale. L'unica evidenza, ma molto blanda, riguarda il naproxene ed è negativa visto che indurrebbe un leggero declino cognitivo.

Vitamina E

La vitamina E, una vitamina antiossidante liposolubile, elimina i radicali liberi presenti nelle placche di β -amiloide. In studi su animali riduce la degenerazione dei neuroni ippocampali. In studi condotti *in vivo* ha dimostrato di rallentare la progressione della malattia di Alzheimer.

Estrogeni

La somministrazione di estrogeni in pazienti femminili appare efficace nel migliorare lo stato cognitivo, la memoria e l'attenzione.

3.5. Inibitori delle colinesterasi di origine naturale

L'avvento dell'ipotesi che collegava il Morbo di Alzheimer a bassi livelli di acetilcolina nel cervello (Perry *et al.*, 1978) ha trovato una importante applicazione per questa classe di composti.

La ricerca di nuovi composti di origine naturale ha permesso l'isolamento di numerosi farmaci, che trovano impiego nel trattamento delle patologie neurodegenerative. Sono di seguito riportate alcune classi di principi attivi di origine naturale con attività anticolinesterasica.

Terpenoidi

I terpenoidi comprendono un ampio gruppo di prodotti naturali formati a partire da un comune precursore: l'acido mevalonico.

L'effetto che profumi e altri prodotti contenenti sostanza volatili avevano sul SNC ha destato molto interesse negli scorsi anni e nella prima metà degli anni '90 si è valutata l'attività dei monoterpeni come inibitori dell'acetilcolinesterasi, partendo dal

presupposto che le piante contenenti monoterpeni avevano un buon effetto sulla memoria (Perry *et al.*, 1996).

Uno di questi gruppi di piante è costituito dalle specie di *Salvia*.

L'estratto etanologico e l'olio essenziale di *S. officinalis* L. (Labiatae) e *S. lavandulaefolia* Vahl. (Labiatae), testati per valutare l'attività anticolinesterasica, hanno mostrato inibizione dell'enzima a dosi relativamente basse (Perry *et al.*, 1996).

La *Melissa officinalis* L. (Labiatae) è un'altra specie ricca in monoterpeni nel suo olio essenziale. La pianta è nota nella medicina tradizionale da più di 2000 anni (Yarnell *et al.*, 1998). In recenti studi si è dimostrato che pazienti affetti da Morbo di Alzheimer dimostravano significativi miglioramenti della funzione cognitiva rispetto al placebo (Akhondzadeh *et al.*, 2003). Numerosi monoterpeni sono stati identificati nell'olio essenziale della pianta, tra cui citrale (una miscela degli isomeri gerianale e nerale) e citronellale, noti per essere inibitori dell'AChE (Ryan *et al.*, 1988).

Altri composti ad attività anticolinesterasica sono: la cumarina auraptene e il sesquiterpene nootkatone, isolati da *Citrus paradisi* (Miyazawa *et al.*, 2001). Miyazawa e collaboratori nel 1997 hanno riportato l'attività inibitoria dell'enzima acilcolinesterasi di diciassette monoterpeni (idrocarbonici, alcolici, chetonici).

Lo studio ha rivelato che i monoterpeni chetonici sono più potenti degli alcoli e che gli idrocarbonici hanno la stessa potenza dei monoterpeni alcolici, tranne i composti: α -terpinene e *p*-ment-1-ene, che mostravano la stessa potenza dei terpeni chetonici. In particolare, l' α -terpinene presentava la stessa potenza inibitoria del pulegone.

La comparazione dell'attività dei composti ha permesso di trarre alcune considerazioni generali: la presenza nei composti di un doppio legame e di un gruppo isopropilico aumenta la potenza inibitoria, mentre la presenza di un gruppo isopropenilico la diminuisce (Miyazawa *et al.*, 1997).

Appartiene alla famiglia delle Labiatae anche l'*Origanum majorana* L., che ha mostrato la più alta attività rispetto alle 139 specie di piante medicinali indiane studiate.

Il componente attivo si è dimostrato il triterpene acido ursolico con un valore di IC₅₀ di 7.5 nM. Questo si è dimostrato di fondamentale importanza per il miglioramento della memoria e le relative condizioni del Morbo di Alzheimer.

In un altro studio Miyazawa *et al.* (1998) hanno dimostrato come tra i terpeni isolati dagli oli essenziali di varie specie di *Mentha* i composti viridiflorolo ed elemolo, pur

mostrando la maggiore attività AChE inibitoria (Fig. 3.14), non si sono rivelati più potenti degli stessi oli essenziali.

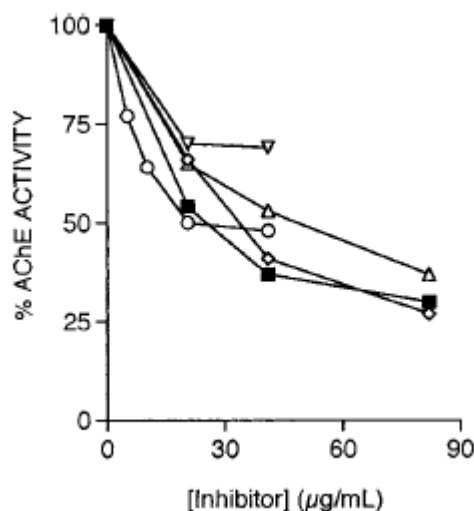


Figura 3.14. Effetto degli oli essenziali delle specie di *Mentha* sull'AChE (■) *Mentha aquatica*, (◇) elemol, (▽) mentofurano, (○) viridiflorolo, (Δ) 1,8-cineolo

Tra le specie sottoposte a screening, *Mentha aquatica*, contenente alcoli sesquiterpenici, ha esibito la maggiore attività inibitoria (IC₅₀ di 26 µg/ml), insieme con *M. gentilis* (*Fukuyama-hakka*), *M. gentilis* (*Akita-hakka*) e *M. arvensis* (*Nihon-hakka*), con valori di IC₅₀ compresi tra 28 e 32 µg/ml.

Il *Ginkgo biloba* (Coniferae) è usato nella medicina tradizionale iraniana per disturbi della memoria associati a problemi della circolazione del sangue (Ross, 2001). EGb 761 estratto da *G. biloba* ha mostrato favorevoli effetti sulla circolazione cerebrale e sul metabolismo delle cellule neuronali (Heiss & Zeiler, 1978; Loffler *et al.*, 2001; Tea *et al.*, 1987), sul sistema colinergico muscarinico (Kristofikovà *et al.*, 1992) e ha mostrato anche attività antiossidante (Barth *et al.*, 1991; Marcocci *et al.*, 1994; Topic *et al.*, 2002). EGb761 si è dimostrato anche neuroprotettivo contro il peptide β-amiloide e verso la tossicità *in vitro* indotta da nitrossido d'azoto (Bastianetto *et al.*, 2000a, 2000b).

Lo stesso estratto ha mostrato attività anti-apoptotica sia *in vitro* sia *in vivo* (Schindowski *et al.*, 2001; Yao *et al.*, 2001).

Alcaloidi a nucleo indolico

Uno dei più antichi e noti inibitori delle colinesterasi è l'alcaloide fisostigmina (**1**), anche chiamato eserina. Questo fu isolato originariamente dal fagiolo Calabar, i semi di *Physostigma venenosum* Balf., nel XIX secolo. Gli effetti tossici dell'estratto del fagiolo Calabar si scoprì che erano dovuti ad un'eccessiva stimolazione colinergica, che provocava eccessiva salivazione, nausea, bradicardia, crampi muscolari e problemi respiratori, ed effetti sul SNC, come agitazione. L'eccesso di attività colinergica era dovuto all'inibizione della rapida degradazione dell'ACh da parte della fisostigmina. La fisostigmina è distribuita in tutto il corpo e determina dunque un effetto colinergico generale, ma è abbastanza polare da non raggiungere ampie concentrazioni nel SNC.

Test condotti su eritrociti bovini dimostrano che l'alcaloide è un effettivo AChE-I con un valore di IC₅₀ di 0.25µM. E' stato dimostrato che il gruppo carbonilico interagisce con l'OH di una serina localizzata nell'AChE, interferendo con l'attività dell'enzima. Oltre ad essere un inibitore dell'AChE, la fisostigmina inibisce anche la BChE, con i conseguenti disturbi gastrointestinali. Studi recenti hanno provato che la BChE è coinvolta nell'eziologia e nella progressione della malattia di Alzheimer (Greig *et al.*, 2001), per cui gli inibitori di BChE come fisostigmina e rivastigmina (**2**) potrebbero avere un'efficacia clinica superiore agli inibitori selettivi di AChE.

Per comprendere al meglio il profilo farmacocinetico della fisostigmina sono stati sintetizzati e studiati numerosi suoi analoghi. Tra questi la neostigmina (**5**), un'ammina quaternaria che ha la capacità di attraversare la barriera emato-encefalica, caratteristica importante nel trattamento farmacologico dell'AD.

La rivastigmina fu prodotta con il proposito di migliorare il profilo farmacocinetico per l'utilizzo nel Morbo di Alzheimer; essa inibisce la forma G1 dell'AChE nella corteccia e nell'ippocampo, aree del cervello coinvolte nelle attività cognitive (Polinsky *et al.*, 1998), determinando un miglioramento di suddette attività nei pazienti affetti da AD (Spencer *et al.*, 1998).

Alcaloidi isochinolinici

La galantamina (**3**) isolata dal *Galanthus woronowii* (Amaryllidaceae) è un inibitore reversibile e competitivo dell'AChE, che aumenta la funzione cognitiva nei pazienti affetti da Morbo d'Alzheimer (Thomsen *et al.*, 1990).

L'alcaloide si è dimostrato molto più attivo nei confronti dell'AChE rispetto alla BChE (Fulton *et al.*, 1996), ma è stato recentemente dimostrato che agisce direttamente sui recettori nicotinici aumentando il rilascio di acetilcolina (Maelicke *et al.*, 2001).

La stimolazione che effettua sui recettori nicotinici fa della galantamina un AChE-I più vantaggioso rispetto agli altri composti, poiché i recettori nicotinici modulano anche il rilascio pre-sinaptico dell'ACh, aumentando il rilascio della stessa.

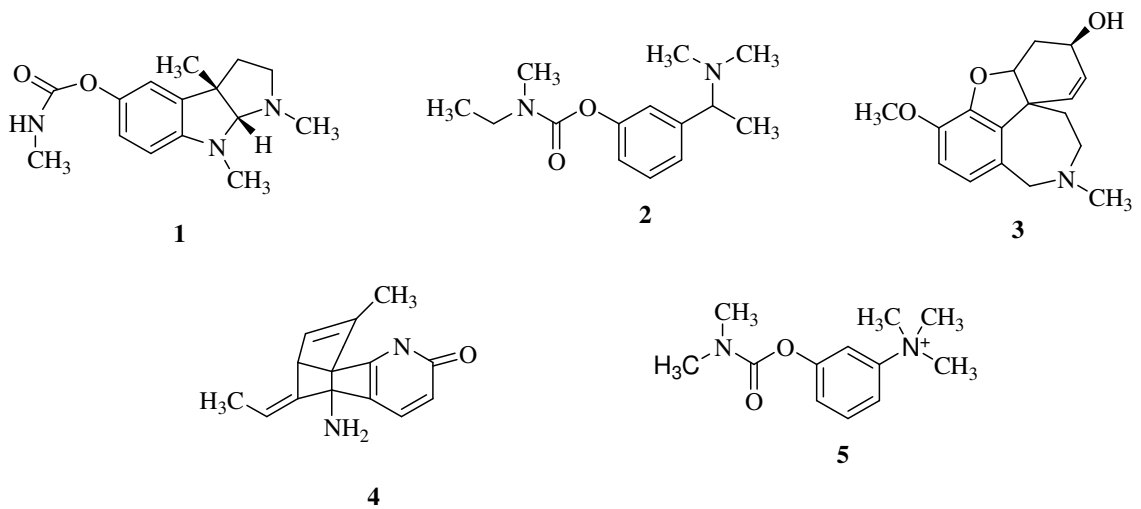
L'attivazione di tali recettori aumenta, inoltre, anche il rilascio di altri neurotrasmettitori, come il glutammato, che hanno un ruolo importante nel mantenimento della memoria. La sua attività di inibitore delle colinesterasi è stata scoperta in Bulgaria nella metà del ventesimo secolo per il trattamento dei malati di polio, ma sono nell'ultima decade del ventesimo secolo è stata riconosciuta la sua importanza nel trattamento dell'AD.

Alcaloidi chinolidinici

A questa classe appartiene l'alcaloide uperzina A (4), che migliora in maniera significativa la memoria e il comportamento in pazienti affetti da AD con una maggiore selettività per AChE rispetto alla BChE.

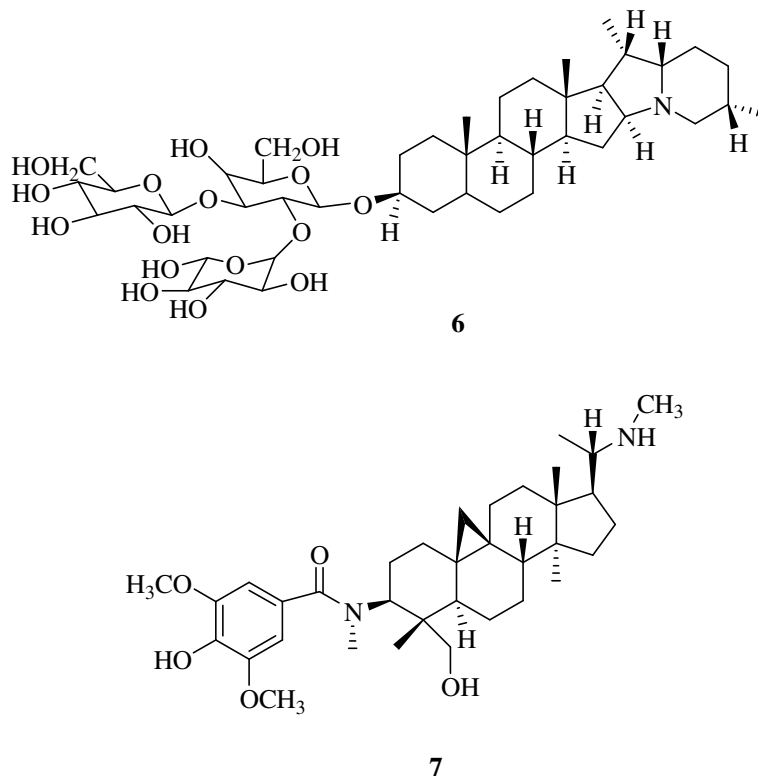
L'alcaloide è risultato, inoltre, meno tossico di donepezil e tacrina (Small *et al.*, 1997; Shu, 1998). Questa molecola si è dimostrata neuroprotettiva contro il frammento 25-53 della β -amiloide e contro la citotossicità indotta da radicali liberi (Xiao *et al.*, 2002).

La sintesi di ibridi uperzina A-tacrina ha aperto la strada a una nuova classe di potenti e selettivi inibitori della *Torpedo Californica* AChE (TcAChE). Oltre all'uperzina A è riconosciuto come AChE-I anche l'uperzina B isolato anch'esso da *Hupertia serrata* (Lycopodiaceae). Questo alcaloide agisce come inibitore reversibile dell'AChE con una potenza notevole ($K_i = 0.79 \mu\text{M}$) e presenta un indice terapeutico più alto dovuto alla più lunga durata d'azione rispetto all'uperzina A.



Alcaloidi a nucleo steroideo

Gli alcaloidi steroidei sono stati ritrovati in un numero relativamente piccolo di famiglie di piante, tra cui le Solanaceae, la cui tossicità può essere ascritta alla presenza di questi composti.



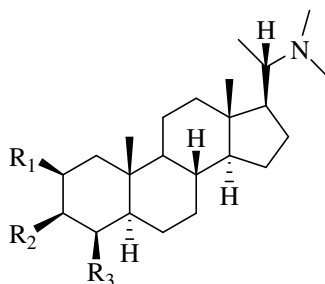
L' α -solanina (**6**) e α -caconina, estratti da queste specie hanno mostrato un moderato effetto inibitorio dell'AChE (Attar-ur-Rahman *et al.*, 2001) e questo spiegherebbe i

disturbi gastrointestinali e sul SNC prodotti dall'ingestione di parti della pianta contenenti alti livelli di questi composti.

Quella delle Buxaceae è un'altra famiglia conosciuta per la sua tossicità dovuta alla presenza degli alcaloidi steroidei. Il primo alcaloide riportato fu la buxakashimramina (**7**) che ha una debole attività (IC_{50} di 25.4 μ M).

Altri alcaloidi steroidei tipo-pregnano sono quelli isolati da *Sarcococca saligna* che presentano attività inibitoria nei confronti di AChE (Khalid *et al.*, 2004). Salignenamida-C (**9**), -E (**10**), -F (**11**), axilarina-C (**12**), saligcinnamida (**13**), vaganina-A (**14**), salignamina (**15**) inibiscono in modo non competitivo AChE e BChE; sarcorina, sarcodinina e sarsalignone inibiscono BChE non-competitivamente; salignenamida-A inibisce AChE in maniera non-competitiva e la 2-idrossisalignarina-E è stata identificata come un AChE-I producendo una combinazione di inibizione parzialmente competitiva e non competitiva.

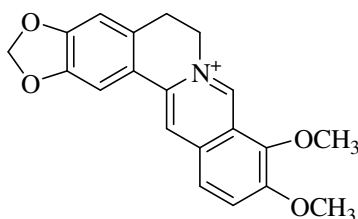
Studi struttura-attività suggeriscono che questi composti policiclici penetrano il *gorge* aromatico con l'anello A che entra per primo, effetto dovuto al suo carattere maggiormente idrofobico o per la presenza di un'aumentata elettropositività dei sostituenti sull'anello A.



- 9:** $R_1 = OH, R_2 = NH\text{-tigloyl}, R_3 = OAc, \Delta^{14,15}$
10: $R_1 = H, R_2 = NCH_3COCH=CCH_3CH(CH_3)_2, R_3 = H, \Delta^{16,17}$
11: $R_1 = H, R_2 = NCH_3COCH=CCH_3CH(CH_3)_2, R_3 = H$
12: $R_1 = OH, R_2 = NH\text{-benzoyl}, R_3 = H$
13: $R_1 = H, R_2 = CH_3N\text{-cinnamoyl}, R_3 = H$
14: $R_1 = H, R_2 = NH\text{-senecioidyl}, R_3 = OAc$
15: $R_1 = H, R_2 = OCH_3, R_3 = H, \Delta^{5,6} \Delta^{16,17}$

Altri alcaloidi hanno mostrato un'attività sull'enzima AChE e molti di questi sono stati isolati da piante usate nella medicina tradizionale. *Coptis chinensis* (Ranunculaceae) è stato usato per molte condizioni tra cui il declino cognitivo e della

memoria. Alcuni alcaloidi ritrovati in queste specie, come la berberina (**8**), coptisina e palmatina sono riconosciuti come inibitori delle colinesterasi.



8

3.6. Inibitori delle colinesterasi in altre patologie neurodegenerative

3.6.1. La demenza associata al morbo di Parkinson (PDD)

La malattia di Parkinson (PD) è stata classicamente considerata un disordine neurodegenerativo caratterizzato da sintomi prevalentemente motori. Tuttavia il classico quadro sintomatologico della PD caratterizzato da tremore, rigidità e bradi-acinesia si accompagna frequentemente ad un declino delle funzioni cognitive.

I deficit cognitivi che accompagnano la PD sono caratterizzati da una compromissione delle funzioni esecutive, dell'analisi visivo-spaziale e della memoria con particolare interesse della "working memory" della memoria episodica e del "procedural learning" (Dubois *et al.*, 1990).

Da un punto di vista neuropatologico tre ipotesi sono state postulate per spiegare le alterazioni cognitive dei soggetti parkinsoniani:

1. Il coinvolgimento della via dopaminergica nigro-striatale;
2. La presenza di corpi di Lewy a livello delle regioni limbiche e/o corticali;
3. La possibile concomitante presenza di caratteristiche neuropatologiche della malattia di Alzheimer (Emre *et al.*, 2003).

E' probabile che nella PDD si assista a una esternalizzazione delle lesioni tipo Lewy dai nuclei sottocorticali alla corteccia, oppure le due patologie potrebbero coesistere. Jellinger ha dimostrato nel 2003 che lesioni tipo AD sono presenti nel 94% di parkinsoniani con demenza. Altri autori (Apaydin *et al.*, 2002) hanno evidenziato nei riscontri autoptici una netta diffusione a livello corticale delle lesioni a corpi di Lewy.

Altri ricercatori propendono per una netta distinzione tra le due patologie avendo rilevato scarsi depositi amiloidei (Holmberg *et al.*, 2003).

Particolarmente coinvolto nel deficit cognitivo, oltre che probabilmente lo stesso deficit dopaminergico che si rende responsabile della disfunzione motoria, è il sistema colinergico con una netta alterazione dei markers colinergici corticali e perdita neuronale del nucleo basale di Meynert (Tiraboschi *et al.*, 2000).

Il sistema neurotrasmettitoriale colinergico e dopaminergico interagiscono a diversi livelli nelle aree corticali e sottocorticali.

A livello corticale e in strutture sottocorticali tra cui lo striato, è possibile osservare una diffusa perdita di recettori nicotinici dell'ACh e il grado di perdita recettoriale si correla con il deterioramento cognitivo.

In accordo con tali evidenze è stato dimostrato che la somministrazione di farmaci in grado di incrementare il tono sinaptico colinergico come gli inibitori dell'AChE è in grado di migliorare significativamente le performances cognitive dei pazienti affetti da PD con demenza (Emre *et al.*, 2004).

In vari studi condotti si è valutata l'attività degli inibitori delle colinesterasi nella PDD. Werber *et al.* nel 2001 hanno provato che pazienti trattati con donepezil e tacrina, continuando la terapia per il morbo di Parkinson mostravano dopo il trattamento un effetto benefico della funzione cognitiva senza l'aggravarsi dell'attività motoria.

Particolare attenzione è stata rivolta all'utilizzo della rivastigmina (inibitore di entrambe le colinesterasi) in tale patologia. Recenti studi hanno, infatti, dimostrato ottimi risultati nel trattamento di pazienti affetti da PDD che, dopo 6 mesi di terapia orale con rivastigmina, mostravano un netto miglioramento delle attività cognitive, con aumento dell'attenzione e delle funzionalità esecutive (Lalli *et al.*, 2008).

3.6.2. La demenza a corpi di Lewy (DLB)

La demenza a corpi di Lewy è stata per la prima volta descritta nel 1983, e criteri diagnostici clinici sono stati pubblicati nei primi anni '90.

E' stato suggerito che la DLB corrisponde al 15-20% dei casi di demenza nella popolazione anziana ultrasesantenne. Sintomi caratteristici della malattia sono demenza, marcata fluttuazione delle capacità cognitive, allucinazioni visive e movimenti spontanei simil Parkinson.

Cadute, sincopi, transienti disturbi della coscienza, e allucinazioni di altro tipo sono anche comuni. Questi disturbi non possono essere trattati con neurolettici per i peggioramenti del parkinsonismo e dei sintomi cognitivi che ne conseguirebbero.

Vari studi suggeriscono che l'utilizzo degli inibitori delle colinesterasi potrebbero essere benefici per tale disordine, sicuri e che migliorerebbero sia i deficit cognitivi che i sintomi neuropsichiatrici della DLB.

McKeith in uno studio del 2000, in collaborazione con farmacologi italiani, ha riportato il risultato del primo studio controllato vs. placebo, randomizzato, in doppio cieco con la rivastigmina. Il farmaco si è dimostrato utile non solo sulle funzioni cognitive ma anche su quelle comportamentali misurate con NPI (buona risposta verso allucinazioni, apatia e deliri).

Nel 2004 McKeith ha riesaminato il suo precedente lavoro dimostrando che pazienti con DLB, che avevano accusato allucinazioni visive, presentavano una maggiore e significativa risposta alla rivastigmina. Tale evidenza può essere la conseguenza di un maggior deficit colinergico che si riscontra nei pazienti DLB con allucinazioni.

Al contrario dell'attenzione non sono stati però riscontrati miglioramenti della memoria e non ha migliorato i prolungati tempi di "reazione cognitiva" facendo sottendere per questa attività ad un danno di tipo dopaminergico.

Nessuno studio di farmaci diversi dai ChEI ha mostrato un affidabile miglioramento cognitivo nella PDD e DLB, sebbene gli agenti dopaminergici possano avere un effetto benefico su alcune funzioni negli stadi precoci.

Gli antipsicotici atipici migliorano la psicosi nei PDD e forse nei DLB, ma con un più alto rischio di ictus in pazienti dementi e di peggioramenti del parkinsonismo. Perciò se è richiesto un intervento farmacologico per i sintomi cognitivi e neuropsichiatrici nella PDD e DLB, le evidenze correnti suggeriscono che i ChEI possono essere gli agenti di prima scelta.

BIBLIOGRAFIA

- Aisen PS, Gauthier S, Vellas B, Briand R, Saumier D, Laurin J, Garceau D. (2007). Alzhemed: a potential treatment for Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 4, 73-8.
- Akhondzadeh S., Noroozian M., Mohammadi S. et al., (2003). *Melissa officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized, placebo controlled trial. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 74, 863-66.
- Apayidin H, Ahlskog JE, Parisi JE, Boeve BF, Dickinson DW. (2002). Parkinson disease neuropathology later developing dementia and loss of the levodopa response. *Arch Neurol* 59, 102-12.
- Attar-ur-Rahman, Parveen S, Khalid A, Farooq, Choudhary MI. (2001). Acetyl and butyrylcholinesterase-inhibiting triterpenoid alkaloids from *Buxus papillosa*. *Phytochemistry* 58, 963-68.
- Ballard CG, Greig NH, Guillozet-Bongaarts AL, Enz A, Darvesh S. 2005 Cholinesterases: roles in the brain during health and disease. *Curr. Alzheimer Res.* 2, 307-18.
- Barth SA, Inselmann G, Engemann R, Heidemann HT. (1991). Influences of Ginkgo biloba on cyclosporine A induced lipid peroxidation in human liver microsomes in comparison to vitamin E, glutathione and N-acetylcysteine. *Biochem. Pharmacol.* 41, 1521-1526.
- Bastianetto S, Ramassamy C, Dore S, Christen Y, Poirier J, Quirion R. (2000a). The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by β -amyloid. *Eur J Neurosci* 12, 1882-1890.
- Bastianetto S, Zheng WH, Quirion R. (2000b). The *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) protects and rescues hippocampal cells against nitric oxide-induced toxicity: involvement of its flavonoid constituents and protein Kinase C. *J. Neurochem.* 74, 2268-2277.
- Berson A, Knobloch M, Hanan M, Diamant S, Sharoni M, Schuppli D, Geyer BC, Ravid R, Mor TS, Nitsch RM, Soreq H. (2008). Changes in readthrough

- acetylcholinesterase expression modulate amyloid-beta pathology. *Brain* 131, 109-19.
- Clementi F, Fumagalli G. (1999). Trasmissione colinergica. In: *Farmacologia generale e molecolare*, III ed. UTET.
- Darvesh S, McDonald RS, Darvesh KV, Mataija D, Conrad S, Gomez G, Walsh R, Martin E. (2007). Selective reversible inhibition of human butyrylcholinesterase by aryl amide derivatives of phenothiazine. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 6367-78.
- Dubois B, Pilon B, Lhermitte F, Agid Y. (1990). Cholinergic deficiency and frontal dysfunction in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 28, 117-121.
- Emre M, Aarsland D, Albanese A, Byrne EJ, Deuschl G, De Deyn PP et al. (2004) Rivastigmine for dementia associated with Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 351, 2509-2518.
- Ferencik M, Novak M, Rovenski J, Rybar I. (2001). Alzheimer's disease, inflammation and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Bratisl Lek Listy* 102, 123-32.
- Fulton B, Benfield P. (1996). Galanthamine *Drugs aging* 9, 60-65.
- Giacobini E. In: Meyer EM, Simpkins JW, Yamamoto J, Crews FT (Eds). (1992). Treatments of dementias, a new generation of progress (Advances in Behavioral Biology, vol.40) Plenum Press, New York pp.19-34.
- Glenner GG, Wong CW. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein *Biochem Biophys Res. Commun.* 120, 885-90.
- Greig NH, Utsuki T, Yu QS. (2001). A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: attention to butyrylcholinesterase. *Curr. Med. Res. Opin.* 17, 159-165.
- Greig NH, Utsuki T, Ingram DK, Wang Y, Pepeu G, Scali C, Yu QS, Mamczarz J, Holloway HW, Giordano T, Chen D, Furukawa K, Sambamurti K, Brossi A; Lahiri DK. (2005). Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer beta-amyloid peptide in rodent *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 17213-8.
- Haass C, Selkoe DJ. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8, 101-12.
- Heiss WD, Zeiler K. (1978). Drug influence on cerebral circulation. *Pharmakotherapie* 1, 137-144.

- Holmberg B, Johnels B, Blennow K, Rosengreen L. (2003). Cerebrospinal fluid Abeta42 is reduced in Multiple System Atrophy but normal in Parkinson's Disease and Progressive Supranuclear Palsy. *Mov Disord* 18, 186-190.
- Houghton PJ, Yuhao R, Melanine-Jayne H. (2006). *Nat. Prod. Rep.* 23, 181-199.
- Inestrosa NC, Dinamarca MC, Alvarez A. (2008). Amyloid-cholinesterase interactions. Implications for Alzheimer's disease. *Febs J.* 275, 625-32.
- Jellinger KA, Seppi K, Wenning GK. 2003 Neuropathologic changes in Parkinson disease with late onset dementia. *Arch. Neurol.* 60, 452-3.
- Khalid A, Zaheer-ul-Haq, Anjum S, Khan MR, Atta-ur-Rahman, Choudhary MI. (2004). Kinetics and structure-activity relationship studies on pregnane-type steroidal alkaloids that inhibit cholinesterases. *Bioorg. Med. Chem.* 12, 1995-2003.
- Kimbell LM, Ohno K, Engel AG, Rotundo RL. (2004). C-terminal and heparin-binding domains of collagenic tail subunit are both essential for anchoring acetylcholinesterase at the synapse. *J. Biol. Chem.* 279, 10997-1005.
- Kristofikofà Z, Benesovà O, Tejkalovà H. (1992). Changes of high-affinity coline uptake in the hippocampus of old rats after long-term administration of two nootropic drugs (tacrine and *Ginkgo biloba* extract). *Dementia* 3, 304:307.
- Lalli S, Albanese A. (2008). Rivastigmine in Parkinson's disease dementia *Expert Rev Neurother* 8, 1181-8.
- Loffler T, Lee SK, Noldner M, Chatterjee SS, Hoyer S, Schliebs R. 2001 Effect of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) on glucose metabolism-related markers in streptozotocin-damaged rat brain. *J. Neural. Transm.* 108, 1457-1474.
- Maccioni RB, Munoz JP, Barbeito L 2001 The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res* 32: 367-71.
- Maelicke A, Samochocki M, Jostock R, Fehrenbacher A, Ludwig J, Albuquerque EX, Zerlin M. (2001). Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galanthamine, a new treatment strategy for Alzheimer's Disease. *Biological Psychiatry* 49, 279-88.
- Marcocci L, Packer L, Droy-Lefaix M-T, Sekaki A, Gardes Albert M. (1994). Antioxidant action of *Ginkgo biloba* extract EGb 761. *Methods Enzymol* 234, 462-475.

- Martin B, Szekely C, Hopkins J et al. (2008). Cognitive function over time in the Alzheimer's disease anti-inflammatory prevention trial (ADAPT) *Arch Neurol.* 65, 539-40.
- McKeith IG, Wesnes KA, Perry E, Ferrara R. (2004). Hallucinations predict attentional improvements with rivastigmine in dementia with Lewy bodies. *Dementia Geriatr. Cogn. Disord.* 18, 94-100.
- McKeith IG, Del Ser T, Spano P, Emre M, Wesnes KA, Anand R, et al. (2000). Effects of rivastigmine on cognitive function in dementia with Lewy bodies: a randomized, double blind, placebo-controlled international study. *Lancet* 356, 2031-6.
- Miyazawa M, Tougo H, Ishihara M. (2001). Inhibition of acetylcholinesterase activity by essential oil from *Citrus paradisi*. *Nat. Prod. Lett.* 15, 205-10
- Miyazawa Mitsuo, Hitomi Watanabe, and Hiromu Kameoka. (1997). Inhibition of acetylcholinesterase activity by monoterpenoids with a *p*-menthane skeleton. *J. Agric. Food Chem.* 45, 677-679.
- Miyazawa M, Hitomi W, Kazuyasu U, Hiromu K. (1998). Inhibition of acetylcholinesterase activity by essential oils of *Mentha* species. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3431-3434.
- Perry EK, Tomlinson E, Blessed G. (1978). Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia *Br. Med. J.* 2, 1457-59.
- Perry N, Court G, Bidet N, Court J, Perry E. (1996). European herbs with cholinergic activities: potential in dementia therapy. *Int. Geriatr. Psychiatry* 11, 1063-1087.
- Polinski RJ. (1998). Clinical Pharmacology of rivastigmine: a new-generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Clin. Ther.* 634-647.
- Rice DP, Fillit HM, Max W, Knopman DS, Lloyd JR, Duttugupta S. (2001). Prevalence, costs, and treatment of Alzheimer's disease and related dementia: a managed care perspective. *Am. J. Manag. Care* 7, 809-818.
- Ross IA. (2001). Medicinal Plants of the World (Vol. 2), *Chemical Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses*. Humana Press: Totowa, NJ.
- Ryan MF, Byrne O. (1988). Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. *J. Chem. Ecol.* 14, 1965-1975.

- Schindowski K, Leutner S, Kressmann S, Eckert A, Muller WE. (2001). Age-related increase of oxidative stress-induced apoptosis in mice prevention by *Ginkgo biloba* extract (EGb761). *J. Neural. Transm.* 108, 969-978.
- Shu Y-Z. (1998). Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *J. Nat. Prod.* 61, 1053-1071.
- Spencer CM, Noble S. (1998). Rivastigmine- a review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs Aging* 13, 391-411.
- St George-Hyslop PH, Rogaeva E, Tandon A. (2001). Genetic markers in the diagnosis of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 3, 293-304.
- Sunderland T, Hill JL, Mellow AM, Lawlor BA, Gundersheimer J, Newhouse PA, Grafman JH. (1989). Clock drawing in Alzheimer's disease. A novel measure of dementia severity *J Am Geriatr Soc.* 37, 725-9
- t'Veld BA, Ruitenbergh A, Hofman A, Launer LJ, van Duijn CM, Stijnen T, Breteler MM, Stricker BH 2001 Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease. *N. Engl J. M.* 345, 1515-21.
- Taylor P, Radic Z. (1994). The cholinesterases: from genes to proteins *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 34, 281-320
- Tea S, Celsis P, Clanet M, Marc-Vergnes J-P, Boeters U. (1987). Quantified parameters for the proof of the enhancement of cerebral circulation and metabolism. *Therapiewoche* 37, 2655-2657.
- Thomsen T, Kewitz H. (1990). Selective inhibition of human acetylcholinesterase by galanthamine *in vitro* and *in vivo*. *Life Sci.* 46, 1553-8.
- Tiraboschi P, Hansen LA, Alford M, Sabbagh MN, Schoos DO, Masliah E. (2000). Cholinergic dysfunction in disease with Lewy bodies. *Neurology* 54, 407-411.
- Topic B, Tani E, Tsiakitzis K. (2002). Enhanced maze performance and reduced oxidative stress by combined extracts of *Zinziber Officinale* and *Ginkgo biloba* in the aged rat. *Neurobiol Aging* 23, 135-143.
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science.* 286, 735-41.

- Werber EA, Rabey JM. (2001). The beneficial effect of cholinesterase inhibitors on patients suffering from Parkinson's disease and dementia. *J. Neural. Transm.* 108, 1319-25.
- Wolf H, Grunwald M, Ecke GM, Zedlick D, Bettin S, Dannenberg C, Dietrich J, Eschrich K, Arendt T, Gertz HJ. (1998). The prognosis of mild cognitive impairment in the elderly. *J Neural Transm Suppl.* 54, 31-50
- Xiao XQ, Zhang HY, Tang XC. (2002). Huperzine A attenuates amyloid β -peptide fragment 25-35-induced apoptosis in rat cortical neurons via inhibiting reactive oxygen species formation and caspase-3 activation. *J. Neurosci Res.* 67, 30-36
- Yao Z, Drieu K, Papadopoulos V. (2001). The *Ginkgo biloba* extract EGb 761 rescues the PC12 neuronal cells from β -amyloid-induced cell death by inhibiting the formation of β -amyloid-induced diffusible neurotoxic ligands. *Brain Res.* 889, 181-190.
- Yarnell E. 1998 Lemonbalm. *Altern. Complem. Therapy* 4, 417-19
- Zhang Y, Kua J and McCammon JA. (2002). Role of the catalytic triad and oxyanion hole in acetylcholinesterase catalysis: An *ab initio* QM/MM Study. *J. Am. Chem. Soc* 124, 10572–10577.

Parte sperimentale

Lo studio realizzato nel presente lavoro di tesi è dedicato all'applicazione delle tecniche analitiche e strumentali utili per la valutazione delle caratteristiche fitochimiche e biologiche di una pianta endemica calabrese, il *Citrus medica* L. cv Diamante (Cedro). Piante del genere *Citrus* sono specie da tempo utilizzate in campo alimentare, ma, in virtù dei principi attivi che le caratterizzano, stanno acquistando sempre maggiore rilevanza in campo farmaceutico.

Attraverso il percorso metodologico, di seguito riportato, si è inteso raggiungere i seguenti obiettivi:

- a) realizzare un dosaggio quantitativo di markers fitochimici scelti dei differenti estratti di Cedro, al fine di evidenziare il differente contributo dato alla composizione stessa dell'estratto;
- b) valutare l'attività biologica (antiossidante, antinfiammatoria, ipoglicemizzante e colinesterasica) degli estratti e degli oli essenziali;
- c) correlare le informazioni fitochimiche alle informazioni biologiche conseguite e valutare le relazioni tra l'attività biologica e il contenuto in principi attivi.

Il protocollo sperimentale messo a punto per realizzare il presente lavoro è definito da cinque momenti principali:

1. selezione, raccolta e identificazione botanica dei campioni vegetali;
2. preparazione degli estratti e degli oli essenziali;
3. valutazione della composizione fitochimica di estratti e oli essenziali;
4. dosaggio quantitativo di markers fitochimici scelti;
5. valutazione dell'attività antiossidante (DPPH test, β -carotene bleaching test), antinfiammatoria (inibizione della produzione di nitrossido), colinesterasica (inibizione degli enzimi acetilcolinesterasi e butirrilcolinesterasi) e ipoglicemizzante *in vitro* (inibizione degli enzimi α -amilasi e α -glucosidasi) e *in vivo*, degli estratti totali e degli oli essenziali.

CAPITOLO 4

Screening fitochimico del *Citrus medica* L. cv Diamante (Cedro)

4.1. Introduzione

La prima parte del lavoro sperimentale ha inteso fornire una caratterizzazione fitochimica degli estratti dei frutti in due stadi maturativi (maturi e immaturi), dei fiori e delle foglie di *C. medica* cv Diamante (Cedro) e dell'olio essenziale ottenuto con differenti tecniche, al fine di evidenziare il legame tra metodica estrattiva e composizione fitochimica.

Il frutto è stato esaminato nelle diverse componenti, al fine di individuare eventuali siti di accumulo dei principi attivi in relazione a quelli di produzione. Sono stati così oggetto di studio:

- ✓ l'epicarpo, dal quale si ottiene, come per quasi tutti gli agrumi, l'olio essenziale dagli orticoli che lo compongono;
- ✓ il mesocarpo, elemento importante, anche dal punto di vista quantitativo, che rappresenta la materia di congiunzione tra l'epicarpo e l'endocarpo;
- ✓ l'endocarpo, che costituisce la parte più interna del frutto.

Separatamente sono stati analizzati anche i semi, prelevati dall'endocarpo, al fine di determinare la variabilità del contenuto fitochimico, in relazione alle altre parti del frutto e a eventuali processi biosintetici propri.

4.2. Raccolta dei campioni di *Citrus medica* L. cv Diamante

La pianta di Cedro cresce spontanea nelle vallate e sui pendii, dal livello del mare fino a circa 500 metri d'altitudine.

La raccolta è stata realizzata seguendo precise norme, poiché il contenuto in principi attivi è diverso in rapporto all'età della pianta e al periodo di raccolta. Tenendo conto di tali regole, la raccolta è stata eseguita in autunno, quando la pianta raggiunge il tempo di maggiore contenuto in principi attivi, ossia il cosiddetto tempo balsamico.

La raccolta è stata condotta in collaborazione con botanici dell'Università della Calabria, che hanno eseguito il riconoscimento della specie ed hanno contribuito alle operazioni di raccolta.

I campioni di Cedro (Fig. 4.1.) da sottoporre ad analisi sono stati raccolti in località Santa Maria del Cedro (CS) nel mese di ottobre 2007, selezionando due fasi di maturazione dei frutti (di seguito indicati come maturi e immaturi) (Fig. 4.2).



Figura 4.1. Areale di raccolta dei campioni di Cedro.

E' stato possibile raccogliere quantità sufficientemente abbondanti da consentire uno studio sia fitochimico sia biologico ampio e dettagliato.



Figura 4.2. Frutti di Cedro immaturi e maturi.

4.3. Preparazione degli estratti di *Citrus medica* L. cv Diamante

La preparazione dell'estratto totale è stata realizzata in diverse fasi, ciascuna delle quali è di fondamentale importanza per ottenere un materiale di partenza adatto alle operazioni di isolamento dei principi attivi e di realizzazione dei saggi biologici.

La prima fase consiste nella scelta del materiale da estrarre, seguita dall'operazione di estrazione e concentrazione dei liquidi estrattivi.

La scelta del materiale da estrarre è importante perché condiziona l'utilizzo del solvente, il quale deve essere il più selettivo possibile, assicurando il recupero dei componenti attivi della pianta di interesse senza portare in soluzione quelli indesiderati.

Segue l'operazione che consente la separazione dei principi attivi dalle droghe vegetali che li contengono e che prende il nome di esaurimento della droga o più comunemente estrazione.

Il modo più razionale per realizzare una buona estrazione è quello di percorrere tre momenti fondamentali rappresentati da:

- *frantumazione della droga*, con lo scopo di aumentare la superficie di contatto fra la droga ed il solvente, accrescendo il potere di estrazione di quest'ultimo;
- *scelta del solvente più idoneo*, subordinata alle caratteristiche di solubilità dei principi attivi da estrarre. Il solvente prescelto dovrà essere in grado di asportare il contenuto delle cellule le cui pareti sono state rotte per via meccanica, ma anche il contenuto delle cellule integre; i cui principi attivi fuoriescono per diffusione muovendosi secondo un gradiente di concentrazione tra l'ambiente interno e quello esterno. Per tale motivo è importante, durante il processo estrattivo, rinnovare alcune volte il solvente, allo scopo di poter "esaurire" completamente la droga;
- *scelta del metodo di estrazione*, che dipende dalle caratteristiche chimico-fisiche dei principi attivi. I principali parametri che devono orientare la scelta della tecnica estrattiva sono: la volatilità e la termostabilità del principio attivo.

Le più importanti tecniche di estrazione con solventi sono la macerazione, la digestione, l'infusione, la decozione e la percolazione (Morelli, 1981). L'unica differenza tra queste tecniche è la temperatura alla quale è realizzata l'estrazione, che secondo la Farmacopea Ufficiale, dovrebbe essere:

- 15 - 35 °C per la macerazione;
- 35 - 65 °C per la digestione;
- 90 - 100 °C per l'infusione;
- 100 °C per 30 minuti per la decozione.

Nel presente lavoro di ricerca la fase di estrazione è stata condotta facendo ricorso alla macerazione, preferendola fra le tecniche menzionate, per ridurre al minimo i rischi di degradazione termica.

Tale procedura è stata realizzata mantenendo quantità pesate dei singoli campioni a contatto con un opportuno solvente organico, a temperatura ambiente e per un tempo definito, in dipendenza della costituzione della droga.

Per realizzare tale lavoro è stato scelto come solvente una miscela idroalcolica (etanolo al 70%), che ha consentito di solubilizzare nella quasi totalità le classi di principi attivi di nostro interesse.

Sperimentalmente si è proceduto estraendo le parti selezionate di ogni campione di Cedro con la soluzione idroalcolica a temperatura ambiente, ripetendo l'operazione per tre volte e lasciando il campione a contatto con il solvente circa 72 ore per ogni estrazione. In modo particolare sono stati analizzati i frutti, maturi e immaturi, nelle seguenti componenti:

- ✓ Epicarpo;
- ✓ Mesocarpo;
- ✓ Endocarpo;
- ✓ Semi.

Sono stati oggetto di studio anche le foglie e i fiori.

Tutti gli estratti, filtrati e riuniti, sono stati essiccati a pressione ridotta e a una temperatura di 30-35 °C mediante un evaporatore rotante e una pompa ad alto vuoto, al fine di determinare il contenuto di estratto totale ottenuto (Tab. 4.1.) e procedere alle successive operazioni di caratterizzazione fitochimica e valutazione dell'attività biologica.

La resa percentuale di estrazione è compresa tra il 4.7% per epicarpo dei frutti maturi e fiori e il 12.6% per i semi dei frutti maturi. Interessanti sono anche le rese dell'endocarpo dei frutti maturi e delle foglie con valori, rispettivamente di 11.3% e 8.2%.

Tabella 4.1. Rese estrattive dei campioni di *C. medica* cv Diamante.

Campione	Resa percentuale (%)
<i>Cedri immaturi</i>	
Mesocarpo	6.1
Endocarpo	6.3
<i>Cedri maturi</i>	
Epicarpo	4.7
Mesocarpo	5.7
Endocarpo	11.3
Semi	12.6
Fiori	4.7
Foglie	8.2

4.4. Isolamento degli oli essenziali di Cedro

L'olio essenziale dell'epicarpo dei frutti maturi di Cedro è stato ottenuto facendo ricorso a tre differenti tecniche estrattive, quali idrodistillazione, spremitura meccanica e estrazione in fase supercritica (SFE), al fine di evidenziare il legame tra metodica estrattiva e composizione fitochimica ed indicare quale tecnica possa risultare d'elezione per l'ottenimento dell'olio essenziale migliore dal punto di vista sia qualitativo sia quantitativo.

Nella tecnica dell'idrodistillazione l'epicarpo (1.8 kg) prelevato dai frutti maturi, previamente puliti, è stato sottoposto a idrodistillazione per 3 ore usando un apparato tipo Clevenger (Clevenger, 1928).

L'olio essenziale per spremitura meccanica è stato ottenuto a partire da 2.5 kg di epicarpo; l'olio è stato separato dall'estratto grezzo per centrifugazione.

L'estrazione in fase supercritica è stata realizzata impiegando anidride carbonica al 99.9%, alla temperatura di 40 °C e alla pressione di 100 bar utilizzando un apparato Spe-ed SFE (Tozzi *et al.*, 2008). I frutti maturi di Cedro sono stati privati dell'epicarpo in atmosfera di azoto e l'epicarpo ottenuto è stato immediatamente caricato nella colonna di estrazione (volume interno di 32 cm³ e dimensioni di 14 x 150 mm). Circa 43 g di bucce di Cedro sono state sottoposte a un flusso di CO₂ di circa 5 mmoli di CO₂ min⁻¹ (~ 0.2 g/min) per sei ore per ogni ciclo di estrazione.

In tutti e tre i casi è stato ottenuto un olio dal colore giallo paglierino, anidrificato mediante sodio solfato anidro e conservato in bottiglie dal vetro scuro alla temperatura di 4-8 °C per prevenire gli effetti negativi della luce prima di realizzare le analisi.

Le rese degli oli essenziali (Tab. 4.2.), calcolate sul peso della pianta, sono dello 0.1% (v/w) per l'olio essenziale ottenuto per idrodistillazione, dello 0.1% (v/w) per l'olio ottenuto per spremitura meccanica e del 28% (v/w) per l'olio ottenuto mediante estrazione in fase supercritica.

Anche le foglie (2.0 kg) sono state sottoposte a idrodistillazione (Clevenger, 1928) per ottenere l'olio essenziale. La procedura è la medesima di quella utilizzata per l'epicarpo e la resa dell'olio ottenuto si attesta allo 0.1% (v/w).

Tabella 4.2. Rese estrattive degli oli essenziali di *C. medica* cv Diamante.

Campione	Procedura estrattiva	Resa %
Epicarpo	Idrodistillazione	0.1
	Spremitura meccanica	0.1
	Estrazione in fase supercritica	28.0
Foglie	Idrodistillazione	0.1

4.4.1. Gli oli essenziali: caratteristiche chimiche e proprietà biologiche

Per olio essenziale, olio volatile o essenza, si intende una miscela complessa di sostanze organiche naturali bassobollenti, cioè volatili a temperatura ordinaria, prodotte da molte piante.

Gli oli essenziali sono intimamente connessi con i processi vitali che si svolgono nell'organismo vegetale e si possono localizzare in diverse strutture della pianta alle quali conferiscono l'odore caratteristico: foglie, steli, frutti, epicarpo dei medesimi, ei rami, legno, corteccia, resina, fiori, semi, radice, rizoma. Per alcune varietà di piante possono essere estratti oli essenziali differenti dal punto di vista qualitativo e quantitativo, da parti diverse della stessa pianta. La quantità di olio essenziale contenuto in una pianta, è di solito molto ridotta, anche inferiore allo 0.001%, ma può essere anche molto abbondante (15% e oltre).

La proprietà di essere volatili a temperatura ambiente è apparsa da sempre evidente all'uomo nella fragranza di talune piante e nei conseguenti millenari usi alimentari (per tale ragione i costituenti degli oli volatili sono detti "aromatici", termine tuttavia da non confondere con quello usato in chimica organica per le strutture altamente insature) e di

profumeria. A tali utilizzi si affiancano numerosi impieghi terapeutici e l'impiego più recente quale materiale di partenza per prodotti di emi-sintesi di interesse antropico.

Da sempre la medicina popolare ha fatto con abbondanza uso di droghe a essenza, attribuendo a esse svariate proprietà che, in taluni casi, sono state confermate dalle ricerche scientifiche.

Gli oli volatili presentano dal punto di vista sia chimico sia biologico le seguenti caratteristiche comuni:

- a) spiccata volatilità;
- b) composizione complessa, basata su numerosi costituenti a basso peso molecolare e limitata funzionalizzazione;
- c) produzione dell'essenza in cellule oleose e successivo rilascio verso l'esterno o segregazione in spazi specializzati (peli ghiandolari, tasche schizo-lisigene, dotti ecc.);
- d) specifiche caratteristiche organolettiche dovute ad interazione con i centri olfattivi;
- e) frequente attività antimicrobica.

La classificazione degli oli essenziali deriva dal fatto che sono generalmente costituiti da miscele di idrocarburi e loro composti derivati ossigenati. In alcuni oli gli idrocarburi sono predominanti, mentre in altri prevalgono i derivati ossigenati.

Gli oli essenziali possono essere suddivisi nelle seguenti categorie, basate sulla funzionalizzazione del loro (o dei loro) componente principale (componenti principali):

- 1) Idrocarburi terpenici; olio essenziale di trementina (pineni 80-90%, canfene), di ginepro (pinene, canfene, cadinene), di limone (limonene 90%).
- 2) Alcoli; oli essenziali di coriandolo (linalolo), del legno di sandalo (sandalolo 90-97%) ecc.
- 3) Miscela di esteri e alcoli; olio essenziale di lavanda, ecc.

Negli oli essenziali prevalgono le caratteristiche chimico-fisiche degli idrocarburi a basso peso molecolare, e cioè scarsa reattività, stato fisico liquido e volatilità. Queste proprietà sono alla base dei metodi di separazione, preparazione e conservazione.

Per quanto riguarda la separazione dei componenti volatili dagli altri costituenti presenti nella pianta, la distillazione in corrente di vapore costituisce da sempre il metodo più semplice ed efficace. Spesso alla distillazione seguono operazioni di

raffinazione, ovvero una successiva distillazione che può rendersi necessaria per raggiungere due risultati principali:

a) allontanare dal distillato alcuni componenti non graditi, come nel caso dell'olio di arancio o della dementalizzazione della menta, o addirittura tossici come nel caso dell'allontanamento del tuione dall'assenzio;

b) l'arricchimento dell'olio nei componenti volatili più nobili, come nel caso dell'essenza di trementina dalla resina di pino.

Importante, infine, è la conservazione che va eseguita in recipienti inerti ben chiusi non di plastica, al riparo dalla luce, dall'umidità e dalle alte temperature. Infatti, se pur scarsamente funzionalizzati, gli oli essenziali contengono spesso doppi legami e funzioni ossigenate (alcoli, aldeidi, ecc.). L'azione ossidativa dell'aria può facilmente portare all'addizione di ossigeno sul doppio legame, attivando la sequenza epossido, glicole, alcool, aldeide, acido, oppure trasformando in acidi le funzioni ossigenate; queste reazioni cambiano irreversibilmente le caratteristiche organolettiche dell'olio.

Per quanto riguarda questi ultimi, in molte essenze si nota la presenza nettamente maggioritaria di uno o due componenti, che, tuttavia, spesso rivestono prevalentemente una funzione di solvente per i costituenti minoritari ossigenati, reali responsabili delle caratteristiche peculiari dell'olio, per quello che nell'industria profumiera viene detto il "bouquet".

Anche le temperature elevate vanno evitate, in particolare per l'insorgere di fenomeni di auto-degradazione ossidativa operata dalle aldeidi presenti nello stesso olio.

Ad esempio, nell'olio di *Melissa officinalis* il cariofillene è convertito in cariofillene ossido, il quale aumenta la sua percentuale dallo 0% al 17% in dieci mesi di conservazione a temperatura ambiente.

Un'alternativa recente per la conservazione è costituita dall'inclusione o dalla micro-incapsulazione in polisaccaridi vegetali e gomme idrosolubili, che permettono una conservazione per lungo periodo con ottimi risultati.

Riguardo alla diffusione degli oli essenziali, è possibile distinguere due grandi categorie:

1) oli essenziali la cui produzione e accumulo avviene principalmente a seguito dell'attività di struttura specializzate con rilascio all'esterno della pianta. Le specie produttrici sono le vere e proprie piante a essenza, principalmente della famiglia

Labiata (lavandula, menta, timo, ecc.) e della sottofamiglia delle Tubiflore delle Composite (camomilla, ecc.).

2) oli essenziali accumulati in struttura specializzate più o meno interne. Le specie e le famiglie interessate sono in ogni caso numerose e tra le più importanti ricordiamo: Rutaceae, Umbellifere, Lauraceae, Mirtaceae, Graminaceae e Miristicaceae. In questi casi non si ha rilascio verso l'esterno, l'essenza è localizzata in ampi spazi schizogeni, o lisigeni oppure schizzo-lisigeni originati principalmente dal progressivo accumulo dell'olio essenziale. La funzione di quest'ultimo appare in questi casi meno evidente rispetto ai precedenti; tuttavia la proprietà antibatterica e lo sgradevole sapore di molti oli essenziali porta decisamente ad ipotizzare un ruolo allelopatico.

Oltre alla tossicità intrinseca determinata dalla presenza di alcuni particolari costituenti (es. tuione, safrolo, ascaridolo, ecc.) è bene evitare l'iniezione, l'applicazione sulle mucose o le parti delicate includendo l'esposizione per periodi prolungati, ricordare la possibilità di effetti allergizzanti in soggetti a rischio, utilizzare la somministrazione in aerosol in pazienti soggetti ad asma bronchiale.

Riguardo alla somministrazione è bene ricordare il massaggio, diffuso soprattutto nei paesi anglo-sassoni, l'aromaterapia di scuola francese che predilige l'ingestione orale, e ancora l'inalazione, l'aerosol, la percezione olfattiva.

Il processo di produzione è complesso e diversificato a seconda della tipologia, ma può essere delineato nei seguenti passaggi adottati in particolare in caso di essenze delicate: estrazione, mediante distillazione semplice o estrazione con solventi o concreta assoluta, depurazione delle sostanze cerose, trattamento con alcol, filtrazione a freddo.

Recentemente a questa tipologia di estratti sono ascritte numerose proprietà biologiche: antimicrobica, antinfiammatoria, antiulcera, antiossidante, antiaggregante piastrinica, antitumorale e neuroprotettiva (Lamproni *et al.*, 2006; Khanna *et al.*, 2007; Corasiniti *et al.*, 2007).

Per la produzione di oli essenziali e, in genere, composti con alta tensione di vapore, si può ricorrere alla distillazione in corrente di vapore con apparecchiature tipo Clevenger. Questa tecnica di estrazione solido-liquido è particolare in quanto richiede il trasporto dei composti volatili da parte di una corrente di vapore.

In ogni caso, poiché il sistema estrattivo è sottoposto a un certo riscaldamento, i composti termolabili possono subire delle trasformazioni e di conseguenza possono non essere recuperati integri. Per ovviare a tale inconveniente si ricorre a un'altra tecnica di distillazione denominata distillazione a pressione ridotta o sottovuoto, che avviene dopo aver tolto, mediante una pompa, l'aria dal recipiente in cui è raccolto il liquido, allo scopo di abbassare la pressione e quindi la temperatura di ebollizione.

L'apparecchio distillatore, utilizzato per la distillazione in corrente di vapore, è costituito da una caldaia in cui è collocata la droga, a sua volta collegata, mediante un raccordo, con un refrigerante ad acqua che permette la condensazione dei vapori, ottenendo così la trasformazione della fase gassosa in fase liquida. L'acqua, riscaldata, evapora e attraversa le parti della pianta fresca o secca, provocando l'evaporazione dei principi attivi volatili; i vapori attraversano il refrigerante, condensano e vengono infine raccolti in un recipiente dove si separano dall'acqua (idrolati) per il differente peso specifico. Questa tecnica è indicata per ricavare oli essenziali e altri componenti volatili da droghe.

Fra le più recenti tecniche estrattive si inserisce l'estrazione in fase supercritica (SFE).

L'utilizzo di fluidi supercritici come solventi di estrazione consente in molti casi di abbattere tempi, costi e rischi rispetto alle tradizionali tecniche con solventi liquidi, pur garantendo buona accuratezza, precisione e limiti di rilevazione comparabili con le metodologie ufficiali. Un fluido si definisce in stato supercritico quando presenta valori sia di pressione sia di temperatura superiori ai rispettivi valori critici. Le proprietà dei fluidi supercritici sono intermedie tra lo stato di gas e quello di liquido (densità simile a un liquido, viscosità e proprietà di trasporto riferibili a un gas); un fluido in queste condizioni potrebbe, infatti, essere definito, in maniera semplicistica, come un gas "molto denso".

Poiché il potere solvente di un fluido è correlato direttamente alla propria densità, ne consegue che, rispetto a una classica estrazione con solvente liquido, l'utilizzo di un fluido supercritico di comparabile potere solvatante sarà effettuata in un minor periodo di tempo, grazie alle sue migliori proprietà di trasporto. Tutto questo può significare minor consumo di solvente, e di conseguenza costi e rischi ridotti rispetto alle tradizionali estrazioni liquido-liquido o mediante Soxhlet, considerando anche gli oneri

dovuti allo smaltimento dei solventi; altri vantaggi associabili a questa tecnica sono la possibilità di automazione e l'applicabilità ai settori più svariati (polimeri, alimentare, farmaceutico, ambientale).

Il fluido supercritico deve possedere valori critici non elevati, per ragioni di sicurezza e di possibile labilità della matrice da estrarre. L'anidride carbonica presenta, fra tutti i fluidi utilizzabili, i maggiori vantaggi: ha una bassa tossicità ed inoltre a condizioni normali è un gas, aspetto che la rende facilmente separabile dal soluto, una volta terminato il processo estrattivo. Infine, il suo costo è competitivo rispetto ai normali solventi.

4.5. Metodi di identificazione qualitativa dei costituenti del Cedro

L'insieme di tecniche raggruppate sotto il nome di "spettrometria di massa" rappresenta uno dei più versatili e potenti strumenti dell'analisi chimica.

Il largo campo di utilizzo è dovuto in parte all'offerta di prestazioni oggi disponibili per ciascuna delle tre sezioni in cui può essere suddiviso uno spettrometro di massa.

Queste tre sezioni fondamentali sono:

- ✓ sorgente ionica;
- ✓ analizzatore di massa;
- ✓ traduttore/rivelatore.

Tranne poche eccezioni, l'intero spettrometro è mantenuto sotto vuoto, generalmente a una pressione compresa fra 10^{-3} e 10^{-7} torr. Il campione può essere introdotto sia sotto forma di gas sia come liquido o solido. Questi ultimi devono essere, poi, vaporizzati.

Le molecole in fase gassosa sono ionizzate nello spazio compreso fra due armature cariche e gli ioni prodotti vengono accelerati da un potenziale di alcuni kvolt e focalizzati mediante campi elettrici e fenditure.

La regione nella quale le molecole sono introdotte, vaporizzate, ionizzate e accelerate prende il nome di sorgente. Da qui, gli ioni accelerati sono trasferiti all'interno di uno dei numerosi analizzatori di massa. Nella maggior parte di questi ultimi, gli ioni di massa diversa sono separati nello spazio, in modo tale che le specie di ioni differenti colpiscano il trasduttore in tempi diversi.

Questa piccola corrente ionica è amplificata dal trasduttore, comunemente costituito da un elettromoltiplicatore, che amplifica le correnti in modo simile a quello dei

fotomoltiplicatori. La corrente è, poi, ulteriormente amplificata dalle componenti elettroniche a esso associate per produrre il segnale in uscita. Quest'ultimo (corrente ionica in funzione del tempo) è diagrammato come corrente ionica in funzione della massa e porta alla produzione di uno spettro di massa (Rubinson *et al*, 2002).

Nel lavoro sperimentale compiuto, per l'identificazione dei principi attivi più volatili presenti nei campioni di Cedro, è stata utilizzata la combinazione gas cromatografia-spettrometro di massa (GC-MS) (Fig. 4.3).

L'accoppiamento GC-MS fornisce un potentissimo metodo d'indagine per l'analisi di miscele complesse, in quanto combina le grandi capacità di separazione della gas cromatografia con la capacità di identificazione e caratterizzazione della struttura delle molecole, tipica della spettrometria di massa. Lo spettrometro di massa, oltre a segnalare l'eluizione di un soluto, fornisce anche lo spettro di massa dal quale si può risalire all'identità della sostanza.

Attraverso l'interfaccia GC-MS, i soluti arrivano alla camera di ionizzazione dello spettrometro, in cui avviene la ionizzazione delle molecole dei singoli componenti separati. I metodi di ionizzazione principali sono: la ionizzazione per impatto elettronico e la ionizzazione chimica. Nel primo caso sono generati elettroni da un filamento di tungsteno riscaldato. Gli elettroni sono accelerati da un campo elettrico; per impatto, ionizzano le molecole della sostanza che entra nella camera di ionizzazione e si formano degli ioni positivi corrispondenti alla perdita di elettroni da parte della molecola della sostanza M. Poiché questa ionizzazione è piuttosto energica, a seguito dell'impatto si produce anche una serie numerosa di frammenti più piccoli, anch'essi ionizzati. Tutti questi ioni positivi (lo ione molecolare e lo ione frammento) entrano nello spettrometro di massa, dove sono separati in base al loro rapporto massa/carica per dare lo spettro di massa. Nel secondo caso si aggiunge una sostanza organica al gas effluente (in genere un idrocarburo alifatico a basso peso molecolare, come per esempio il metano). Una sostanza può essere, quindi, ionizzata direttamente per impatto elettronico oppure per il tramite di una specie chimica intermedia (gas reagente) che è stata preventivamente ionizzata per impatto elettronico.

Il vantaggio della ionizzazione chimica consiste nel variare notevolmente l'energia degli elettroni che inducono la ionizzazione del gas reagente. In questo modo, si varia la quantità di ioni derivati dal gas reagente. Tuttavia, la capacità ionizzante di questi ioni

nei confronti dei soluti è indipendente dall'energia emessa dalla sorgente di elettroni e, di conseguenza, la ionizzazione chimica porta a una frammentazione delle sostanze analizzate molto meno spinta della ionizzazione per impatto elettronico e, quindi, a uno spettro di massa molto meno complicato e più riproducibile, con un numero minore di picchi. Il collettore di ioni è interfacciato con un calcolatore che gestisce tutti i dati relativi alle specie ioniche prodotte.

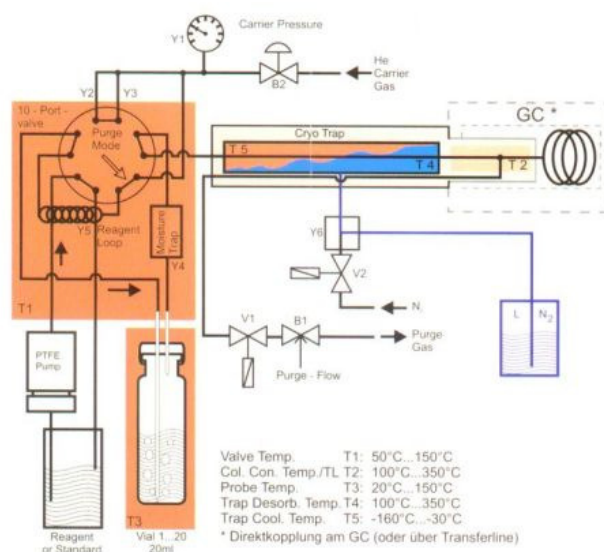


Figura 4.3. Apparecchiatura integrata gascromatografo-spettrometro di massa (GC/MS).

Questi sistemi hanno la possibilità di registrare e memorizzare un cromatogramma tramite la misura della corrente ionica totale dello spettrometro in funzione del tempo di eluizione. La corrente ionica totale non è altro che la somma di tutte le correnti generate dai vari ioni con rapporto massa/carica diverso che raggiungono il rivelatore di ioni dello spettrometro. Inoltre, per ogni picco di corrente ionica totale lo spettrometro di massa registra lo spettro di massa vero e proprio, cioè misura la corrente ionica per ogni valore del rapporto m/c. Lo spettro di massa ottenuto è successivamente confrontato con quelli disponibili in una libreria molto numerosa di spettri di massa memorizzata nell'elaboratore che gestisce il funzionamento dello strumento, fino a identificare il composto in studio.

In alternativa alla registrazione degli spettri di massa durante l'eluizione cromatografica si può avere un funzionamento in cui lo spettrometro misura

esclusivamente un particolare valore di massa impostato dall'operatore. Con questa funzione, utile quando si ricerca una particolare sostanza o un particolare raggruppamento molecolare, si possono ottenere sensibilità molto elevate dell'ordine di 10^{-12} g (Saini, 1995).

In anni recenti la spettrometria di massa ha rivoluzionato la ricerca sull'identificazione di prodotti naturali, diventandone la tecnica di elezione.

La tecnica richiede piccolissime quantità di materiale, fornisce informazioni accurate sul peso molecolare e sul complesso delle frammentazioni, che è spesso caratteristico, e permette la caratterizzazione pressoché certa del composto.

L'associazione della spettrometria di massa alla gas-cromatografia consente l'identificazione di molecole da miscele a volte complesse, sfruttando le caratteristiche peculiari della gas cromatografia. Questa tecnica sfrutta, appunto, il diverso tempo di eluizione dei componenti gassificati di una miscela attraverso una colonna termostata a temperature definite e spinti da un gas di trasporto inerte, generalmente azoto o elio.

Per la cromatografia sono state messe a punto fasi stazionarie molto complesse ricche in componenti in grado di creare interazioni con i più svariati gruppi funzionali e quindi utili alla separazione di miscele contenenti anche composti molto simili tra loro.

Questo è possibile grazie anche all'impiego di colonne capillari molto lunghe e alla possibilità di programmare gradienti di temperatura.

Il limite di questa tecnica è la trasformazione in fase gassosa di tutti i componenti delle miscele. Spesso, infatti, alcuni di questi composti hanno alti punti di ebollizione o si degradano facilmente per azione del calore.

Gli oli essenziali ottenuti sia dall'epicarpo sia dalle foglie di Cedro sono stati sottoposti ad analisi gas-cromatografica associata a spettrometria di massa (GC-MS), utilizzando un gas-cromatografo Hewlett-Packard 6890N corredato di colonna capillare con fase stazionaria non polare in metilsilicone, SE30 (30 m x 0.25 mm, 0.25 μ m), associato a uno spettrometro di massa Hewlett-Packard 5973N.

Le analisi sono state realizzate con la seguente programmata di temperatura: isoterma a 50 °C per cinque minuti, aumento graduale della temperatura di 16 °C al minuto da 50 °C a 250 °C, infine isoterma a 250 °C per 10 minuti. La ionizzazione dei composti è stata realizzata per impatto elettronico (E.I., 70 eV). Come gas di trasporto è

stato utilizzato l'elio. L'iniettore e il detector sono stati mantenuti a 250 °C e 280 °C, rispettivamente.

Le analisi sono state realizzate utilizzando anche una colonna capillare con fase stazionaria polare, HP-Innowax (30 m, 0.25 mm i.d., 0.25 µm) e mantenendo inalterate le condizioni di esercizio impiegate per la prima colonna. Per le analisi gli oli essenziali sono stati disciolti in cloroformio (1 mg/ml) e aliquote di 1 µl sono state direttamente iniettate nello strumento.

I costituenti sono stati identificati mediante confronto dei loro indici di ritenzione con quelli presenti in letteratura e con quelli di standard e mediante confronto degli spettri di massa in entrambe le colonne con quelli delle librerie Wiley 138, Wiley 275 e NIST98, di cui è dotata la strumentazione, con gli spettri di massa riportati in letteratura (Adams, 1995) e con il confronto con standards puri.

Gli indici di ritenzione sono stati determinati in relazione a una serie omologa di *n*-alcani nelle stesse condizioni operative.

4.6. Dosaggio quantitativo di principi attivi del Cedro

4.6.1. Dosaggio dei polifenoli totali

Il contenuto in polifenoli totali degli estratti ottenuti dalle differenti porzioni (epicarpo, mesocarpo, endocarpo, fiori, foglie) dei frutti di Cedro maturi e immaturi è stato valutato utilizzando il metodo di Folin-Ciocalteau (Gao *et al.*, 2000).

Il saggio consiste nell'aggiungere 200 µl del reattivo di Folin-Ciocalteau e 2 ml di acqua a 100 µl dell'estratto da analizzare. Dopo 8 min e 30 sec si aggiunge 1 ml di Na₂CO₃ al 15% e si misura l'assorbanza a 765 nm (spettrofotometro Perkin Elmer Lambda 40 UV/VIS) dopo aver lasciato il campione per 2 ore a temperatura ambiente.

Nel saggio è stato utilizzato acido clorogenico come standard e i risultati sono stati determinati in triplicato.

Il contenuto in polifenoli totali è stato espresso alla fine come equivalenti di acido clorogenico in mg per 100 g di pianta fresca (FW).

4.6.2. Dosaggio dei flavonoidi totali

Il contenuto in flavonoidi totali è stato valutato usando un metodo basato sulla formazione di un complesso flavonoide-alluminio (Yoo *et al.*, 2008).

Il test prevede l'aggiunzione di un millilitro di estratto o delle soluzioni standard di quercetina in una provetta contenente 5 ml di acqua distillata. In seguito si aggiungono 0.3 ml di una soluzione al 5% (w/v) di nitrito di sodio. Dopo 5 min si aggiungono 0.6 ml di una soluzione al 10% (w/v) di $AlCl_3$ e, dopo altri 6 min, 2 ml di idrossido di sodio 1 M e 2.1 ml di acqua distillata.

L'assorbanza è letta a 510 nm (spettrofotometro Perkin Elmer Lambda 40 UV/VIS). Nel saggio è stato utilizzato il flavonoide quercetina come standard e i risultati sono stati determinati in triplicato. I dati sono stati espressi come milligrammi di quercetina equivalenti (QE)/100 g di pianta fresca (FW).

4.6.3. Dosaggio quantitativo e caratterizzazione dei flavonoidi del Cedro

Il contenuto in principi attivi di una pianta, sia essa medicinale, officinale o destinata all'alimentazione, non è costante ma soggetto a continue variazioni in rapporto a molteplici fattori, sia ambientali sia propri dell'organismo produttore della droga. Tale variabilità costituisce un elemento fondamentale per la valutazione della capacità della pianta stessa di adattarsi all'ambiente naturale che la ospita.

Il presente lavoro di tesi ha inteso sottoporre a studio le differenti componenti dei frutti di Cedro (epicarpo, mesocarpo ed endocarpo), nonché fiori, foglie e semi, al fine di determinare la variabilità del contenuto fitochimico, in relazione alle altre parti del frutto e a eventuali processi biosintetici.

In particolare, l'obiettivo della prima parte del lavoro sperimentale è stato quello di raccogliere campioni di Cedro e mettere in relazione la variabilità quantitativa di alcuni costituenti dell'estratto, scelti da noi come markers fitochimici, con la differente influenza data alla composizione stessa dell'estratto dall'ambiente naturale di provenienza.

I markers fitochimici scelti sono: naringenina, naringina, esperetina, esperidina, rutina, nobiletina, tangeretina, quercetina, diosmina e apigenina (Fig. 4.4).

Questi appartengono alla classe chimica dei flavonoidi, metaboliti secondari da considerarsi tra i componenti più significativi per abbondanza ed attività di piante del genere *Citrus*, come il Cedro.

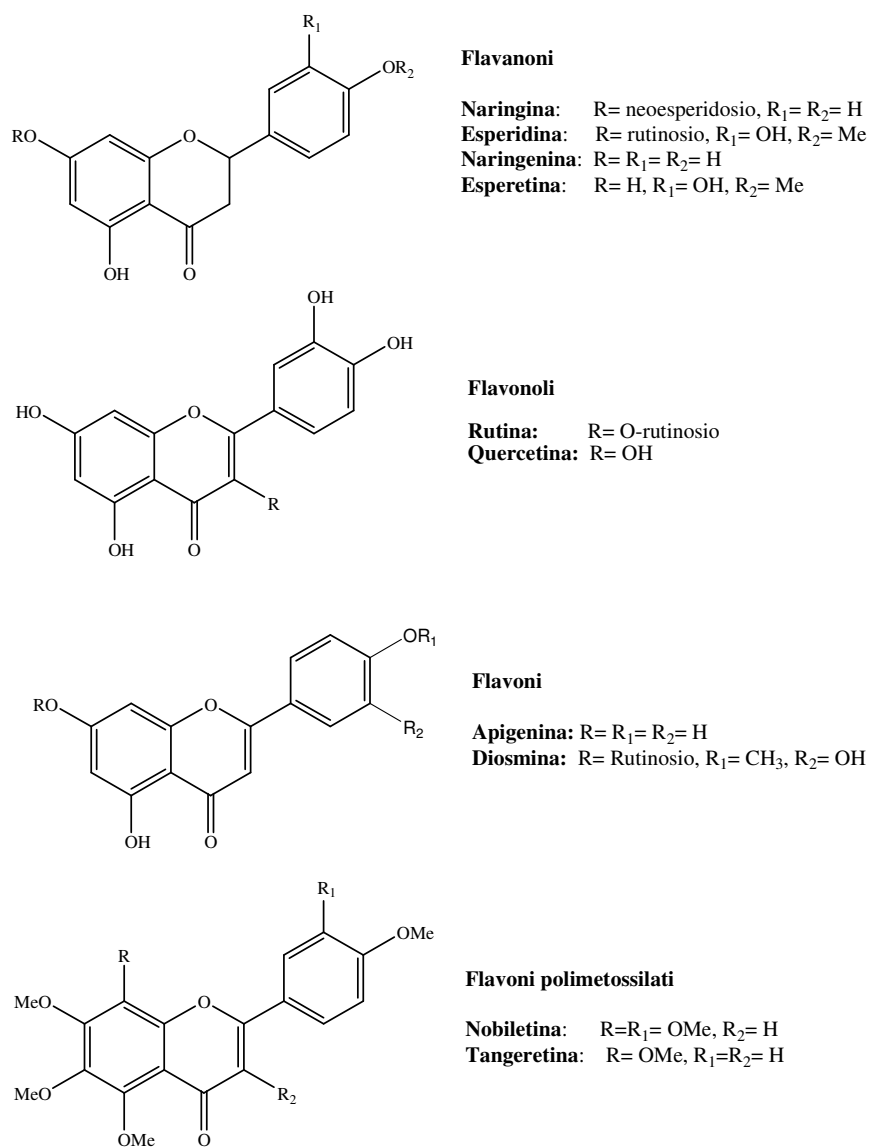


Figura 4.4. Struttura chimica dei flavonoidi scelti come markers fitochimici.

La determinazione quantitativa dei suddetti flavonoidi negli estratti di Cedro è stata realizzata mediante HPLC con la tecnica dello standard esterno, previa purificazione di tutti gli estratti mediante estrazione in fase solida (SPE).

Tale estrazione ha previsto l'impiego di un "SPE 12-Position Vacuum Manifold Set", con un vuoto di esercizio pari a 15 mmHg e fasi solide Phenomenex del tipo strata-X (33 µm) a fase inversa, con un gruppo funzionale del tipo riportato in Fig. 4.5.

Il protocollo sperimentale sviluppato è il seguente:

- 1) “Condition”: 200 mg del campione sono pesati e portati a volume (12 ml) con acqua distillata;
- 2) “Equilibrate”: la SPE è lavata con 20 ml di metanolo e portata a condizioni ottimali facendo eluire una soluzione di metanolo al 5% per un volume totale di 24 ml;
- 3) “Load”: l’estratto è caricato e fatto eluire in modo completo sulla SPE;
- 4) “Wash”: la SPE è lavata con 20 ml di una soluzione di metanolo al 5% per un volume totale di 24 ml per eliminare le impurezze;
- 5) “Elute”: dopo un tempo di latenza di circa 3 minuti, 10 ml di metanolo sono fatti eluire attraverso la SPE per l’ottenimento della frazione contenente i principi attivi desiderati (flavonoidi).



Figura 4.5. SPE Phenomenex: strata-X.

Le frazioni purificate di ogni estratto di Cedro sono state, quindi, sottoposte ad analisi quantitativa mediante HPLC (High Performance Liquid Chromatography), modello HP 1100, equipaggiato con pompa quaternaria, rivelatore UV-visibile con lunghezza d’onda a 280 nm e colonna Phenomenex Luna 5 μm C18,250 x 4.60 mm. La fase mobile è costituita da una miscela di acqua/acido formico (0.1%) (A) e metanolo (B) con un flusso di 1 ml/min.

Le analisi sono realizzate con una programmata suddivisa in quattro “step”: 100% di A per 2 min; 80% di A per 8 min; 100% di B per 55 min; 100% di A per 65 min.

La colonna è mantenuta alla temperatura di 40 °C e l’eluente è monitorato con un detector UV alla lunghezza d’onda di 280 nm.

I flavonoidi sono identificati confrontando i loro tempi di ritenzione e i relativi spettri nell'ultravioletto con quelli di standards puri, acquistati dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia). Tutte le determinazioni sono realizzate in triplicato e sottoposte a media statistica.

4.6.4. Analisi quantitativa dell'olio essenziale di Cedro

La separazione dei composti attraverso la gas cromatografia (GC), oltre a fornire un ottimo materiale da sottoporre alla spettrometria di massa per l'identificazione dei composti, consente la determinazione quantitativa attraverso il confronto cromatografico con uno standard interno o esterno.

La determinazione quantitativa dei componenti dell'olio essenziale dell'epicarpo e delle foglie di Cedro è stata condotta utilizzando un gas cromatografo Shimadzu, modello GC 17, dotato di un detector FID ed una colonna capillare 30 m x 0.25 mm, controllata da uno specifico software (Borwin versione 1.22, JMBS Developments, Grenoble, Francia). Le analisi sono state realizzate con la seguente programmata di temperatura: isoterma a 50 °C per cinque minuti, aumento graduale della temperatura di 16 °C al minuto da 50 °C a 250 °C, infine isoterma a 250 °C per 10 minuti. Come gas di trasporto è stato utilizzato l'azoto. L'iniettore e il detector sono stati mantenuti rispettivamente a 250 °C e 280 °C. Le percentuali relative dei componenti l'olio essenziale sono state calcolate sulla base delle aree dei picchi in GC.

La gas cromatografia (GC) è una tecnica analitica che è stata intensamente studiata e impiegata da più di 40 anni per risolvere un'ampia varietà di problemi analitici. Come risultato, sono state trovate le condizioni per separare virtualmente tutte le classi di composti per le quali essa è adatta. Sulla base di questa conoscenza, gli sforzi per lo sviluppo della tecnica proseguono con lo scopo di ottimizzare analisi specifiche.

La cromatografia gas-liquido (GLC) è ritenuto il metodo migliore per analizzare in modo rapido una serie di composti che risultano essere molto volatili. Essa si basa sulla ripartizione dei componenti tra una fase mobile gassosa e una fase stazionaria liquida costituita da uno strato superficiale su un mezzo di supporto solido.

Per il normale lavoro analitico si adopera una colonna riempita con il supporto di fase stazionaria.

I componenti della miscela sono trasportati lungo la colonna, si separano in conformità al loro coefficiente di ripartizione tra la fase mobile e la fase stazionaria e fuoriescono dalla colonna per entrare in un sistema di rilevazione collegato all'uscita della colonna stessa. Il segnale del rivelatore è amplificato e inviato alla penna di un registratore (Vogel *et al.*, 1988). La composizione qualitativa della miscela è determinata esaminando il grafico ottenuto con questa procedura. La temperatura della colonna deve essere sufficientemente alta, in modo che ogni soluto possieda una tensione di vapore abbastanza elevata e, quindi, venga fluito in un tempo ragionevole. Il rivelatore è mantenuto a una temperatura più alta rispetto a quella della colonna per garantire che ogni soluto si presenti in fase gassosa.

Nel caso di un liquido, le dimensioni del campione iniettato sono di 0.1-2 µl per una cromatografia analitica, ma possono raggiungere i 20-1000 µl in una cromatografia preparativa. Per campioni gassosi, i volumi dell'ordine di 0.5-10 ml vengono iniettati utilizzando una siringa a tenuta di gas o una valvola di campionamento.

4.7. Risultati e discussione

4.7.1. Costituenti chimici degli estratti di Cedro

I frutti in due stadi maturativi (maturi e immaturi) e nelle differenti componenti (epicarpo, mesocarpo ed endocarpo), i fiori, le foglie e i semi di *C. medica* cv Diamante (Cedro) sono stati sottoposti a estrazione attraverso la tecnica della macerazione ed i relativi estratti sono stati analizzati mediante metodiche cromatografiche, con lo scopo di caratterizzare i differenti campioni, in relazione al contenuto di markers fitochimici scelti (flavonoidi), e di selezionare tra essi, in relazione alle differenze fitochimiche, il più attivo dal punto di vista biologico.

Dosaggio dei polifenoli e dei flavonoidi totali

I composti fenolici rappresentano una delle principali classi di metaboliti secondari, che comprendono un ampio spettro di sostanze molto eterogenee, tutte caratterizzate dalla presenza di un anello aromatico con uno o più sostituenti ossidrilici. In alcuni casi la funzione ossidrilica può essere mascherata da una *O*-metilazione o da altro tipo di sostituzione; inoltre, molti composti accanto agli -OH fenolici contengono altri gruppi funzionali, che influenzano le loro proprietà chimico-fisiche. Sebbene un cospicuo

numero di sostanze fenoliche sia stato ritrovato in organismi animali, la presenza di una frazione fenolica è una caratteristica peculiare dei tessuti vegetali.

I fenoli sono particolarmente importanti nei prodotti ortofrutticoli in cui hanno un ruolo preminente nel determinare colore e sapore. In particolare si associa agli acidi fenolici il sapore acidulo, ai tannini l'astringenza, mentre il sapore amaro è spesso associato ad alcuni flavonoidi quali naringenina e neoesperidina; il colore, infine, viene determinato dalla presenza degli antociani e dalle loro caratteristiche reazioni di copigmentazione.

Il contenuto dei composti fenolici nei tessuti vegetali varia in funzione della specie, della varietà, dell'organo considerato, dello stadio fisiologico e delle condizioni pedoclimatiche. Accanto alle forme monomere vi sono quattro importanti gruppi di polimeri fenolici: lignine, tannini, melanine e suberina. Finora sono state identificate diverse migliaia di strutture fenoliche, tra le quali la classe dei flavonoidi è quella numericamente più consistente.

Piante del genere *Citrus* sono note essenzialmente per la bontà dei loro frutti in campo alimentare, ma hanno anche notevole valore nella medicina tradizionale.

Due farmaci tradizionali cinesi, usati nel trattamento delle indigestioni, *zhi qiao* e *zhi shi*, sono ottenuti dall'epicarpo rispettivamente di frutti maturi ed immaturi del *Citrus aurantium* L. (Huang and Wang, 1993). Nella moderna fitoterapia europea la buccia dei frutti di *C. aurantium* è usata per trattare la dispepsia (Wichtl and Bisset, 1994; Blumenthal *et al.*, 1998). L'epicarpo essiccato di *C. unsi*, noto come "Chinpi", è da tempo usato nella medicina popolare cinese e giapponese per migliorare le condizioni bronchiali e asmatiche o cardiache e la circolazione sanguigna.

I flavonoidi sono molto abbondanti in piante del genere *Citrus*. I flavonoidi sono il gruppo di fenoli di origine naturale maggiormente diffuso. Il termine flavonoide fu usato per la prima volta da Geissman nel 1952 per classificare tutti quei composti caratterizzati dal possedere una colorazione gialla (dal latino "flavus", giallo), la cui struttura era correlabile con quella del flavone (2-fenil-cromone).

A seconda del grado di metabolizzazione raggiunto, sono distribuiti nel regno vegetale sotto forma sia di agliconi sia di eterosidi. Pur non essendo ancora chiari i motivi che determinano l'arresto del processo biosintetico ad un certo stadio, è stata notata una anomala produzione di tali molecole, che ne determina l'accumulo in alcune

parti della pianta; così, gli eterosidi sono più comuni nei fiori, nei frutti e nelle foglie, mentre gli agliconi sono più abbondanti nei tessuti legnosi (fusto, rami e radici). Alcuni flavonoidi non hanno gruppi ossidrilici, oppure sono completamente alchilati (es. nobiletina e tangeretina); non potendosi, quindi, legare ad unità zuccherine, sono presenti in natura soltanto come agliconi.

La struttura base della molecola dei flavonoidi può essere individuata nel γ -benzopirone, formalmente ottenuto dalla condensazione del benzene con il chetone in γ del pirano (γ -pirone). Questo è sostituito con un anello aromatico, per formare lo scheletro tipico dei flavonoidi C₆-C₃-C₆, a 15 atomi di carbonio. La posizione di questo anello aromatico e la presenza di sostituenti ossidrilici sugli anelli in diverse posizioni, consentono di individuare varie classi di composti appartenenti alla famiglia dei flavonoidi: flavoni, isoflavoni, flavanoni, flavonoli, flavan-3,4-dioli, antocianine, catechine, pro(anto)cianidine. Differenti da queste classi sono i calconi, in cui l'anello centrale C si presenta in forma aperta, e gli auroni, in cui l'anello C è a cinque atomi di carbonio.

I flavonoidi hanno dimostrato di possedere molteplici attività biologiche, tra le quali si possono annoverare l'attività antibatterica e antivirale (Hanasaki *et al.*, 1994), l'attività antinfiammatoria, antiallergica (Hope *et al.*, 1983; Middleton *et al.*, 1993; Hanasaki *et al.*, 1994) e vasodilatoria (Duarte *et al.*, 1996). Inibiscono la perossidazione lipidica (LPO) (Salvayre *et al.*, 1988), l'aggregazione piastrinica, la permeabilità e la fragilità capillare (Robak *et al.*, 1988; Budavari *et al.*, 1989), nonché l'attività di enzimi, come la ciclo-ossigenasi e la lipo-ossigenasi (Hodnick *et al.*, 1988). I flavonoidi mostrano queste attività anche in qualità di antiossidanti, "scavengers" di radicali liberi (Cavallini *et al.*, 1978) e chelanti di cationi bivalenti (Afanas'ev *et al.*, 1989).

La ricerca di sostanze fenoliche negli estratti di *C. medica* cv Diamante è stata condotta utilizzando il saggio di Folin-Ciocalteu.

Il reattivo di Folin-Ciocalteu è costituito da una miscela di acido fosfotungstico (H₃PW₁₂O₄₀) e acido fosfomolibdico (H₃PMo₁₂O₄₀), che si riduce sotto condizioni alcaline in una miscela di ossidi blu di tungsteno e molibdeno (W₈O₂₃ e Mo₈O₂₃), grazie all'ossidazione dei fenoli.

La colorazione blu prodotta è direttamente proporzionale alla quantità di fenoli. Il contenuto in polifenoli totali è espresso come milligrammi equivalenti di acido

clorogenico per grammo di prodotto e, infine, convertito in milligrammi equivalenti di acido clorogenico/100 g di materiale vegetale fresco (FW).

Tabella 4.3. Contenuto totale di polifenoli e flavonoidi nei campioni di Cedro.

Campione	Polifenoli (mg/100g FW)	Flavonoidi (mg/100g FW)
<i>Cedri immaturi</i>		
Mesocarpo	181.3 ± 3.1	95.7 ± 3.2
Endocarpo	262.6 ± 3.7	64.9 ± 3.2
<i>Cedri maturi</i>		
Epicarpo	441.2 ± 3.2	105.5 ± 4.6
Mesocarpo	123.1 ± 6.5	43.1 ± 1.2
Endocarpo	109.4 ± 2.9	37.5 ± 1.6
Semi	83.5 ± 1.8	11.9 ± 0.9
Fiori	398.0 ± 3.2	266.9 ± 7.2
Foglie	401.6 ± 5.1	97.5 ± 2.8

I valori rappresentano la media ± S.D. ($n = 3$); FW: "fresh weight".

Come evidenziato in tabella 4.3 e figura 4.6 i campioni che si caratterizzano per il maggior contenuto in polifenoli totali sono alcuni campioni nella fase matura, e in particolare l'estratto dell'epicarpo con un valore di 441.2 mg/100 g di materiale fresco, l'estratto delle foglie con un valore di 401.6 mg/100 g FW e quello dei fiori (398.0 mg/100g FW).

Lo stesso risultato si rispecchia nel contenuto in flavonoidi totali. In questo caso si segnala, però, il maggior contenuto flavonoidico dei fiori (266.9 mg/100 g di materiale fresco).

Nello stadio immaturo il maggior contenuto in polifenoli totali è presente nell'endocarpo con un valore di 262.6 mg/100 g di materiale fresco, mentre il maggior contenuto flavonoidico lo si riscontra nel mesocarpo (95.7 mg/100 g di materiale fresco).

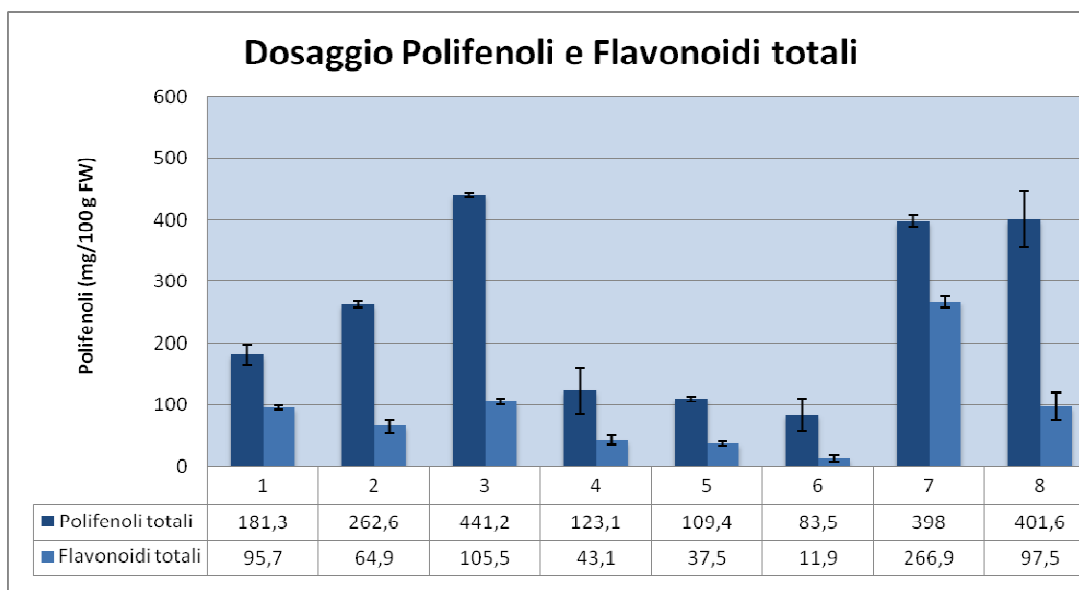


Figura 4.6. Dosaggio dei polifenoli e dei flavonoidi totali negli estratti di *C. medica* cv Diamante. 1: estratto dei semi; 2: estratto dei fiori; 3: estratto dell'epicarpo dei frutti maturi; 4: estratto del mesocarpo dei frutti maturi; 5: estratto dell'endocarpo dei frutti maturi; 6: estratto del mesocarpo dei frutti immaturi; 7: estratto dell'endocarpo dei frutti immaturi; 8: estratto idroalcolico delle foglie.

Il campione che si caratterizza per il più basso contenuto in polifenoli e flavonoidi è in assoluto l'estratto dei semi, con valori rispettivamente di 83.5 mg/100 g e 11.9 mg/100 g di materiale fresco.

Dosaggio mediante HPLC e caratterizzazione dei flavonoidi del Cedro

L'epicarpo dei frutti di *Citrus* è una ricca fonte di flavanoni, così come di flavoni polimetossilati, davvero rari in altre piante (Nogata *et al.*, 2006). I flavanoni più abbondanti sono esperetina e naringenina, entrambi ampiamente identificati nei frutti così come i loro rispettivi glucosidi, esperidina e naringina (Lu *et al.*, 2006).

Tangeretina e nobiletina sono due flavoni polimetossilati, comunemente identificati nell'epicarpo di frutti di piante del genere *Citrus*. Questi composti non solo giocano un ruolo importante dal punto di vista fisiologico ed ecologico, ma sono anche di interesse commerciale per le innumerevoli applicazioni nell'industria alimentare e farmaceutica.

Naringina ed esperidina, ad esempio, sono interessanti agenti antiossidanti e anti-infiammatori (Gabor *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 1990; Emim *et al.*, 1994; Berkarda *et al.*, 1998; Kobayashi and Tanabe, 2006).

Anche i flavoni polimetossilati sono molecole di notevole interesse per le loro varie proprietà farmacologiche, le più importanti delle quali attività antitumorale, anti-infiammatoria antimutagenica e anti-allergica (Kandaswami *et al.*, 1991; Kawaii *et al.*, 1999; Miyazawa *et al.*, 1999; Murakami *et al.*, 2000a; Murakami *et al.*, 2000b; Ishiwa *et al.*, 2000). La rutina, un flavonolo glicosidico, anch'esso comunemente presente nell'epicarpo dei frutti del genere *Citrus*, ha dimostrato di possedere una spiccata attività anti-infiammatoria (Guardia *et al.*, 2001).

Sulla base di tali considerazioni i flavonoidi naringenina, naringina, esperetina, esperidina, rutina, nobiletina e tangeretina, insieme a quercetina, diosmina, apigenina sono stati scelti come markers per il dosaggio mediante HPLC degli estratti idroalcolici ottenuti dalle differenti porzioni (epicarpo, mesocarpo, endocarpo e semi) di frutti di Cedro maturi e immaturi, nonché negli estratti dei fiori e delle foglie, previa purificazione mediante estrazione in fase solida.

I risultati sono presentati in tabella 4.4, dove il contenuto flavonoidico nei differenti estratti è stato calcolato come mg/kg di materiale fresco.

L'estratto, che si caratterizza per la maggiore presenza dei flavonoidi scelti come markers fitochimici, è quello dei fiori, in cui sono stati identificati tutti i suddetti principi attivi, fatta eccezione per naringina, naringenina, nobiletina e tangeretina. L'estratto dei semi presenta, invece, soltanto naringenina e diosmina in tracce.

Il flavonoide identificato in tutti gli estratti, con l'eccezione di mesocarpo e semi dei frutti maturi, è l'apigenina con valori compresi tra i 58.0 mg/kg di materiale fresco dell'endocarpo dei frutti maturi e i 941.0 mg/kg di materiale fresco dei fiori. Interessante è anche il contenuto nell'estratto delle foglie, con un valore di 432.7 mg/kg di materiale fresco.

La naringina è presente nell'estratto del mesocarpo dei frutti immaturi con un valore di 556.0 mg/kg di materiale fresco e nell'estratto dell'epicarpo dei frutti maturi (20.0 mg/kg di materiale fresco).

Tabella 4.4. Contenuto flavonoidico (mg/kg di materiale vegetale fresco) nei campioni di Cedro.

Campione	NRG	NRT	HSD	HST	RTN	QUE	DSM	API
<i>Cedri immaturi</i>								
Mesocarpo	556.0±7.4	-	26.0±0.8	-	-	11.0±1.1	-	284.0±2.5
Endocarpo	-	-	18.4±0.6	-	484.7±3.1	-	-	108.0±3.7
<i>Cedri maturi</i>								
Epicarpo	20.0±1.8	-	-	49±1.5	-	18.9±3.2	-	61.6±2.0
Mesocarpo	-	-	-	-	-	-	18.2 ± 2.6	-
Endocarpo	-	-	9.0±0.9	-	-	-	-	58.0±3.9
Semi	-	tr	-	-	-	-	tr	-
Fiori	-	-	224.3±3.2	203.8±3.1	156.5±3.3	580.8±3.1	372.5±6.4	941.0±8.0
Foglie	-	-	-	-	264.2±3.6	7.9±0.6	-	432.7±4.3

I valori rappresentano la media ± S.D. ($n = 3$); NRG: naringina; NRT: naringenina; HSD: esperidina; HST: esperetina; RTN: rutina; QUE: quercetina; DSM: diosmina; API: apigenina.

L'esperidina, a differenza del corrispondente aglicone esperetina, è stata identificata negli estratti dei frutti immaturi con valori di 26.0 mg/kg di materiale fresco per il mesocarpo e di 18.4 mg/kg di materiale fresco per l'endocarpo. Entrambi i flavanoni sono presenti in maniera rilevante nell'estratto dei fiori con valori compresi tra i 203.8 mg/kg e 224.3 mg/kg di materiale fresco.

La rutina è abbondante nell'estratto dell'endocarpo dei frutti immaturi (484.7 mg/kg di materiale fresco), seguito dall'estratto delle foglie e dei fiori con valori rispettivamente di 264.2 mg/kg e 156.5 mg/kg di materiale fresco. E' assente in tutti gli altri estratti.

La quercetina è, invece, presente maggiormente nell'estratto dei fiori (580.8 mg/kg di materiale fresco). Quantità concretamente inferiori sono state riscontrate negli estratti delle foglie, dell'epicarpo dei frutti maturi e del mesocarpo dei frutti immaturi (valori compresi tra 7.9 mg/kg e 18.9 mg/kg di materiale fresco). Anche la diosmina è abbondante nell'estratto dei fiori con un valore di 372.5 mg/kg di materiale fresco. Negli altri estratti il flavonoide è assente, con l'eccezione del mesocarpo dei frutti maturi (18.2 mg/kg di materiale fresco) e i semi, in cui, però, è presente solo in tracce.

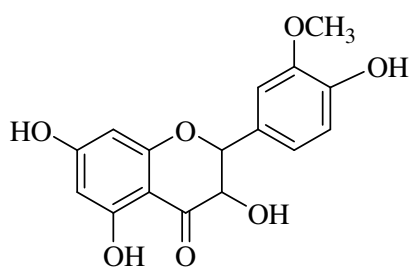
Nobiletina e tangeretina non sono stati identificati in nessuno dei campioni di Cedro.

L'analisi in HPLC delle frazioni purificate di ogni estratto di Cedro rivela la presenza di un picco, non ascrivibile a nessuno dei flavonoidi scelti come markers fitochimici. Ciò ha spinto nella direzione dell'isolamento e della caratterizzazione del principio attivo relativo al suddetto picco. Per tale scopo è stata prescelta la frazione purificata dell'estratto dell'endocarpo dei Cedri immaturi essendo in essa il picco incognito presente con una migliore risoluzione e quantitativamente più abbondante rispetto agli altri.

La frazione è stata, così, sottoposta ad analisi mediante MPLC (Medium Pressure Liquid Chromatography) comprendente: Buchi Pump Manager C-615, n.2 Pump Module, UV C-630, Fraction Collector C-660, Software Chromatography Sepacore Record 1.0, associato a una colonna Prepacked RP-Cartridges RP18ec, 40-63 μm , 12 x 150 mm. Come eluente è stata utilizzata la miscela costituita da: (A) $\text{H}_2\text{O}/\text{HCOOH}$ (0.1%) e (B) CH_3OH , in gradiente, con una velocità di flusso di 5 ml/min.

Le frazioni cromatografiche raccolte sono state esaminate tramite analisi per TLC (cromatografia su strato sottile) (UV a 254 e 365 nm; H_2SO_4 spray 50% v/v) e riunite ottenendo sei frazioni (A-F), la prima delle quali, del peso di 8.3 mg, è stata analizzata mediante NMR di tipo mono- e bi-dimensionale (^1H -NMR, ^{13}C -NMR, DEPT-135, COSY, HMQC). La struttura del prodotto è stata definita sulla base dei dati spettrali ottenuti e mediante confronto con i dati riportati in letteratura (Cao *et al.*, 2009).

L'analisi degli esperimenti ha consentito di identificare il principio attivo come isoramnetina.



Isoramnetina

4.7.2. Composizione chimica degli oli essenziali di Cedro

L'olio essenziale dell'epicarpo dei frutti di Cedro è stato ottenuto per idrodistillazione, spremitura meccanica ed estrazione in fase supercritica, con lo scopo

di valutare come la tecnica estrattiva possa influenzare il contenuto quali- quantitativo degli oli essenziali. Le rese degli oli essenziali, calcolate sul peso della pianta, sono dello 0.1% (v/w) per l'olio essenziale ottenuto per idrodistillazione, dello 0.1% (v/w) per l'olio ottenuto per spremitura meccanica e del 28% (v/w) per l'olio ottenuto mediante estrazione in fase supercritica.

Anche le foglie (2.0 kg) sono state sottoposte a idrodistillazione (Clevenger, 1928). La procedura è la medesima di quella utilizzata per il epicarpo. La resa dell'olio essenziale ottenuto dalle foglie si attesta allo 0.1% (v/w).

Al fine di identificare e quantificare i principi attivi contenuti negli oli essenziali di Cedro sono state realizzate analisi gas cromatografiche (GC) e gas cromatografiche associate a spettrometria di massa (GC-MS).

Olio essenziale dell'epicarpo dei frutti di Cedro

I dati che si riferiscono all'analisi fitochimica dell'olio essenziale dell'epicarpo dei frutti maturi di Cedro sono riportati in tabella 4.5; i cromatogrammi degli oli essenziali ottenuti con le tre tecniche estrattive sono indicati nelle Fig. 4.7, 4.8 e 4.9.

L'olio essenziale ottenuto per idrodistillazione dall'epicarpo dei frutti di Cedro presenta quarantuno costituenti rappresentanti il 95.3% della composizione totale dell'olio, dei quali i più abbondanti sono monoterpeni ciclici e aciclici.

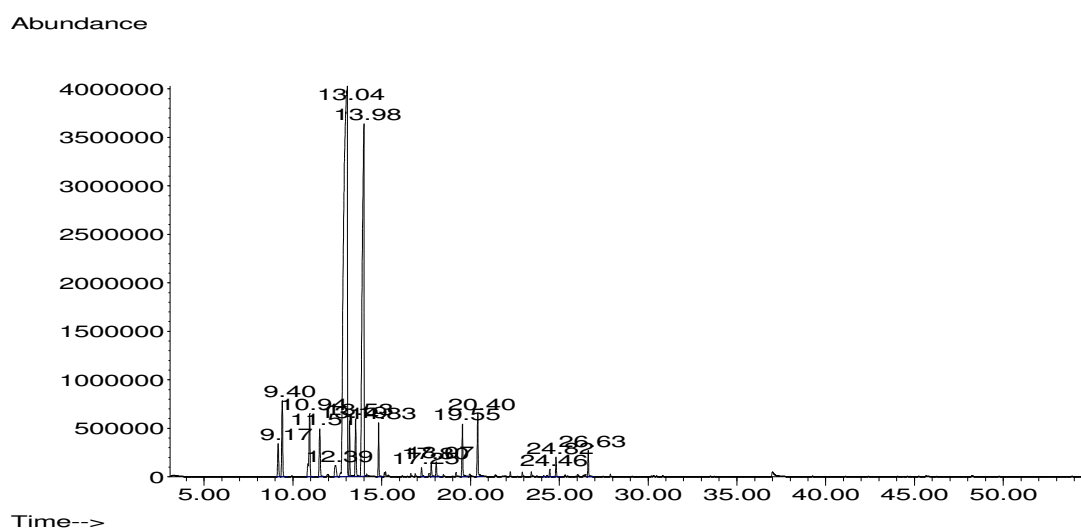


Figura 4.7. Cromatogramma dell'olio essenziale delle bucce di Cedro ottenuto per spremitura meccanica.

Tabella 4.5. Composizione chimica dell'olio essenziale dell'epicarpo ottenuto per idrodistillazione (HD), spremitura meccanica (CP) e estrazione in fase supercritica (SFE) di *C. medica* cv. Diamante.

Composto	I ^a /I ^b	Abbondanza % ^c			Metodo di identificazione ^d
		(HD)	(CP)	(SFE)	
Tujene	926/1035	1.2 ± 0.4	1.1 ± 0.6		I, MS
α-Pinene	936/1032	2.5 ± 0.9	2.5 ± 0.9		I, MS, Co-GC
Camfene	953/1076	0.9 ± 0.02	tr		I, MS
Sabinene	973/1138	0.4 ± 0.01	0.4 ± 0.02		I, MS, Co-GC
β-Pinene	978/1118	2.6 ± 0.02	2.2 ± 0.06		I, MS, Co-GC
β-Mircene	986/1174	2.1 ± 0.8	1.7 ± 0.05		I, MS, Co-GC
α-Fellandrene	1005/1186	0.2 ± 0.01	tr		I, MS
α-Terpinene	1016/1188	1.2 ± 0.3	0.3 ± 0.01		I, MS, Co-GC
p-Cimene	1025/1280	tr	tr		I, MS
Limonene	1032/1203	35.4 ± 1.5	44.5 ± 1.7	tr	I, MS, Co-GC
(E)-β-Ocimene	1047/1266	2.4 ± 0.09	2.1 ± 0.08		I, MS
γ-Terpinene	1059/1255	24.5 ± 1.4	26.2 ± 1.2		I, MS, Co-GC
cis-Sabinene idrato	1068/1450	tr	0.1 ± 0.02		I, MS
Terpinolene	1089/1290	1.5 ± 0.02	1.1 ± 0.07		I, MS, Co-GC
Linalolo	1098/1553	0.6 ± 0.01	0.1 ± 0.02		I, MS
n-Nonanale	1100/1400	0.2 ± 0.02			I, MS
2,3-Diidro-3,5-diidrossi-6-metil-4H-Piran-4-one				1.1 ± 0.02	I, MS
Citronellale	1156/	0.3 ± 0.02	0.1 ± 0.02		I, MS
Terpinen-4-olo	1178/1611	1.5 ± 0.08	0.3 ± 0.02		I, MS
α-Terpineolo	1189/1683	1.1 ± 0.06	0.2 ± 0.01	0.3 ± 0.02	I, MS
n-Decanale	1205/1506	0.1 ± 0.02	0.1 ± 0.02		I, MS
Nerolo	1232/1797	1.0 ± 0.04	0.1 ± 0.03		I, MS
Nerale	1242/1694	4.4 ± 0.02	1.1 ± 0.02		I, MS
2,3-Diidrobenzofurano				2.9 ± 0.06	I, MS
Geraniolo	1255/1857	0.3 ± 0.02	0.5 ± 0.02	0.8 ± 0.02	I, MS
Perilla aldeide	1272/	0.2 ± 0.02			I, MS
Geraniale	1275/1742	5.5 ± 0.9	2.9 ± 0.08		I, MS
Citronellil acetato	1360/	0.2 ± 0.02	0.5 ± 0.02		I, MS
Neril acetato	1370/1733	0.5 ± 0.02	0.2 ± 0.01		I, MS
Geranil acetato	1388/1765	0.4 ± 0.02	0.3 ± 0.03		I, MS
β-Elemene	1390/	0.1 ± 0.02	0.2 ± 0.02		I, MS
β-Cubebene	1392/	0.1 ± 0.02			I, MS
α-Bergamotene	1403/	0.1 ± 0.02	tr		I, MS
β-Cariofillene	1418/1612	0.3 ± 0.02	0.3 ± 0.03		I, MS, Co-GC
trans-β-Farnesene	1441/1662	0.5 ± 0.02	0.1 ± 0.02	0.2 ± 0.02	I, MS
Germacrene D	1474/1726		0.1 ± 0.01		I, MS
β-Bisabolene	1508/1741	1.2 ± 0.02	1.3 ± 0.04		I, MS
α-Umulene	1454/1690	0.2 ± 0.01			I, MS, Co-GC
γ-Cadinene	1515/1765	tr			I, MS
δ-Cadinene	1524/1772	0.2 ± 0.02			I, MS, Co-GC
Tetradecanale	1604/	tr	tr		I, MS
β-Bisabololo	1676/	0.4 ± 0.02	0.1 ± 0.01		I, MS
Eicosano	2000/2000	0.1 ± 0.01			I, MS
Docosano	2200/2200	tr			I, MS
Citroptene		0.9 ± 0.03	2.5 ± 0.04	84.5 ± 3.7	MS, Co-GC
Ossipeucedanina			0.2 ± 0.06		MS, Co-GC
Composti identificati		95.3	93.4	89.8	

^aIndice di ritenzione su colonna non polare SE-30. ^bIndice di ritenzione su colonna polare HP-Innowax. ^cValore medio ± S.D., n = 3. Composizioni con valori percentuali inferiori a 0.1% sono indicate come tracce (tr). ^dI, Indice di ritenzione; MS, spettrometria di massa; Co-GC: co-iniezione con standard.

Trentasei costituenti sono stati identificati nell'olio essenziale ottenuto mediante spremitura meccanica (93.4% della composizione totale dell'olio). In accordo con Poiana *et al.* (1998) entrambi gli oli presentano alte percentuali di limonene (35.4-44.5%) e γ -terpinene (24.5-26.2%).

Altri costituenti abbondanti nell'olio essenziale ottenuto per idrodistillazione sono geraniale (5.5%), nerale (4.4%), β -pinene (2.6%) e α -pinene (2.5%), mentre nell'olio ottenuto per spremitura meccanica sono geraniale (2.9%), citroptene (2.5%), α -pinene (2.5%) e β -pinene (2.2%).

L'olio essenziale ottenuto con la prima procedura estrattiva possiede un alto contenuto in terpinen-4-olo (1.5%), α -terpinene (1.2%) e α -terpineolo (1.1%) confrontato con l'olio ottenuto con la seconda procedura (rispettivamente 0.3%, 0.3% e 0.2%). Anche la percentuale di nerale è notevolmente differente, con valori rispettivamente di 4.4% e 0.1% negli oli ottenuti per idrodistillazione e spremitura meccanica.

Come riportato in Tab. 4.6 e Fig. 4.8 risulta evidente la selettività dell'estrazione in fase supercritica verso alcuni componenti dell'olio essenziale.

I sei composti identificati (un numero sicuramente inferiore rispetto agli oli essenziali ottenuti per idrodistillazione e spremitura meccanica) rappresentano l'89.8% del totale. Il composto più abbondante è la cumarina ciproptene (84.5%).

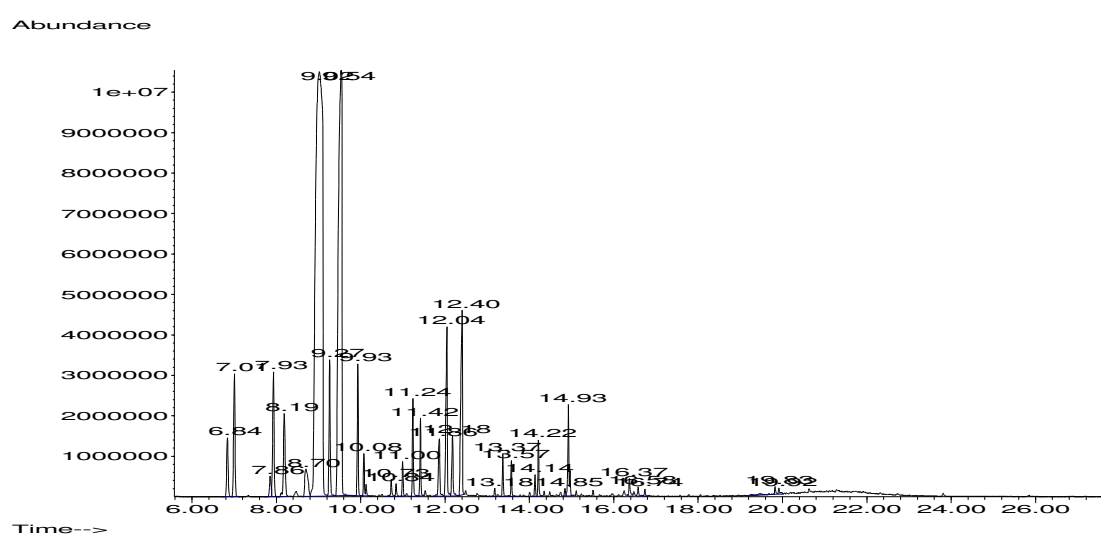


Figura 4.8. Cromatogramma dell'olio essenziale delle bucce di Cedro ottenuto per distillazione in corrente di vapore.

E' interessante, inoltre, notare come i composti 2,3-diidrobenzofurano e 2,3-diidro-3,5-dihidrossi-6-metil-4H-piran-4-one (2.9 e 1.1% rispettivamente) non sono stati identificati negli oli ottenuti con le altre due tecniche, confermando la selettività della SFE con CO₂ supercritica (31 °C and 73 bar) per tali componenti (Tozzi *et al.*, 2008).

In precedenza Verzera *et al.* (2005) hanno indicato nell'olio essenziale dell'epicarpo di *Citrus medica* L. cv Diamante ottenuto mediante spremitura meccanica limonene (51.95%), γ -terpinene (27.71%), nerolo (0.07%) e geraniolo (0.02%) come principali costituenti monoterpenici, e β -bisabolene (0.48%) e α -bergamotene (0.34%) come principali sesquiterpeni.

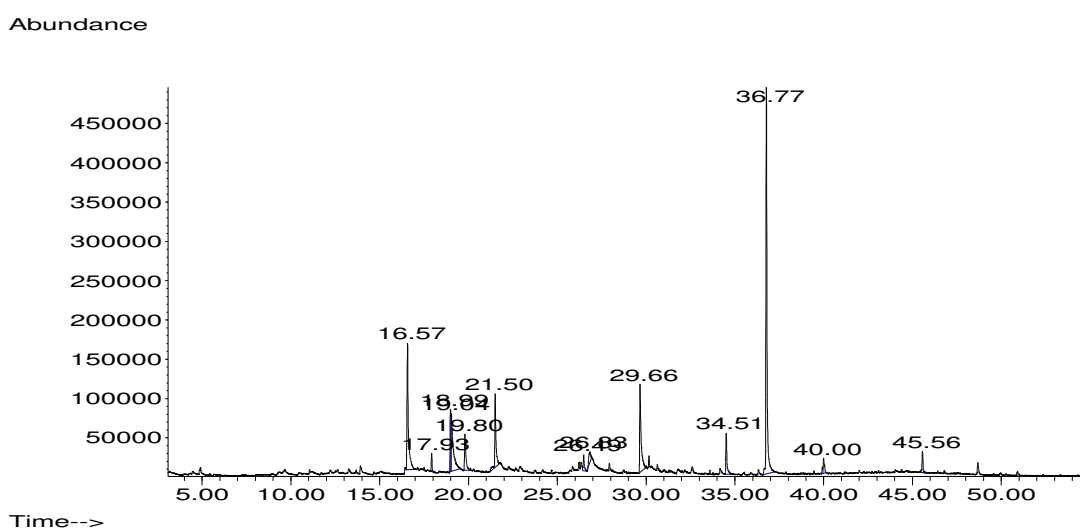


Figura 4.9. Cromatogramma dell'olio essenziale delle bucce di Cedro ottenuto per estrazione in fase supercritica (anidride carbonica).

L'olio ottenuto per idrodistillazione dell'epicarpo dei frutti di *C. medica* cv Diamante, raccolti in San Ghjulianu (Corsica), da Lota *et al.* (2005) mostra un elevato contenuto di limonene (70.4%), la presenza di geraniale e nerale in apprezzabili percentuali (14.4 e 7.6%) e una bassa quantità di γ -terpinene ($\leq 0.05\%$). Nerolo e geraniolo sono stati identificati con una percentuale dello 0.2%.

Olio essenziale delle foglie di Cedro

Trentaquattro costituenti sono stati identificati nell'olio essenziale delle foglie (92.4% della composizione totale dell'olio).

I principi attivi più abbondanti sono: limonene (35.0%) e γ -terpinene (16.1%), come per gli oli ottenuti dall'epicarpo dei frutti, geraniale (5.3%), nerale (3.9%), 9,17-octadecadienale (3.6%), 6-metil-5-epten-2-one (3.0%), geranil acetato (2.3%), nerolo (2.2%) e β -mircene (2.2%) (Tab. 4.6).

In precedenza Lota *et al.* (2005) hanno caratterizzato i costituenti dell'olio essenziale ottenuto per idrodistillazione dalle foglie, raccolte da piante di *C. medica* cv Diamante in San Ghjulianu (Corsica). Tale olio si caratterizza per la presenza come principali costituenti di limonene (43.2%), geraniale (17.0%), nerale (11.9%), geraniolo (6.0%) e nerolo (5.7%).

Differenza rilevante rispetto all'olio essenziale ottenuto dalle foglie nel presente lavoro di tesi è la quantità di γ -terpinene, monoterpene presente con una percentuale dello 0.1% nell'olio di San Ghjulianu e del 16.1% in quello calabrese.

Anche α -pinene, β -pinene e β -cariofillene, identificati in basse percentuali nell'olio essenziale del Cedro di San Ghjulianu, sono presenti nell'olio calabrese in maniera più rappresentativa, con percentuali rispettivamente del 1.7%, 1.3% e 1.3%.

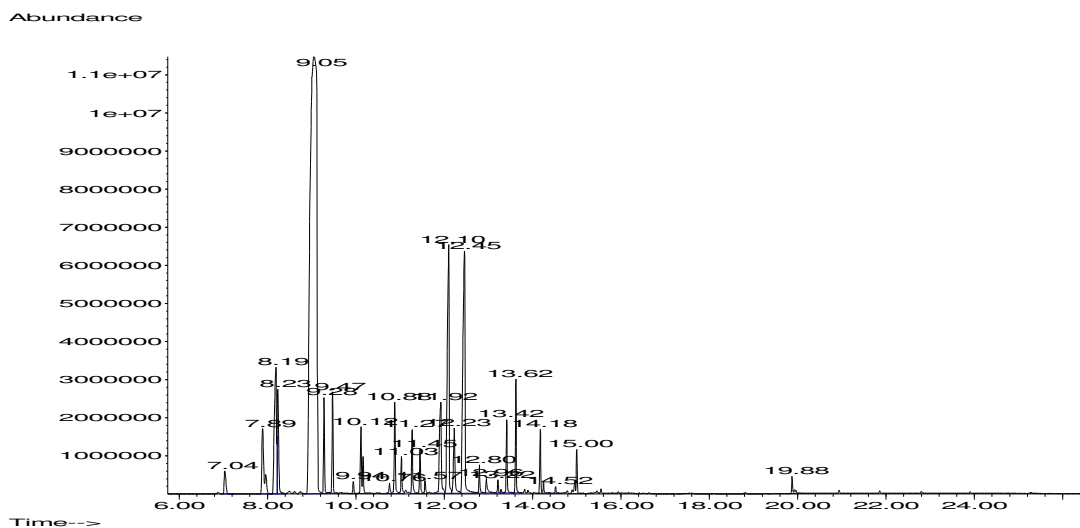


Figura 4.10. Cromatogramma dell'olio essenziale delle foglie di Cedro ottenuto per distillazione in corrente di vapore.

Tabella 4.6. Principali costituenti dell'olio essenziale ottenuto per idrodistillazione delle foglie di *C. medica* cv. Diamante.

Composto	I ^a /I ^b	Abbondanza % ^c	Metodo di identificazione ^d
Tuiene	926/1035	tr	I, MS
α -Pinene	936/1032	1.7 \pm 0.02	I, MS, Co-GC
Camfene	953/1076		I, MS
Sabinene	973/1138	1.7 \pm 0.02	I, MS, Co-GC
β -Pinene	978/1118	1.3 \pm 0.06	I, MS, Co-GC
β -Mircene	986/1174	2.2 \pm 0.05	I, MS, Co-GC
α -Fellandrene	1005/1186		I, MS
α -Terpinene	1016/1188		I, MS, Co-GC
<i>p</i> -Cimene	1025/1280	0.2 \pm 0.01	I, MS
Limonene	1032/1203	35.0 \pm 1.7	I, MS, Co-GC
1,8-Cineolo	1035/1221	0.6 \pm 0.05	I, MS, Co-GC
(<i>E</i>)- β -Ocimene	1047/1266	1.9 \pm 0.08	I, MS
γ -Terpinene	1059/1255	16.1 \pm 0.2	I, MS, Co-GC
<i>cis</i> -Sabinene idrato	1068/1450		I, MS
Terpinolene	1089/1290	0.2 \pm 0.01	I, MS, Co-GC
Linalolo	1098/1553	1.0 \pm 0.05	I, MS
<i>n</i> -Nonanale	1100/1400	0.4 \pm 0.04	I, MS
Citronellale	1156/	1.6 \pm 0.5	I, MS
Terpinen-4-olo	1178/1611		I, MS
α -Terpineolo	1189/1683	0.7 \pm 0.02	I, MS
<i>n</i> -Decanale	1205/1506		I, MS
Nerolo	1232/1797	2.2 \pm 0.8	I, MS
Nerale	1242/1694	3.9 \pm 0.9	I, MS
Geraniolo	1255/1857	1.5 \pm 0.2	I, MS
Perilla aldeide	1272/		I, MS
Geraniale	1275/1742	5.3 \pm 0.4	I, MS
Citronellil acetato	1360/	tr	I, MS
Neril acetato	1370/1733	1.1 \pm 0.07	I, MS
Geranil acetato	1388/1765	2.3 \pm 0.3	I, MS
β -Elemene	1390/		I, MS
β -Cubebene	1392/	tr	I, MS
α -Bergamotene	1403/		I, MS
β -Cariofillene	1418/1612	1.3 \pm 0.03	I, MS, Co-GC
<i>trans</i> - β -Farnesene	1441/1662	0.1 \pm 0.02	I, MS
Germacrene D	1474/1726	0.6 \pm 0.01	I, MS
β -Bisabolene	1508/1741	1.3 \pm 0.04	I, MS
α -Umulene	1454/1690		I, MS, Co-GC
6-Metil-5-epten-2-one	1502/	3.0 \pm 0.8	I, MS
γ -Cadinene	1515/1765		I, MS
δ -Cadinene	1524/1772		I, MS, Co-GC
Tetradecanale	1604/	tr	I, MS
β -Bisabololo	1676/	tr	I, MS
(<i>Z</i>)-9-Octadecenale	1990/	1.1 \pm 0.07	I, MS
(<i>Z</i>)-9,17-Octadecadienale	1996/	3.6 \pm 0.9	I, MS
Eicosano	2000/2000		I, MS
Metil stearato	2141/	0.5 \pm 0.03	I, MS
Citroptene			MS, Co-GC
Ossipeucedanina			MS, Co-GC
Composti identificati		92.4	

^aIndice di ritenzione su colonna non polare SE-30. ^bIndice di ritenzione su colonna polare HP-Innowax. ^cValore medio \pm S.D., *n* = 3. Composizioni con valori percentuali inferiori a 0.1% sono indicate come tracce (tr). ^dI, Indice di ritenzione; MS, spettrometria di massa; Co-GC: co-iniezione con standard.

Confrontando l'olio essenziale ottenuto per idrodistillazione dall'epicarpo dei frutti e l'olio ottenuto con la medesima tecnica dalle foglie, è possibile sottolineare alcune rilevanti differenze nella composizione percentuale di alcuni costituenti, tra cui il γ -terpinene (24.5% dell'epicarpo rispetto al 16.1% delle foglie), geraniolo (0.3% dell'epicarpo rispetto all'1.5% delle foglie), geranyl acetato (0.4% dell'epicarpo rispetto al 2.3% delle foglie), β -cariofillene (0.3% dell'epicarpo rispetto al 1.3% delle foglie) e tuiene (1.2% dell'epicarpo rispetto a percentuali < 0.1% delle foglie).

BIBLIOGRAFIA

- Adams R. (1995). *Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy*. Allured Publishing Co., Carol Stream.
- Afanas'ev IB, Dorozhko AI, Brodskii AV, Kostyuk VA, Potapovitch AI. (1989). Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 38, 1763-1769.
- Berkarda B, Koyuncu H, Soybir G, Baykut F. (1998). *Res. Exp. Med.*, 198, 93-99.
- Blumenthal M, Busse R, Goldberg A, Gruenwald J, Hall T, Riggins CW, Rister RS. (1998). "The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines," American Botanical Council, Austin.
- Budavari S, O'Neil MJ, Smith A, Heckelman PE. (eds.) (1989). *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals. Drugs and Biologicals*, 11th ed., Merck & Co., Inc., USA.
- Cao X, Wei Y, Ito Y. (2009). Preparative isolation of isorhamnetin from *Stigma Maydis* using High Speed Countercurrent Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 32, 273-280.
- Cavallini L, Bindoli A, Siliprandi N. (1978). Comparative evaluation of antiperoxidative action of silymarin and other flavonoids. *Pharmacol. Res. Commun.* 10, 133-136.
- Chen YT, Zheng RL, Jia ZY, Ju Y. (1990). *Free Radic. Biol. Med.*, 9, 19-21.
- Clevenger JF. (1928). Apparatus for determination of volatile oil. *J Am Pharm Assoc* 17: 346-341.
- Corasaniti MT, Maiuolo J, Maida S, Fratto V, Navarra M, Russo R, Amantea D, Morrone LA, Bagetta G. (2007). *Br J Pharmacol.*, 151, 518-529
- Duarte J, Vizcaino FP, Utrilla P, Jimenez J, Tamargo J, Zarzuelo A. (1993). Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure activity relationships. *Biochem. Pharmacol.* 24, 857-862.
- Emim JAS, Oliveira AB, Lapa AJ. (1994). *J. Pharm. Pharmacol.*, 46, 118-122.
- Gabor M. (1988). "Szent-Györgyi and the bioflavonoids: new results and perspectives of pharmacological research into benzo-pyrone derivatives," Plant flavonoids in

- biology and medicine II, eds. by Cody V, Middleton E Jr., Harborne JB, Beretz A, Alan R Liss Inc., New York, pp. 1-15.
- Gao X, Ohlander M, Jeppsson N, Bjork L, Trajkovski V. (2000). Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1485-1490.
- Guardia T, Rotelli AE, Juarez AO, Pelzer LE. (2001). *Farmaco*, 56, 683-687.
- Hanasaki Y, Ogawa S, Fnkui S. (1994). The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biol. Med.* 16, 845-850.
- Hodnick WF, Milosavljevic EB, Nelson JH, Pardini RS. (1988). Electrochemistry of flavonoids: Relationships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration and production of oxygen radicals by flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* 37, 2607-2611.
- Hope WC, Welton AF, Fielder-Nagy C, Batula-Bernardo C, Coffey JW. (1983). *In vitro* inhibition of the biosynthesis of slow reacting substances of anaphylaxis (SRS-A) and lipoxygenase activity of quercetin. *Biochem. Pharmacol.* 32, 367-371.
- Huang B, Wang Y. (1993). "Thousand Formulas and Thousand Herbs of Traditional Chinese Medicine," Vol. 1, Heilongjiang Education Press, Harbin.
- Kandaswami C, Perkins E, Soloniuk DS, Drzewiecki G, Middleton E. (1991). *Cancer Lett.*, 56, 147-152.
- Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M. (1999). *J. Agric. Food Chem.*, 47, 128-135.
- Khanna D, Sethi G, Ahn KS, Pandey MK, Kunnnumakkara AB, Sung B, et al. (2007). Natural products as a gold mine for arthritis treatment. *Opinion in Pharmacology*, 7, 344-351.
- Kobayashi S, Tanabe S. (2006). *Int. J. Mol. Med.*, 17, 511-515.
- Ishiwa J, Sato T, Mimaki Y, Sashida Y, Yano M, Ito A. (2000). *J. Rheumatol.* 27, 20-25.
- Lampronti I, Saab AM, Gambari R. (2006). Antiproliferative activity of essential oils derived from plants belonging to the Magnoliophyta division. *Int J Oncol.* 29, 989-95.

- Lota ML, de Rocca Serra D, Tomi F, Bessiere JM, Casanova J. (1999). Chemical composition of peel and leaf essential oils of *Citrus medica* L. and *C. limonimeditica* Lush. *Flavour Fragr J.*, *14*, 161-166.
- Lu Y, Zhang C, Bucheli P, Wei D. (2006). *Plant Foods Hum. Nutr.*, *61*, 57-65.
- Middleton E Jr, Kandaswami C. (1993). The impact of plant flavonoids on mammalian biology: Implications for immunity, inflammation and cancer. In *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. (J.B. Harborne, ed.), p. 619-652, Chapman and Hall, London, UK.
- Miyazawa M, Okuno Y, Fukuyama M, Nakamura S, Kosaka H. (1999). *J. Agric. Food Chem.*, *47*, 5239-5244.
- Morelli I. (1981) "I Principi attivi delle piante medicinali", Edagricole.
- Murakami A, Nakamura Y, Torikai K, Tanaka T, Koshiha T, Koshimizu K, Kuwahara S, Takahashi Y, Ogawa K, Yano M, Tokuda H, Nishino H, Mimaki Y, Sashida Y, Kitanaka S, Ohigashi H. (2000a). *Cancer Res.*, *60*, 5059-5066.
- Murakami A, Nakamura Y, Ohto Y, Yano M, Koshiha T, Koshimizu K, Tokuda H, Nishino H, Ohigashi H. (2000b). *Biofactors*, *12*, 187-192.
- Nogata Y, Sakamoto K, Shiratsuchi H, Ishii T, Yano M, Ohta H. (2006). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, *70*, 178-192.
- Poiana M, Sicari V, Mincione B. (1998). A comparison between a chemical composition of the oil, solvent extract and supercritical carbon dioxide extract of *Citrus medica* L. Cv Diamante. *J. Essent. Oil Res.*, *10*, 145-152.
- Robak J, Gryglewski RJ. (1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.* *37*, 837-841.
- Rubinson KA, Rubinson JF. (2002). *Chimica analitica strumentale*, 472-473.
- Saini G, Mentasti E. (1995). *Fondamenti di chimica analitica*, 403-410.
- Salvayre R, Negre A, Affany A, Lenoble M, Douste-Blazy L. (1988). Protective effect of plant flavonoids, analogs and vitamin E against lipid peroxidation of membranes. In *Plant Flavonoids in Biology and Medicine II. Biochemical, Cellular and Medicinal Properties*, Alan R. Liss, New York, NY USA, 313-316.
- Tozzi R, Mulinacci N, Storliken K, Pasquali I, Vincieri FF, Bettini R. (2008). Supercritical extraction of carotenoids from *Rosa canina* L. hips and their formulation with beta-cyclodextrin. *AAPS Pharm Sci Tech*, *9*, 693-700.

- Verzera A, Trozzi A, Zappala M, Condurso C, Cotroneo A. (2005). Essential oil composition of *Citrus meyerii* Y. Tan. and *Citrus medica* L. cv. Diamante and their lemon hybrids. *J Agric Food Chem.*, 53, 4890-4894.
- Furniss BS, Hannaford AJ, Rogers V, Smith PWG, Tatchell AR. (1988). *Vogel Chimica organica pratica*. Editore CEA.
- Yoo MK, Lee CH, Lee H, Moon B, Lee CY. (2005). Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food Chemistry*, 106, 929-936.
- Wichtl M, Bisset NG. (1994). "Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals," Trans from 2nd German ed., Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart.

CAPITOLO 5

Valutazione dell'attività biologica del *Citrus medica* L. cv Diamante

5.1. Introduzione

Le piante sono sempre più utilizzate per applicazioni nel settore farmaceutico e cosmetico. Negli ultimi anni si è passati da uno sfruttamento diretto delle risorse naturali a una loro coltivazione intensiva, che richiede come punto di partenza una selezione, all'interno delle varie specie, delle varietà o cultivar più adatte ai fini applicativi. La scelta è operata in primo luogo in base al chemotipo ovvero alla quantità e alla concentrazione dei principi attivi, che può differire anche notevolmente all'interno di una singola specie. Tale variabilità è determinata principalmente da fattori genetici e ambientali che concorrono nel determinare la scelta del prodotto utilizzato.

Con lo screening fitochimico di piante a uso alimentare come il *Citrus medica* L. cv Diamante si vuole realizzare una linea di ricerca che monitorizzi i costituenti secondari, i cosiddetti principi attivi. E', infatti, ampiamente dimostrato la correlazione, da attribuirsi alla presenza di costituenti secondari assunti con la dieta, esistente tra nutrizione, prevenzione e cura di alcune patologie. E' in quest'ottica che si vuole inserire il presente lavoro di tesi volto alla valutazione chimica e biologica del Cedro (*Citrus medica* L. cv Diamante), prodotto di notevole interesse per l'economia della Calabria, di cui è specie endemica.

Sulla base di tali considerazioni, la seconda fase del presente lavoro di tesi si propone di valutare le proprietà biologiche (antiossidanti, ipoglicemizzanti *in vitro* e *in vivo* e anticolinesterasiche) degli estratti e degli oli essenziali di *C. medica* cv Diamante.

5.2. Attività antiossidante

5.2.1 Genesi dei radicali liberi

Al concetto di ossigeno si associa comunemente la vita; a volte, però, una sua presenza eccessiva può provocare danni gravi. Così necessario alla vita è, infatti, un elemento con una doppia faccia, poiché scandisce anche il tempo di sopravvivenza delle cellule, aggredendole non direttamente, ma attraverso i prodotti delle sue reazioni biochimiche, i radicali liberi (Conforti *et al.*, 2002). Si tratta di molecole di ossigeno o

porzioni di molecole con uno o più elettroni spaiati in un orbitale molecolare o atomico, prodotti normalmente e costantemente all'interno delle cellule dell'organismo, quando l'ossigeno è utilizzato nei processi metabolici, come la fosforilazione ossidativa a livello mitocondriale per produrre energia. Pertanto, oltre il 90% dell'ossigeno usato dalle cellule aerobiche è trasformato a livello dei citocromi mitocondriali da una ossidasi che aggiunge quattro elettroni ad ogni singola molecola di ossigeno per formare due molecole di acqua; la molecola di ossigeno preferisce, però, accettare i suoi elettroni uno alla volta, permettendo così la formazione di un radicale superossido, ovvero di una molecola con un elettrone non appaiato, che genera H_2O_2 , O_2 e OH (Marino, 1991).

I radicali superossidi sono pertanto generati non solo dalla catena di trasporto degli elettroni, ma anche attraverso altri processi, come le reazioni enzimatiche, catalizzate da enzimi che utilizzano direttamente l'ossigeno (es. xantina ossidasi) o mediante le reazioni di autoossidazione di catecolamine, come la dopamina, che viene dapprima convertita dalla monoammino-ossidasi (MAO) e dall'aldeide deidrogenasi ad acido 3,4-diidrossifenilacetico (DOPAC), con la produzione di perossido d'ossigeno; questo, in presenza di ioni ferrosi, va incontro alla conversione spontanea con la formazione del radicale libero idrossile (reazione di Fenton). Lo stesso radicale superossido può essere convertito a perossido di ossigeno (H_2O_2) o spontaneamente, in ambiente acquoso, o mediante una reazione catalizzata dalla superossido dismutasi (SOD).

Oltre alle normali reazioni biochimiche di ossidazione cellulare, contribuiscono alla formazione dei radicali liberi altri fattori come:

- ✓ l'ischemia dei tessuti e la conseguente riduzione dell'apporto di sangue;
- ✓ le diete troppo ricche in grassi animali, poichè grassi polinsaturi, principali produttori di radicali liberi quando portati ad elevate temperature (oli da cucina);
- ✓ alcune disfunzioni e stati patologici come le malattie cardiovascolari o stati infiammatori in genere;
- ✓ la presenza di un eccesso di ferro che, nella prima fase della trasformazione, fa liberare dal perossido di idrogeno il radicale ossidrile, capace di innescare reazioni chimiche ulteriormente dannose;
- ✓ l'azione dei gas inquinanti e delle sostanze tossiche in genere (monossido di carbonio e piombo prodotti dalla combustione dei motori; cadmio, piombo e

mercurio prodotti dall'attività industriale, idrocarburi derivati dalle lavorazioni chimiche, ecc.);

- ✓ il fumo di sigaretta, che è una vera e propria miniera di sostanze chimiche nocive, poiché in esso sono contenute sostanze irritanti, quali ossidanti e radicali liberi, capaci di invecchiare le mucose bronchiali e di determinare la progressione della bronchite cronica verso l'enfisema;
- ✓ l'eccesso di alcool: un suo abuso continuo induce il fegato alla produzione dei radicali liberi;
- ✓ le radiazioni ionizzanti e quelle solari. Le radiazioni solari inducono sulla pelle processi di foto-ossidazione, che degradano gli acidi grassi polinsaturi delle membrane cellulari con conseguente formazione di radicali liberi, precoce invecchiamento e comparsa di tumori (melanomi);
- ✓ i farmaci;
- ✓ l'attività fisica intensa determina un aumento notevole delle reazioni che utilizzano l'ossigeno (aumento della respirazione polmonare, dell'attività dei mitocondri delle cellule muscolari, ecc.) con un conseguente surplus di formazione di perossido di idrogeno.

Anche le reazioni biochimiche legate all'accumulo e rimozione dell'acido lattico dai muscoli affaticati, contribuiscono a innalzare la soglia dei radicali liberi.

Secondo alcuni studiosi, la lisi della membrana cellulare da parte dei radicali liberi è una delle cause del dolore muscolare. Lo stesso avviene per i globuli rossi, contribuendo a determinare o accentuare l'anemia negli atleti.

5.2.2. Danni cellulari da radicali liberi

La vita dei radicali liberi è molto breve e si svolge nelle immediate vicinanze della sede di produzione. Tuttavia, se non sono subito neutralizzati da un accettore fisiologico, i radicali attaccano i diversi costituenti endocellulari entro un raggio d'azione variabile secondo il tipo di radicale stesso.

I radicali liberi manifestano la loro attività tossica solo quando sono prodotti con una velocità o in una quantità tale da non poter essere inattivati dai sistemi di difesa della cellula. In questo caso sono in grado di reagire con tutti i costituenti della cellula e della matrice cellulare, determinando una condizione chiamata "stress ossidativo".

Tutte le classi di molecole biologiche sono potenziali “target” per l’attacco dei radicali liberi. Pertanto, i radicali liberi se presenti nella quantità corretta sono indispensabili alla vita, poiché aiutano le cellule del nostro sistema immunitario a combattere le infezioni e a difendersi dai batteri e controllano, inoltre, il tono della muscolatura liscia, che regola il funzionamento degli organi interni e dei vasi sanguigni.

Nel momento in cui se ne producono troppi o quando l’organismo non riesce più a controllarli, possono diventare veramente molto pericolosi, per la presenza dell’elettrone “spaiato”, che le rende specie chimiche molto instabili, quindi molecole estremamente reattive, alla continua ricerca di altre molecole da ossidare, per ristabilire il proprio equilibrio atomico e quindi una maggiore stabilità. In questo modo i radicali liberi innescano una reazione a catena, che finisce per alterare irreversibilmente la struttura chimica dei composti cellulari. Queste specie reattive hanno pertanto la tendenza a cedere il proprio elettrone spaiato a un non radicale o a ricevere un elettrone da un’altra molecola, in modo da formare una coppia di elettroni.

Qualunque reazione si verifichi, la specie non radicale si trasforma in un radicale libero, capace di estendere il danno, in una reazione a catena in grado di auto-mantenersi ed amplificarsi. La reazione termina in una fase in cui i radicali liberi sono consumati attraverso una ricombinazione in prodotti stabili, detto processo di arresto della reazione a catena (Pryor, 1976).

L’azione distruttiva dei radicali liberi è indirizzata soprattutto sulle cellule, attraverso tre reazioni particolarmente importanti:

- Perossidazione dei lipidi di membrana. I radicali liberi possono danneggiare le membrane plasmatiche e quelle degli organelli mediante perossidazione lipidica, attaccando i doppi legami degli acidi grassi polinsaturi e generando dei radicali perossilici. Questi a loro volta, sottraendo radicali idrogeno ad una molecola vicina, generano degli idroperossidi lipidici, molto instabili e reattivi, che instaurano una reazione a catena auto-catalitica, detta propagazione. La perossidazione oltre ad auto-mantenersi, è accelerata dalla presenza di ioni metallici quali ferro e rame. Attraverso questi eventi un radicale libero può formare centinaia di idroperossidi lipidici, che accumulandosi determinano gravi alterazioni funzionali a livello di membrane, di organelli e della cellula, perché essi stessi agiscono da catalizzatori nella formazione di ulteriori specie reattive dell’ossigeno. Attaccati sono

generalmente gli acidi grassi polinsaturi a lunga catena, che costituiscono i lipidi microsomiali, alterando la morfologia del reticolo endoplasmatico e determinando la perdita di attività della Glu-6 P-fosfatasi, degli enzimi della sintesi proteica e perdita della capacità epatica di sintetizzare e secernere LDL;

- Modificazioni ossidative delle proteine. Le proteine possono essere modificate dai radicali attraverso reazioni ossidative, a livello sia delle catene laterali sia della catena proteica, provocandone la frammentazione, mediante reazioni di alchilazione di gruppi sulfidrilici o attraverso la formazione di legami crociati tra proteine. Le stesse possono in questo modo perdere alcune delle loro proprietà o essere addirittura trasformate in complessi inerti.
- Lesioni del DNA. Particolarmente dannosa è l'azione dei radicali liberi a livello del DNA, provocando scissione delle catene polinucleotidiche del DNA nucleare e mitocondriale, per reazione con la timina. Probabilmente questo danno è coinvolto nel processo d'invecchiamento della cellula e nella trasformazione maligna della stessa, per l'eventuale formazione di ponti che possono provocare fenomeni di mutazione, carcinogenesi o morte cellulare. Sono, pertanto, alterate le informazioni genetiche con conseguenti errori nella replicazione degli acidi nucleici (Fig. 5.1).

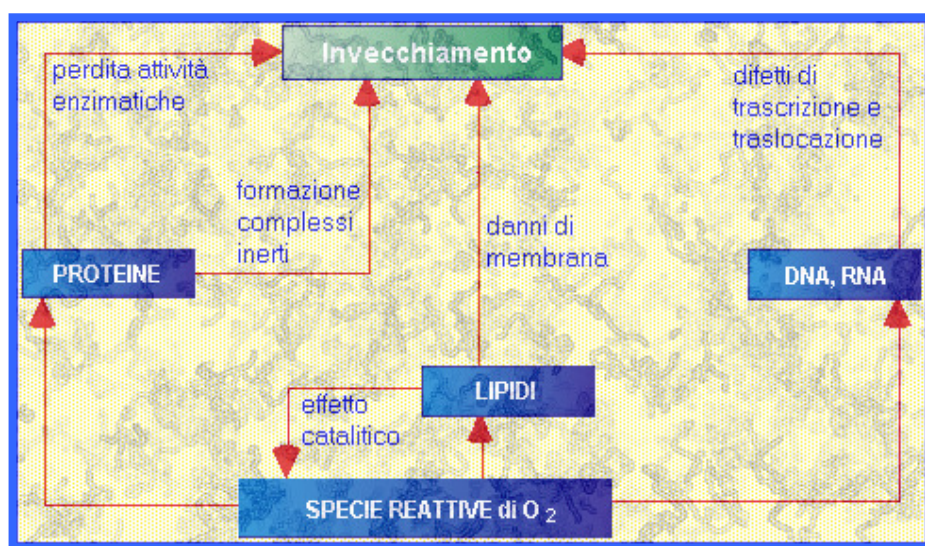


Figura 5.1. Danni cellulari provocati dai radicali liberi.

5.2.3. Ruolo dei radicali nella patologia umana

L'azione continua dei radicali liberi si evidenzia soprattutto nel precoce invecchiamento delle cellule e una loro eccessiva presenza può avere un ruolo determinante nella comparsa di numerose malattie gravi. Sono coinvolti nell'insorgenza di malattie cardiovascolari quali:

- ischemia miocardica, laddove grandi quantità di radicali liberi come $\text{OH}\cdot$, $\text{O}_2\cdot^-$ e $^1\text{O}_2$, si formano durante la riperfusione del miocardio ischemico (Boleslaw *et al.*, 1999);
- ipertrofia miocardica, nella cui transizione può essere coinvolto lo stress ossidativo (Pawan *et al.*, 1999);
- aterosclerosi, in cui cellule endoteliali, macrofagi monociti-derivati e cellule muscolari lisce, generano dei radicali, a loro volta responsabili della formazione di LDL ossidate. Varie sono le evidenze che ritengono le LDL ossidate responsabili dell'aterogenesi e, quindi, di particolari situazioni tipiche dell'aterosclerosi, come il contenuto di colesterolo nei macrofagi e la formazione delle cellule schiumose;
- patologie cardiache coronariche, nella cui patogenesi è coinvolta l'istamina, capace di intensificare la produzione di specie reattive dell'ossigeno dai leucociti, a loro volta coinvolte nello sviluppo delle patologie cardiache coronariche (Stremoukhov, 2001).

A livello celebrale i radicali liberi possono essere correlati a patologie come la sclerosi multipla, il Morbo di Parkinson o di Alzheimer, l'ischemia cerebrale o neuropatie.

A livello respiratorio altra importante azione di ossidoriduzione i radicali liberi la esercitano nella genesi dell'enfisema polmonare. Infatti, l'esposizione a sostanze ossidoriducanti, come quelle presenti nel fumo di sigaretta, determina un'ossidazione del sito 358-metionina della molecola dell'alfa-1-antitripsina che è inattivata, con conseguente squilibrio del sistema di difesa antielastasi polmonare. L'alfa-1-antitripsina è il principale rappresentante di un sistema di difesa antiproteasico.

I radicali liberi inducono degenerazione molecolare correlata all'invecchiamento, agendo sulle varie macromolecole di fondamentale importanza per la vita cellulare, come il DNA, sul quale hanno un'azione mutagena; le proteine, delle quali vengono modificate le funzioni; o ancora i lipidi di membrana, che per perossidazione lipidica, si alterano, perdendo la loro fluidità e alterando la comunicazione tra le cellule.

È stato dimostrato che l'assunzione durante tutta la vita di sostanze antiossidanti, come la vitamina E, rallenta il processo di invecchiamento.

5.2.4. Difese cellulari

L'emivita dei radicali liberi è molto breve e la loro concentrazione piccola, per la presenza di enzimi che ne prevengono la durata e la diffusione; quindi nel momento in cui la produzione di questi radicali eccede il metabolismo, la cellula mette in atto meccanismi di pulizia, in altre parole sistemi di difesa cellulare, rappresentati da molecole dotate di capacità antiossidante. È proprio lo squilibrio fra la produzione di radicali liberi e la capacità antiossidante della cellula a essere responsabile del danno cellulare, che può portare alla morte della cellula per stress ossidativo. La detossificazione dei composti reattivi dell'ossigeno è, quindi, uno dei prerequisiti della vita in condizioni aerobiche, costituendo un importante sistema di difesa antiossidante di prevenzione, intercettazione e riparazione, che comprende agenti non enzimatici, noti come antiossidanti (tocoferoli, antiproteasi, β -carotene, acido ascorbico, ubiquinolo, bilirubina, acido urico, etc.) ed enzimatici (superossido-dismutasi, glutazione perossidasi e catalasi) (Fig. 5.2).

inibitori dei radicali liberi	
Superossidodismutasi	trasforma il radicale superossido in acqua ossigenata
Perossidasi, Glutazione, Catalasi	convertono acqua ossigenata in acqua e ossigeno
Vitamina E, Beta carotene	reagiscono con i radicali liberi e proteggono le membrane
Vitamina C, Acido urico	reagiscono con i radicali liberi del citoplasma
riparatori delle proteine	
Proteinasi	rompe in frammenti le catene proteiche ossidate
Proteasi	rompe i frammenti generati dalla proteinasi
Peptidasi	degrada ad amminoacidi i prodotti della proteasi
Fosfolipasi	elimina parti ossidate dei lipidi delle membrane
riparatori dei lipidi	
Acetiltrasferasi	sostituisce acidi grassi asportati dai lipidi
Perossidasi, Glutazione, Trasferasi	aiutano la riparazione di acidi grassi della membrana
riparatori del DNA	
Esonucleasi, Endonucleasi	eliminano segmenti di DNA danneggiato
Glicosilasi, Polimerasi	riempiono i vuoti lasciati da esonucleasi ed endonucleasi
Ligasi	blocca le parti riparate da glicosilasi e polimerasi

Figura 5.2. Sistemi di protezione cellulare, rappresentati da enzimi, vitamine, molecole, che con le loro attività, esercitano protezione diretta o indiretta delle cellule.

Gli agenti antiossidanti sono capaci di ripristinare l'equilibrio chimico nei radicali liberi grazie alla possibilità di fornire loro gli elettroni di cui sono privi. L'organismo

umano si difende naturalmente dai radicali liberi, contrastandone l'effetto e rallentando i processi di alterazione e invecchiamento della cellula, attraverso reazioni enzimatiche, in cui gli "scavengers" naturali sono rappresentati dai seguenti enzimi citoplasmatici o mitocondriali:

- la superossido dismutasi che catalizza la conversione del superossido in acqua ossigenata e ossigeno molecolare;
- la catalasi, che catalizza la degradazione di due molecole di perossido di ossigeno;
- la glutazione perossidasi, capace di rimuovere sia l'acqua ossigenata sia vari idroperossidi, utilizzando il glutazione ridotto (GSH).

Un ruolo importante nel mantenimento delle difese enzimatiche contro i radicali liberi è svolto da alcuni minerali introdotti con la dieta, quali:

- selenio, che protegge le cellule, prevenendo la perossidazione lipidica delle membrane cellulari, particolarmente se associato alla vitamina E, essendo l'elemento principe degli enzimi di glutazione, che trasformano i perossidi in acqua;
- rame, che interviene nell'azione dell'enzima superossido dismutasi, che trasforma i radicali liberi in perossido di idrogeno;
- manganese;
- zinco, che insieme al rame potenzia l'azione dell'enzima superossido dismutasi.

Se l'apporto di questi minerali è insufficiente, la difesa enzimatica ne può risentire.

Oltre a queste reazioni enzimatiche, che proteggono la cellula, entro certi limiti, dall'azione dannosa dei radicali liberi, mantenendo basse le concentrazioni del perossido di idrogeno e del radicale superossido, un secondo sistema di difesa è rappresentato da componenti a basso peso molecolare, che agiscono come antiossidanti, cioè reagiscono con le sostanze ossidanti, cedendo loro l'elettrone mancante e riducendo la loro capacità di produrre effetti dannosi. Esplicando la loro funzione, si trasformano a loro volta in radicali molto meno attivi e dannosi, neutralizzati poi dai sistemi enzimatici della cellula.

Questi agenti antiossidanti possono agire singolarmente o interagire, proteggendosi a vicenda nel momento in cui sono ossidati. Alcuni di questi composti, come glutazione, ubiquinone e acido urico, sono prodotti regolarmente dal metabolismo, altri come la vitamina E, la vitamina C o β -caroteni, sono assunti con la dieta.

Il glutatione è, pertanto, coinvolto nella formazione, con il selenio, della glutatione perossidasi, un enzima con azione antiossidante all'interno delle membrane cellulari. Impedisce ai radicali liberi di legarsi alle proteine fibrose, salvaguardando così l'elasticità del collagene con benefici per la pelle e per le arterie; al gruppo degli ubiquinoni appartiene il coenzima Q10, sintetizzato dal nostro organismo, ma la cui produzione diminuisce andando avanti con gli anni. Ha un'azione simile alla vitamina E e tra le sue funzioni biologiche si evidenzia quella antiossidante in quanto, nei mitocondri cellulari, partecipa alla produzione di energia trasportando l'idrogeno nelle catene di ossidoriduzione.

5.2.5. DPPH test

Il DPPH test è una tecnica che permette di valutare la presenza di prodotti antiossidanti in un estratto (Conforti *et al.*, 2007).

Tale saggio si basa sulla capacità del composto radicalico, il 2,2-difenil-1-picrilidrazile (DPPH) (Fig. 5.4), di decolorarsi in presenza di sostanze antiossidanti.

Tale composto è solitamente di colore rosso porpora intenso, ma in presenza di tali sostanze, a seconda delle loro capacità, subisce una più o meno intensa decolorazione.

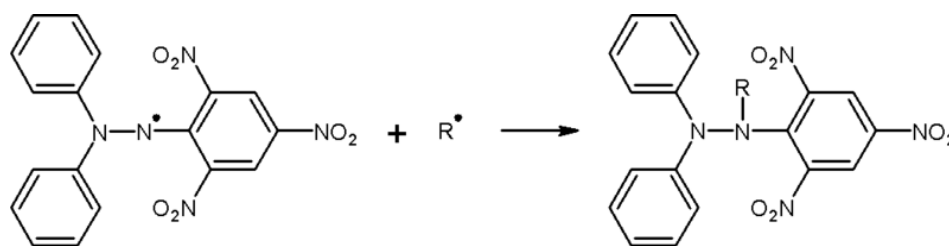


Figura 5.3. Reazione radicalica del DPPH.

Nel presente studio è stata valutata l'attività "radical scavenging" degli estratti e degli oli essenziali di Cedro a differenti concentrazioni, ottenute diluendo i campioni in metanolo (Tab. 5.1). Come controllo positivo è utilizzato l'acido ascorbico.

Tabella 5.1. Concentrazioni ottenute nel saggio.

Conc. (mg/ml)	Vol. (ml)	Vol. DPPH (ml)	Vol. tot. (ml)	Conc. fin. (mg/ml)
5	0.2	0.8	1	1
2.5	0.2	0.8	1	0.5
1.25	0.2	0.8	1	0.25
0.62	0.2	0.8	1	0.125
0.31	0.2	0.8	1	0.062
0.15	0.2	0.8	1	0.031

Per la realizzazione del saggio sono impiegate tre provette per ogni concentrazione testata. A ognuna sono aggiunti 0.8 ml di soluzione metanolica di DPPH 1×10^{-4} M e 0.2 ml di soluzione contenente l'estratto da saggiare.

Le provette sono riposte al buio per un periodo di tempo pari a trenta minuti.

Successivamente, è valutata l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 517 nm, tramite uno spettrofotometro, utilizzando un bianco di solo metanolo. Sono calcolate, per ogni concentrazione, la media e la deviazione standard dei valori ottenuti.

L'attività "radical scavenging" degli estratti è calcolata come percentuale di inibizione nei confronti del radicale DPPH, secondo la seguente equazione:

% inibizione = $[1 - (\text{assorbanza DPPH con estratto} - \text{assorbanza solo estratto}) / \text{assorbanza DPPH senza estratto}] \times 100$.

5.2.6. β -Carotene bleaching test

Il β -Carotene bleaching test (Amin *et al.*, 2004) si basa sull'ossidazione accoppiata del β -carotene e dell'acido linoleico.

L'attività antiossidante è valutata in base alla decolorazione ("bleaching") del β -carotene, dovuta all'ossidazione causata dai prodotti di degradazione dell'acido linoleico. La presenza di una sostanza antiossidante all'interno della miscela di reazione (β -carotene + acido linoleico) inibisce l'ossidazione dell'acido linoleico e mantiene costante nel tempo i valori di assorbanza.

Per la realizzazione del test 2 ml di soluzione di β -carotene (0.5 mg/ml in cloroformio) sono aggiunti a 0.04 ml di acido linoleico e 0.4 ml di 100% Tween 20. La miscela è poi evaporata a 40 °C per 10 min attraverso un evaporatore rotante per eliminare il cloroformio. Dopo evaporazione la miscela è immediatamente diluita con 200 ml di acqua distillata. L'acqua è aggiunta lentamente alla miscela e agitata vigorosamente per formare un'emulsione. 5 ml dell'emulsione di β -carotene sono

trasferiti in differenti provette contenenti 0.2 ml di estratto a diverse concentrazioni (0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 0.0062 e 0.0031). Le provette sono, poi, agitate lentamente e poste a 45 °C in un bagno di acqua per 60 min. Come controllo è usata una miscela di 0.2 ml di metanolo in 5 ml della su citata emulsione. Come controllo positivo è usato il propil gallato.

L'assorbanza è misurata a 470 nm usando un Perkin Elmer Lambda 40 UV/VIS spettrofotometro contro un bianco che consiste in un'emulsione senza β -carotene. La misura è condotta a un tempo iniziale ($t = 0$) e successivamente a 30 e 60 min.

Sono calcolate, per ogni concentrazione, la media e la deviazione standard dei valori ottenuti. L'attività antiossidante (AA) è misurata in termini di successo di decolorazione del β -carotene usando la seguente equazione:

$$AA = [1 - (A_0 - A_t) / (A_0^\circ - A_t^\circ)] \times 100$$

dove:

A_0 e A_0° sono i valori di assorbanza misurati al tempo iniziale di incubazione, rispettivamente per campioni/standard e controllo;

A_t e A_t° sono i valori di assorbanza misurati nei campioni/standard e controllo a $t = 30$ min e $t = 60$ min (Conforti *et al.*, 2007).

5.3. Attività antinfiammatoria

Lo stress ossidativo, causato dall'azione dei radicali liberi, può iniziare e promuovere la progressione di una serie di patologie a carattere cronico, come il morbo di Alzheimer (Halliwell, 1989).

Recentemente numerose molecole ad attività antiinfiammatoria e neuroprotettiva hanno mostrato di possedere anche attività antiossidante e/o "radical scavenging" come parte integrante del loro meccanismo d'azione (Small *et al.* 1997; Melzer, 1998; Schulz, 2003).

Il danno infiammatorio è attribuibile, in parte, al rilascio di specie reattive dell'ossigeno (ROS) da parte di macrofagi e neutrofili attivati. L'over-produzione di tali specie reattive è alla base del danno tissutale e del processo di lipoperossidazione delle membrane (Winrow *et al.*, 1993; Gutteridge, 1995). Inoltre, i ROS propagano l'infiammazione attraverso la stimolazione del rilascio di mediatori come il nitrossido (NO), l'interleukina-1, il Tumor Necrosis Factor- α e l'interferon- γ , che stimolano un

ulteriore reclutamento di neutrofili e macrofagi. L'ossido nitrico (NO) è prodotto nei tessuti e nelle cellule a partire dalla L-arginina per mezzo dell'enzima ossido nitrico sintasi di tipo costitutivo ed inducibile (cNOS e iNOS). L'ossido nitrico, l'anione superossido (O_2^-) e il loro prodotto di reazione, l'anione perossinitrito (ONOO⁻), generati in eccesso durante la risposta a infezioni virali o batteriche, possono contribuire alla patogenesi dello stress ossidativo e del danno tissutale (Maeda et al., 1998; Akaike et al., 2000). Sulla base di tali considerazioni appare evidente come la neutralizzazione di questi mediatori possa attenuare la progressione del processo infiammatorio.

5.3.1. Test di inibizione della produzione di nitrossido

L'attività antinfiammatoria *in vitro* degli estratti e degli oli essenziali di Cedro è stata testata sulla linea cellulare RAW 264.7.

Le cellule sono state poste in coltura in DMEM ("Dulbecco's Modified Eagle's Medium") in presenza di L-glutamina, 10% di siero bovino fetale (FBS) e 1% soluzione di penicillina/streptomicina al 5% di CO₂ alla temperatura di 37° C.

A confluenza, le cellule sono state slittate per raschiatura e sospese in mezzo fresco per la conta. Una concentrazione di 1×10^6 cell/ml è stata piastrata in una "96 well microplate". Alle colture cellulari sono state aggiunte diluizioni seriali degli estratti e degli oli essenziali di Cedro, utilizzando una soluzione di mezzo e DMSO allo 0.1%.

Le cellule sono state, quindi, incubate per 24 ore in presenza di 1 µg/ml di lipopolisaccaridi (LPS).

L'attività antinfiammatoria è stata stimata attraverso la valutazione dell'inibizione della produzione di nitrossido da parte di cellule RAW 264.7 stimulate da LPS. La presenza di nitrito, un prodotto ossidato stabile del nitrossido, è stata determinata nel mezzo di coltura cellulare utilizzando il reagente di Griess (1% sulfamide e 0.1% N-(1-naftil)diidrocloreuro di etilendiammina in 2.5% H₃PO₄). 100 µl del surnatante delle colture sono stati rimossi e mescolati con 100 µl di reagente di Griess all'interno di piastre da 96 pozzetti.

I valori di assorbanza sono stati determinati tramite analisi spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 550 nm, utilizzando il lettore di micropiastre GDV DV 990B/V (Roma, Italia). La concentrazione di nitrito nel supernatante è stata determinata mediante confronto con una curva standard di sodio nitrito.

L'assenza di effetto citotossico è stata valutata tramite l'SRB (sulforodamina) assay (Rubinstein *et al.*, 1990). La sulforodamina (Fig. 5.4), colorante aminoxantenico rosa brillante, è una proteina anionica contenente due gruppi sulfonici, che legano elettrostaticamente residui basici amminoacidici di proteine cellulari sotto blande condizioni acide.

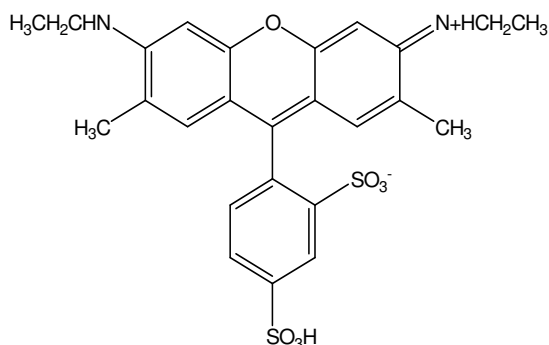


Figura 5.4. Struttura chimica della sulforodamina B.

I residui legati possono essere quantitativamente estratti dalle cellule e solubilizzati attraverso basi deboli, come il tris(idrossimetil)-aminometano, per l'analisi spettrofotometrica. Il saggio, perciò, può essere usato per stimare indirettamente il numero di cellule mediante la colorazione delle proteine cellulari con il colorante SRB, fornendo un indice sensibile del contenuto totale di proteine cellulari, che è lineare alla densità cellulare.

5.4. Test di inibizione di acetil- e butirril-colinesterasi (Ellman's test)

L'utilizzo di farmaci inibitori delle colinesterasi trova oggi largo impiego nella terapia di diverse patologie neurodegenerative, e particolarmente nella terapia del Morbo di Alzheimer, essendo esse caratterizzate da un deficit colinergico. L'incremento della trasmissione colinergica ha come effetto ultimo il miglioramento delle sinapsi colinergiche a livello centrale, la protezione dalla degenerazione neuronale, la modificazione della proteina precursore dell'amiloide e l'aumento a livello regionale della sintesi di molecole neurotrofiche.

Per i farmaci anticolinesterasici oggi usati in terapia, come rivastigmina e galantamina, l'uso è stato limitato a causa dei loro effetti collaterali come disturbi

gastrointestinali e problemi di biodisponibilità (Schulz, 2003; Small *et al.*, 1997; Melzer, 1998).

Numerosi composti di origine naturale si sono dimostrati in grado di inibire le colinesterasi (Loizzo *et al.*, 2008), e se ne ricercano sempre di nuovi per garantire una minore tossicità e permettere una migliore biodisponibilità, aumentando le quote di farmaco nelle aree cerebrali d'interesse.

L'attività inibitoria degli enzimi acetilcolinesterasi (AChE) e butirrilcolinesterasi (BChE) è stata valutata attraverso una modificazione del metodo di Ellman, adattato all'utilizzo di piastre a 96 pozzetti (Loizzo *et al.*, 2007).

Il saggio è basato sulla reazione dei prodotti di rilascio di acetiltiocolina (ATCI) e butirritiocolina (BTCI), con la formazione dell'anione 5-tio-2-nitrobenzoico di colore giallo in presenza di un agente cromogenico. Nello specifico, 25 µl di AChE o BChE (0.20 U/ml in buffer a pH 8) e 25 µl di estratto e olio essenziale sono stati addizionati a 50 µl di buffer a pH 8. I campioni testati in triplicato. La fisostigmina (0.1 mM) è utilizzata quale controllo positivo. La piastra viene, quindi, posta in un bagno di ghiaccio e acqua alla temperatura di 4 °C per 30 minuti.

La reazione ha inizio con l'aggiunta di una soluzione di ditionitrobenzene (DTNB) (125 µl alla concentrazione di 0.05 mM in buffer a pH 7) e ATCI o BTCI (25 µl 0.018 mM in buffer a pH 7), in seguito alla quale la piastra viene incubata in un bagnetto caldo a 37 °C per 20 minuti.

La reazione è stoppata ponendo la piastra nel bagno di ghiaccio e aggiungendo fisostigmina (20 µl 0.018 mM in buffer a pH 7) in tutti i pozzetti. Il bianco prevede tutti i reagenti eccetto l'enzima e l'estratto. La formazione dell'anione di colore giallo è registrata alla lunghezza d'onda di 405 nm (GDW DW 990 B/W, Roma, Italia).

La percentuale di inibizione è calcolata con la seguente equazione:

$$\frac{[(\text{Bianco} - \text{Bianco-controllo positivo}) - (\text{Estratto testato} - \text{Controllo dell'estratto})]}{(\text{Bianco} - \text{Bianco positive control})} \times 100$$

Il valore di IC₅₀ è calcolato tramite il programma GraphPad Prism 4 per Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

La curva dose-risposta è stata ottenuta plottando la percentuale di inibizione verso la concentrazione (Loizzo *et al.*, 2007).

5.5. Attività ipoglicemizzante *in vitro* e *in vivo*

5.5.1. Test di inibizione dell' α -amilasi

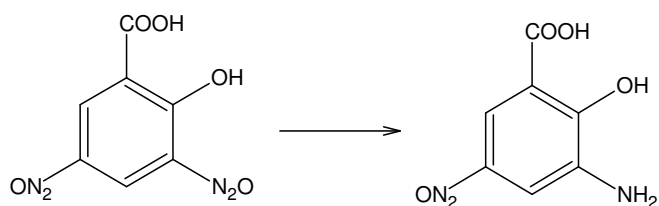
Il test enzimatico adottato è basato sulla metodologia messa a punto da Bernfeld (1955) opportunamente modificata (Conforti *et al.*, 2005). I reagenti (Sigma, UK) utilizzati per la realizzazione del test sono:

- PBS (Sodium phosphate buffer), alla quantità di 20 mM con 6.7 mM di NaCl, pH 6.9 alla temperatura di 25 °C. L'uso di questo tampone garantisce il controllo del pH della reazione, fondamentale per la cinetica enzimatica;
- Amido (Starch potato soluble), alla quantità di 0.5% w/v in soluzione tampone;
- Colorante (CRS), ottenuto dall'insieme del tartrato di sodio e potassio con 96 mM di acido 3,5-dinitrosalicilico;
- Maltosio (0.2% w/v);
- α -Amilasi da pancreas porcino (EC 3.2.1.1) (1U/ml buffer)
- Estratti e oli essenziali di Cedro: testati a partire da una concentrazione di 1 mg/ml.

Il test eseguito si basa sul seguente principio:



La produzione del maltosio è quantificata attraverso la riduzione dell'acido 3,5-dinitrosalicilico ad acido 3-amino-5-nitrosalicilico in condizioni alcaline da parte del maltosio (agente riducente).



acido 3,5-dinitrosalicilico

acido 3-amino-5-nitrosalicilico

Tale reazione è valutabile spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di 540 nm (corrispondente a un cambiamento di colorazione dall'arancio-giallo al rosso).

In presenza di un inibitore dell'enzima α -amilasi, in relazione al maltosio prodotto, è osservabile una riduzione dei valori di assorbanza.

Preliminarmente all'esperienza è necessario il plottaggio di una curva di calibrazione relativa alla generazione del maltosio. La reazione di produzione del maltosio è seguita in un range temporale compreso tra 0 e 3 minuti.

La procedura prevede l'allestimento di:

- “Test tube”: Amido + Estratto (o olio essenziale) + Enzima (inizio della reazione);
- “Blank tube”: Amido + Estratto (o olio essenziale).

Un'aliquota è prelevata dal test tube al tempo 0, 1, 2, 3 minuti e inserita in altri tubi contenenti il reagente colorante: insieme vengono incubati a 85 °C per 15 minuti. Il processo è, quindi, arrestato con acqua ed è valutata spettrofotometricamente la reazione maltosio-CRS.

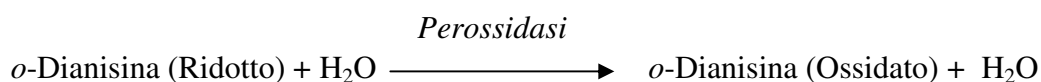
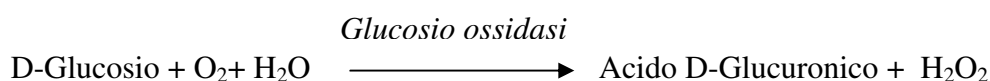
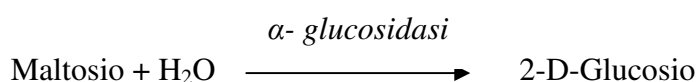
Il calcolo della percentuale di inibizione dell'enzima è effettuato secondo la seguente equazione, basandosi sui risultati ottenuti al tempo di 3 minuti:

$$\text{Percentuale di reazione} = \frac{[\text{Maltosio}]_{\text{test}}}{[\text{Maltosio}]_{\text{controllo}}} \times 100$$

$$\text{Inibizione (\%)} = 100 - \text{percentuale di reazione} \pm \text{SD (deviazione standard)}$$

5.5.2. Test di inibizione dell'enzima α -glucosidasi

L'attività dell'enzima α -glucosidasi da *Saccharomyces cerevisiae* (EC 3.2.1.20) è misurata indirettamente attraverso la reazione ossido-riduttiva, che coinvolge il colorante *o*-dianisina. Il metodo si basa su quello riportato dalla Sigma.



Il saggio è realizzato a pH 4.0 e alla temperatura di 37 °C.

I reagenti impiegati sono: tampone (Sodium Acetate Buffer 50 mM); maltosio 4.0% (w/v); *o*-dianisidina (Dian) (1 capsula in 25 ml di acqua); perossidasi e glucosio ossidasi (PGO solution) (1 capsula in 100 ml di acqua); acido perclorico (PCA) 4.2% (w/v); α -glucosidasi (2.0 unità/ml).

La procedura del test prevede:

1. si pongono 5 ml di maltosio e 100 μ l di estratto (o olio essenziale) di Cedro a differenti concentrazioni in apposite provette;
2. si lasciano tali provette in incubazione a 37 °C per 5 min;
3. si aggiungono 100 μ l di α -glucosidasi e si lasciano le provette ad incubare a 37 °C per 30 min;
4. si aggiunge 1 ml di PCA, si centrifuga, si preleva il surnatante e si trasferisce in nuove provette, alle quali si aggiungono 100 μ l di Dian e 6 ml di PGO solution;
5. si lasciano le provette a 37 °C per 30 min e al termine del periodo di incubazione si trasferisce 1 ml in apposite cuvette per la lettura spettrofotometrica a $\lambda = 500$ nm.

La percentuale di inibizione dell'enzima è calcolata secondo la seguente formula:

$$\text{Percentuale di reazione} = \frac{[\text{D-Glucosio}]_{\text{test}}}{[\text{D-Glucosio}]_{\text{controllo}}} \times 100$$

Inibizione (%)= 100 - percentuale di reazione \pm SD (deviazione standard)

5.5.3. Test di stimolazione della secrezione di insulina sulla linea cellulare β pancreatica murina MIN6

Il test di stimolazione della secrezione di insulina sulla linea cellulare β pancreatica murina MIN6 è stato effettuato presso il Reproductive Health Endocrinology & Development Division, School of Biomedical and Health Sciences, King's College London, sotto la supervisione del Prof. Peter Jones.

Il test ha avuto lo scopo di valutare gli effetti dell'estratto idroalcolico dell'epicarpo dei frutti maturi di Cedro, dimostratosi il più attivo nei test di inibizione degli enzimi pancreatici, sulla stimolazione della secrezione di insulina.

Coltura cellulare: la linea cellulare β pancreatica murina MIN6 (P36) è stata fornita dal Prof. J.I. Miyazaki dell'Università di Tokio, Giappone. Le cellule sono state poste in coltura in DMEM medium, addizionato di 10% foetal bovine serum, 1% L-glutamina, 1% penicillina/streptomina. La suddetta linea cellulare è stata mantenuta a 37 °C , al 5% di CO₂ con il 95% di umidità.

Secrezione insulinica in cellule MIN6: le cellule MIN6 sono state piastrate alla densità di 30.000 cellule/well in "96-well plates" e lasciate aderire per 1-2 giorni prima dell'utilizzo negli esperimenti di stimolazione della secrezione.

Le cellule sono state preincubate in una soluzione fisiologica salina (Gey *et al.*, 1936) addizionata di 2 mM di glucosio per due ore e, quindi, incubate per 30 minuti in assenza e presenza di concentrazioni differenti dell'estratto idroalcolico dell'epicarpo dei frutti maturi di Cedro. La valutazione dell'effetto biologico dell'estratto di Cedro è stata valutata anche mediante perfusione di aggregati tridimensionali di MIN6, di seguito indicati come "pseudoisole" (Hauge-Evans *et al.*, 2002).

La secrezione insulinica è stata misurata attraverso "Radioimmunoassay" (RIA) (Jones *et al.*, 1988).

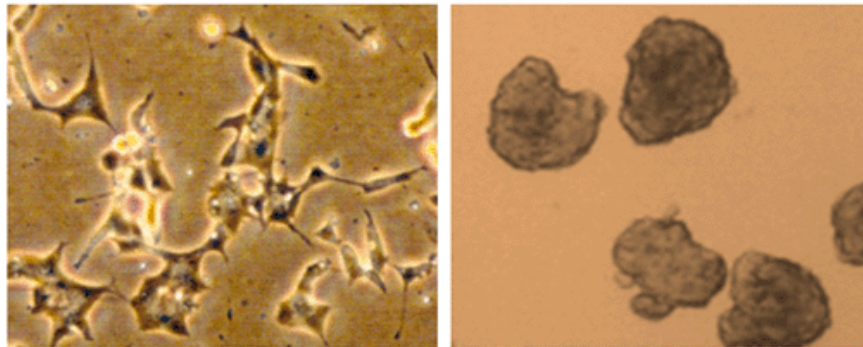


Figura 5.5. Cellule MIN6 mantenute *in vitro* come “monolayers” (immagine di sinistra) o aggregate tridimensionali “pseudocolonie” (immagine di destra).

5.5.4. Studio *in vivo* dell’estratto idroalcolico dell’epicarpo di Cedro

L’estratto idroalcolico dell’epicarpo dei frutti maturi di Cedro è stato testato anche *in vivo* con lo scopo di evidenziare gli effetti dell’estratto di Cedro sui parametri metabolici.

Per il test sono stati utilizzati tre gruppi ($n = 6$) di topi CD-1 (Harlan) di età tra le 12 e le 16 settimane e peso compreso tra 20 e 25 g.

Due gruppi sono stati trattati con dosi diverse (300-600 mg/kg) dell’estratto idroalcolico del pericarpo dei frutti maturi di Cedro, mentre il gruppo di controllo è stato trattato con una pari quantità di acqua distillata. I topi sono stati stabulati a temperatura e umidità costanti e un rapporto luce/buio di 12 ore. Alimento e acqua sono stati forniti *ad libitum*. La dose quotidiana di fitocomplesso è stata somministrata *per os* sempre alla stessa ora e dallo stesso operatore.

Dopo 30 giorni dall’inizio della somministrazione gli animali sono stati sacrificati ed il sangue è stato prelevato per le determinazioni ematologiche e biochimiche. In particolare, sono stati determinati i livelli di LDH, GOT, GPT, CK, UREA, ALP, GGT, TRI, COL, GLU, CREA, PT e un test emocromocitometrico completo (WBC, RBC, HB, HCT, MCV, MCH, MCHC, RDW, HDW, PLT, MPV).

L’analisi statistica (ANOVA) è stata effettuata mediante il software SPSS software.

5.6. Risultati e discussione

5.6.1. Attività antiossidante

Gli estratti e gli oli essenziali di Cedro sono stati testati per valutare l'attività antiossidante con due diversi metodi: il primo metodo, che utilizza il radicale DPPH, valuta l'attività "radical scavenger" degli estratti esaminati; il secondo metodo, il β -carotene bleaching test, valuta, invece, la capacità degli estratti a proteggere l'acido linoleico dalla perossidazione lipidica, che porta alla formazione di prodotti di degradazione come i dieni coniugati dell'acido. Questi ultimi composti provocano una decolorazione del β -carotene.

Tutti gli estratti sono stati testati a diversa concentrazione al fine di poter calcolare il valore di IC_{50} , ossia la concentrazione che provoca il 50% di inibizione dell'ossidazione.

Tabella 5.2. Attività "radical scavenger" (DPPH test) degli estratti di Cedro.

Estratti	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)^a
<i>Cedri immaturi</i>	
Mesocarpo	382 \pm 2.45
Endocarpo	> 1000
<i>Cedri maturi</i>	
Epicarpo	726 \pm 3.68
Mesocarpo	> 1000
Endocarpo	> 1000
Semi	> 1000
Fiori	425 \pm 2.95
Foglie	502 \pm 3.01
<i>Controllo positivo</i>	
Acido ascorbico	2 \pm 0.03

^aMedia \pm SD ($n = 3$).

Tra i campioni esaminati (Tab. 5.2, Fig. 5.6) il mesocarpo dei Cedri immaturi presenta la migliore attività "radical scavenging", con un valore di IC_{50} di 382 $\mu\text{g/ml}$. E' interessante notare come il passaggio dalla fase immatura a quella matura comporti la perdita dell'attività biologica per questa componente del frutto.

Ottimo risultato è stato ottenuto anche con l'estratto dei fiori (IC₅₀ di 425 µg/ml), che si caratterizza per un contenuto in polifenoli totali di 398.0 mg/100 g di materiale fresco e un contenuto totale in flavonoidi di 266.9 mg/100 g di materiale fresco.

I flavonoidi più abbondanti, tra quelli scelti come markers fitochimici, sono risultati l'apigenina, la diosmina, la quercetina e la rutina.

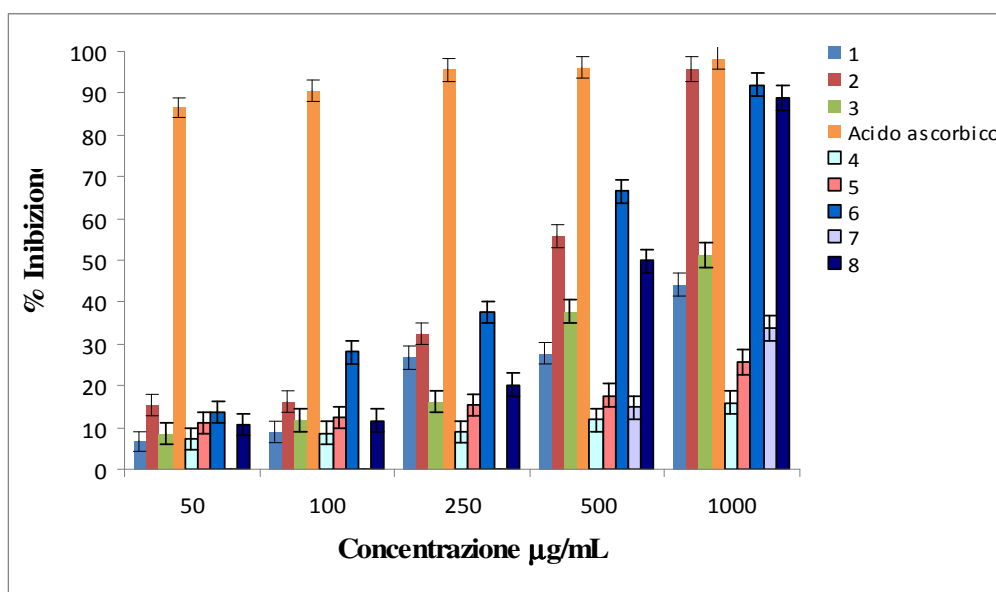


Figura 5.6. Attività “radical scavenging” degli estratti di *C. medica* L. cv Diamante sul radicale DPPH. Controllo positivo: acido ascorbico. 1: estratto dei semi; 2: estratto dei fiori; 3: estratto dell'epicarpo dei frutti maturi; 4: estratto del mesocarpo dei frutti maturi; 5: estratto dell'endocarpo dei frutti maturi; 6: estratto del mesocarpo dei frutti immaturi; 7: estratto dell'endocarpo dei frutti immaturi; 8: estratto idroalcolico delle foglie.

Migliori risultati sono stati ottenuti nel β -carotene bleaching test. Il metodo, oltre a misurare la capacità antiossidante, dà anche una indicazione della persistenza di tale capacità nel tempo e della resistenza ad alte temperature. L'inibizione della decomposizione di idrossiperossidi del lipide a prodotti volatili e non desiderati permette di determinare antiossidanti secondari in meccanismi relativi.

In assenza di antiossidanti, i prodotti di ossidazione (idrossiperossidi del lipide, dieni coniugati, e sottoprodotti volatili) dell'acido linoleico simultaneamente attaccano il β -carotene, provocando la decolorazione del suo caratteristico colore giallo.

L'estratto che ha mostrato una maggiore attività è stato quello proveniente dai fiori di Cedro maturo con valori di IC₅₀ di 2.83 e 5.74 µg/ml, rispettivamente, dopo 30 e 60 minuti di incubazione, seguito dall'estratto dell'endocarpo dei Cedri maturi con valori di IC₅₀ di 3.53 e 7.11 µg/ml, rispettivamente, dopo 30 e 60 minuti di incubazione.

Gli estratti provenienti dai Cedri immaturi si sono dimostrati entrambi attivi con valori di IC₅₀ molto simili (mesocarpo: 3.67 e 4.14 µg/ml, endocarpo: 4.10 e 4.51 µg/ml) (Tab. 5.3, 5.4 e 5.5, Fig. 5.7 e 5.8).

Tabella 5.3. Inibizione della perossidazione lipidica (β-carotene bleaching test) degli estratti di Cedro.

Estratti	IC ₅₀ (µg/ml) ^a	
	30 minuti di incubazione	60 minuti di incubazione
<i>Cedri immaturi</i>		
Mesocarpo	3.67 ± 0.007	4.14 ± 0.009
Endocarpo	4.10 ± 0.009	4.51 ± 0.009
<i>Cedri maturi</i>		
Epicarpo	10.64 ± 0.025	15.44 ± 0.035
Mesocarpo	36.62 ± 0.075	45.44 ± 0.175
Endocarpo	3.53 ± 0.008	7.11 ± 0.015
Semi	> 100	> 100
Fiori	2.83 ± 0.002	5.74 ± 0.010
Foglie	> 100	5.11 ± 0.009
^b Propil gallate	1 ± 0.001	1 ± 0.001

^aMedia ± SD (n= 3). ^bPropil gallato: controllo positivo.

Gli oli essenziali ottenuti sia dall'epicarpo dei frutti maturi di Cedro sia dalle foglie, testati alla massima concentrazione, non hanno presentato attività antiossidante.

Tabella 5.4. Inibizione della perossidazione lipidica (β -carotene bleaching test) dopo 30 minuti di incubazione.

Estratti	% di inibizione ^a						
	0.1 (mg/ml)	0.05 (mg/ml)	0.025 (mg/ml)	0.01 (mg/ml)	0.005 (mg/ml)	0.0025 mg/ml)	0.00125 mg/ml)
<i>Cedri immaturi</i>							
Mesocarpo	98.70±1.9	95.34±2.0	90.93±1.9	89.1±1.9	71.50±1.6	31.62± 0.6	19.04±0.5
Endocarpo	97.15±2.0	92.23±1.9	89.38±1.8	77.98±1.75	68.39±1.6	18.60± 0.1	9.62± 0.1
<i>Cedri maturi</i>							
Epicarpo	94.89±1.9	88.32±1.9	81.5±1.9	47.45±1.3	24.33±1.0	-	-
Mesocarpo	65.45±1.5	61.56±1.6	43.55±1.4	25.06±1.0	-	-	-
Endocarpo	79.56±1.8	73.97±1.8	73.72±1.7	50.36±1.23	46.56±1.4	38.54±0.68	3.65± 0.6
Semi	-	-	-	-	-	-	-
Fiori	92.44±1.9	91.95±2.0	86.59±1.9	77.32±1.8	66.83±1.8	44.71± 1.4	17.45±1.4
Foglie	48.42±1.3	45.26±1.3	31.58±1.2	34.39±1.3	25.56±0.9	-	-

^aMedia \pm SD (n= 3).

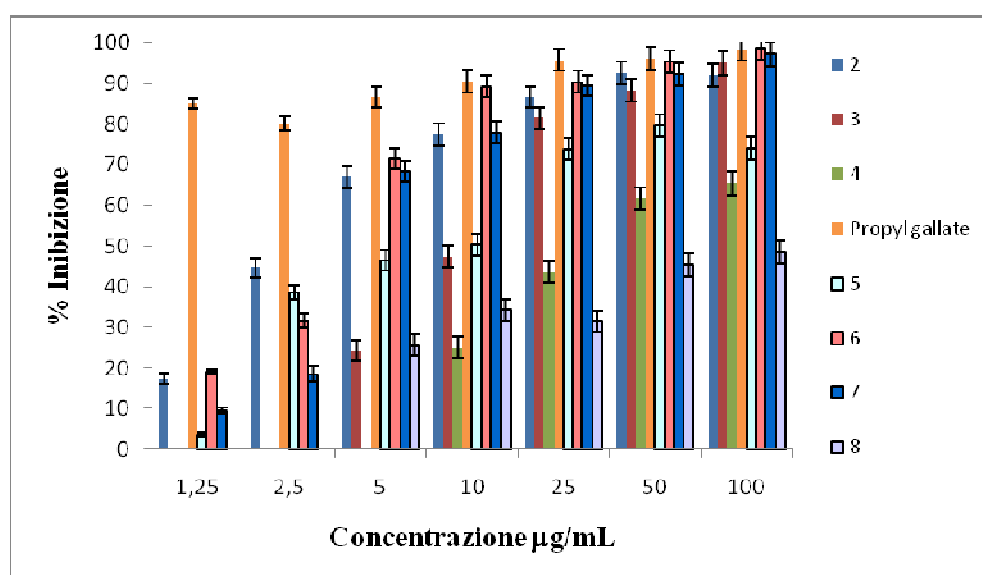


Figura 5.7. Inibizione della perossidazione lipidica degli estratti di Cedro dopo 30 minuti di incubazione. Controllo positivo: propil gallato. 1: estratto dei semi; 2: estratto dei fiori; 3: estratto dell'epicarpo dei frutti maturi; 4: estratto del mesocarpo dei frutti maturi; 5: estratto dell'endocarpo dei frutti maturi; 6: estratto del mesocarpo dei frutti immaturi; 7: estratto dell'endocarpo dei frutti immaturi; 8: estratto idroalcolico delle foglie.

Tabella 5.5. Inibizione della perossidazione lipidica (β -carotene bleaching test) dopo 60 minuti di incubazione.

Estratti	% di inibizione ^a						
	0.1 (mg/ml)	0.05 (mg/ml)	0.025 (mg/ml)	0.01 (mg/ml)	0.005 (mg/ml)	0.0025 mg/ml)	0.00125 mg/ml)
<i>Cedri immaturi</i>							
Mesocarpo	96.77±1.9	90.68±1.9	88.2±2.9	82.5±1.9	63.69±1.6	25.09±0.6	16.81±0.5
Endocarpo	95.25±2.0	88.97±1.9	84.9±1.9	70.72±1.8	59.89±1.5	11.00±0.1	7.13± 0.1
<i>Cedri maturi</i>							
Epicarpo	85.5±1.9	76.76±1.8	67.05±1.7	35.2 ±1.2	18.67±0.8	-	-
Mesocarpo	64.19±1.6	53.33±1.4	29.14±1.0	16.68±0.6	15.6 ±0.7	-	-
Endocarpo	70.2±1.7	68.19±1.7	67.62±1.8	41.33±1.2	36.9 ±1.0	26.93±0.7	22.95±0.6
Semi	-	-	-	-	-	-	-
Fiori	86.3±1.9	84.98±1.8	82.32±1.8	66.54±1.7	44.68±1.5	23.72±1.0	16.43±0.7
Foglie	63.80±1.7	60.20±1.7	57.20±1.6	49.80±1.5	49.00±1.4	-	-

^aMedia \pm SD (n= 3). Propil gallato: controllo positivo.

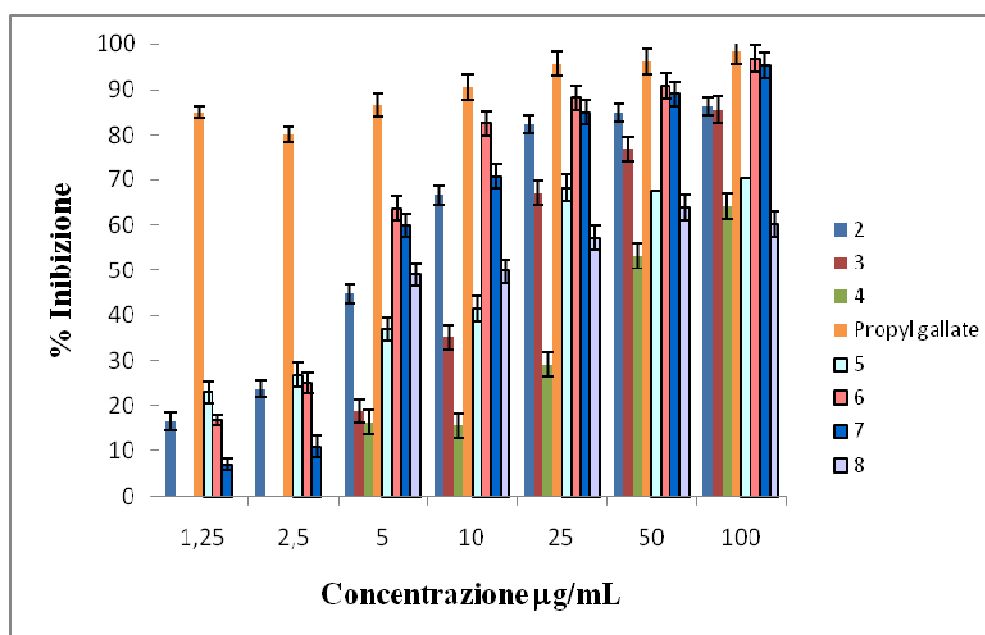


Figura 5.8. Inibizione della perossidazione lipidica degli estratti di Cedro dopo 60 minuti di incubazione. Controllo positivo: propil gallato. 1: estratto dei semi; 2: estratto dei fiori; 3: estratto dell'epicarpo dei frutti maturi; 4: estratto del mesocarpo dei frutti maturi; 5: estratto dell'endocarpo dei frutti maturi; 6: estratto del mesocarpo dei frutti immaturi; 7: estratto dell'endocarpo dei frutti immaturi; 8: estratto idroalcolico delle foglie.

5.6.2. Attività antiinfiammatoria

L'attività antinfiammatoria degli estratti e degli oli essenziali del *C. medica* cv Diamante è stata determinata *in vitro* analizzando i loro effetti inibitori sul rilascio del mediatore chimico nitrossido (NO) in macrofagi.

L'effetto inibitorio degli estratti e degli oli essenziali di Cedro sulla produzione del NO in macrofagi stimolati con lipopolisaccaridi è evidenziato nella tabella 5.6.

I migliori risultati sono stati ottenuti con gli oli essenziali e nello specifico con gli oli essenziali ottenuti per idrodistillazione e spremitura meccanica, che hanno mostrato un'attività dose-dipendente.

I risultati ottenuti evidenziano come l'olio essenziale ottenuto per idrodistillazione presenti una significativa attività antinfiammatoria con un valore di IC₅₀ di 17.0 µg/ml, valore importante se confrontato con quello dell'indometacina utilizzata come controllo positivo (IC₅₀ di 53.0 µg/ml).

L'olio essenziale ottenuto per spremitura ha mostrato un'attività inferiore con un valore di IC₅₀ di 103.0 µg/ml. Negli ultimi anni molti studi sono stati condotti sull'attività antinfiammatoria di diversi oli essenziali e alcuni costituenti, come 1,8-cineolo, terpinen-4-olo, α-terpineolo e linalolo, hanno dimostrato una rilevante attività (Martin *et al.*, 1993; Moretti *et al.*, 1997; Santos and Rao, 2000; Hart *et al.*, 2000; Peana *et al.*, 2002; Held *et al.*, 2007).

Il maggior contenuto in terpinen-4-olo, α-terpineolo, linalolo e altri terpeni può dar conto, quindi, della maggiore attività dell'olio essenziale ottenuto per idrodistillazione.

Tra gli estratti idroalcolici ottenuti dai Cedri maturi il più attivo si è dimostrato quello ottenuto dai fiori con un valore di IC₅₀ di 425 µg/ml, seguito dall'estratto delle foglie (IC₅₀ di 502 µg/ml).

Tabella 5.6. Inibizione della produzione di nitrossido (NO) in cellule RAW 264.7 LPS-stimolate degli estratti e degli oli essenziali di *C. medica* cv. Diamante.

Estratti	IC₅₀ (µg/ml)
<i>Cedri immaturi</i>	
Mesocarpo	382 ± 2.5*
Endocarpo	NA
<i>Cedri maturi</i>	
Epicarpo	726 ± 2.8*
Mesocarpo	NA
Endocarpo	NA
Semi	NA
Fiori	425 ± 1.9*
Foglie	502 ± 2.6*
Oli essenziali	
Foglie	NA
Epicarpo (idrodistillazione)	17.0 ± 1.3*
Epicarpo (spremitura meccanica)	103.0 ± 1.6*
Epicarpo (estrazione in fase supercritica)	NA
Indometacina ^b	53.0 ± 1.2

^a Media ± SD (n = 3); ^b Controllo positivo. NA: non attivo. One-way ANOVA test: *** p < 0.0001; Dunnett's test: * p < 0.01.

5.6.3. Attività anticolinesterasica

Il morbo di Alzheimer è caratterizzato da un consistente deficit della neurotrasmissione colinergica, con particolare interesse dei neuroni dell'area basale del cervello. Per queste ragioni l'Alzheimer e altre forme di demenza come la demenza vascolare, il morbo di Parkinson, la demenza a corpi di Lewy, possono essere trattate sintomaticamente utilizzando agenti in grado di aumentare i livelli di acetilcolina ovvero inibendo le colinesterasi AChE e BChE responsabili, fisiologicamente, dello spegnimento della sinapsi colinergica. Attraverso questo approccio terapeutico è possibile, infatti, ottenere miglioramenti delle performance cognitive e di memoria (Loizzo *et al.*, 2008).

Nell'ambito del presente progetto di ricerca gli estratti e gli oli essenziali ottenuti mediante differenti procedure estrattive da *C. medica* cv Diamante sono stati sottoposti a screening per la valutazione dell'inibizione delle colinesterasi.

I risultati ottenuti evidenziano come l'utilizzo di differenti tecniche estrattive influenzi la bioattività degli estratti e degli oli essenziali.

Tutti gli estratti sono risultati inattivi eccetto l'estratto dell'epicarpo di Cedro maturo che ha mostrato una percentuale di inibizione del 33.6 e 29.9% alla massima concentrazione testata (200 µg/ml).

Gli oli essenziali ottenuti sia dalle foglie di Cedro sia dall'epicarpo dei frutti maturi attraverso differenti metodiche estrattive hanno evidenziato una potente azione anti-colinesterasica attraverso l'inibizione di entrambe le colinesterasi (Tab. 5.7).

Tabella 5.7. Attività inibitoria delle colinesterasi [IC₅₀ (µg/ml)] dell'olio essenziale di *C. medica* cv Diamante ottenute attraverso idrodistillazione (HD), spremitura meccanica (CP) e estrazione in fase supercritica (SFE) e dell'olio essenziale delle foglie ottenuto per idrodistillazione (HDF).

Olio essenziale di <i>C. medica</i> cv <i>Diamante</i>	AChE	BChE
HD	171.3 ± 3.6*	154.6 ± 2.9*
CP	298.8 ± 4.2*	NA
SFE	NA	NA
HDF	27.7 ± 4.2*	45.8% (200 µg/ml)
Fisostigmina ^a	0.2 ± 0.004	2.4 ± 0.02

IC₅₀ media ± S.D. (n = 3). NA: non attivo. One-way ANOVA test: *** p < 0.0001; Dunnett's test: * p < 0.01. Indice di Selettività (SI): (IC₅₀ BChE/ IC₅₀ AChE). ^aFisostigmina: controllo positivo.

In particolare, l'olio ottenuto per idrodistillazione delle foglie presenta un'attività procolinesterasica notevolmente superiore all'olio essenziale ottenuto dalle bucce attraverso la medesima tecnica estrattiva, esibendo un valore di IC₅₀ di 27.7 µg/ml sull'AChE.

L'olio ottenuto dall'epicarpo dei frutti di Cedro presenta un'interessante capacità inibitoria su entrambi gli enzimi con un valore di IC₅₀ di 171.3 e 154.6 µg/ml, per AChE e BChE, rispettivamente con un indice di selettività (IC₅₀ BChE/ IC₅₀ AChE) di 0.9. L'olio ottenuto per spremitura meccanica presenta, invece, un'azione selettiva sull'AChE (IC₅₀ 298.8 µg/ml).

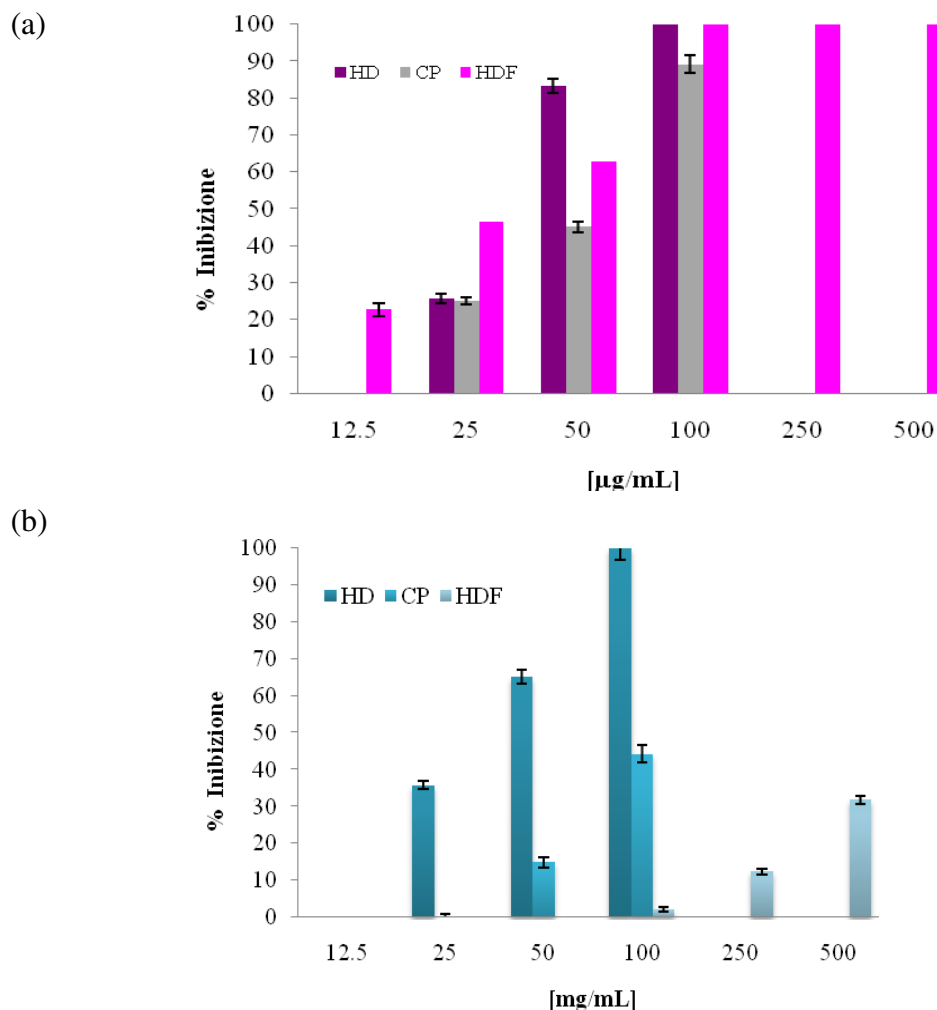


Figura 5.9. Attività anti-colinesterasica [a) AChE; b) BChE] degli oli essenziali ottenuti da *C. medica* cv Diamante attraverso idrodistillazione (HD) e spremitura meccanica (CP) e dell'olio essenziale delle foglie ottenuto per idrodistillazione (HDF).

In precedenza Miyazawa *et al.* (2005) hanno evidenziato l'attività pro-colinesterasica, tramite l'inibizione dell'AChE, di numerosi terpeni. In particolare, il monoterpene α -terpinene (Tab. 5.8; Fig. 5.10) mostra un IC_{50} di 1 mM sull'AChE. Questo composto è presente in relativa abbondanza nell'olio di Cedro ottenuto sia per idrodistillazione sia per spremitura. Altri terpeni con interessante attività inibitoria sull'AChE sono: α -pinene (IC_{50} 0.4 mM), γ -terpinene e terpinen-4-olo che alla concentrazione di 1.2 mM esibiscono rispettivamente una percentuale d'inibizione sull'AChE del 22.6 e 24.4 %. Il limonene, composto presente in massima concentrazione nell'olio di Cedro, esibisce una capacità inibitoria sull'AChE del 27% a

164.0 $\mu\text{g/ml}$. Lo stesso gruppo di ricerca ha studiato l'attività procolinesterasica dell'olio essenziale di *C. paradisi* e della cumarina in esso contenuta: l'auraptene (inibizione del 24% a 1.62 $\mu\text{g/ml}$) (Miyazawa *et al.*, 2001).

Tabella 5.8. Attività inibitoria dell'acetilcolinesterasi di terpeni identificati in *C. medica* cv Diamante.

Componenti dell'olio essenziale di Cedro	AChE (IC ₅₀)
α -Terpinene	1.0 mM
α -Pinene	0.4 mM
γ -Terpinene	22.6% (1.2 mM)
Terpinen-4-olo	22.4% (1.2 mM)
Limonene	27% (164 $\mu\text{g/ml}$)

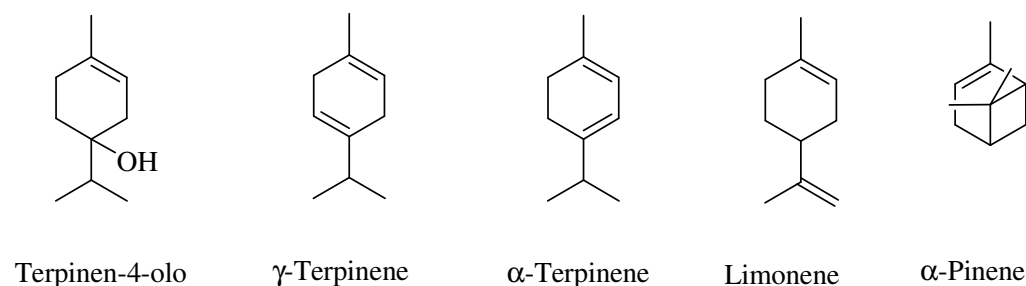


Figura 5.10. Struttura chimica di terpeni anticolinesterasici costituenti dell'olio essenziale di Cedro.

5.6.4. Attività ipoglicemizzante *in vitro* e *in vivo*

Con lo scopo di valutare la capacità ipoglicemizzante dei campioni di Cedro oggetto del presente studio, è stata studiata la capacità degli estratti e degli oli essenziali di Cedro di inibire gli enzimi α -amilasi e α -glucosidasi.

Dalle percentuali di inibizione ottenute nei saggi biologici è stato possibile calcolare i valori di IC₅₀, ovvero la concentrazione alla quale si verifica il 50% di inibizione dell'attività dell'enzima.

I dati ottenuti sono riportati in tabella 5.9. Tutti gli estratti risultati attivi hanno mostrato un'attività di tipo dose-dipendente. Interessante è il dato relativo all'epicarpo dei frutti maturi, estratto per macerazione idroalcolica, che ha evidenziato una potente azione inibitoria sia sull' α -amilasi sia sull' α -glucosidasi con valori di IC₅₀

rispettivamente di 258.66 e 263.18 $\mu\text{g/ml}$. Tale estratto si caratterizza per il più alto contenuto in polifenoli totali (641.2 mg/100 g di materiale vegetale fresco) e per la presenza, tra i flavonoidi scelti come markers fitochimici, di esperetina, quercetina e apigenina, testati in precedenza su α -amilasi pancreatica porcina con valori di IC_{50} rispettivamente di > 0.50 mM, 0.50 mM e > 0.50 mM. Quercetina e esperetina sono risultati attivi sull' α -glucosidasi (*Saccharomyces cerevisiae*) con valori di IC_{50} rispettivamente di 7 μM e 150 μM . Di contro l'apigenina ha dimostrato una inibizione enzimatica del 43% alla concentrazione massima testata di 200 μM (Tadera *et al.*, 2006).

Si segnala l'azione dell'estratto delle foglie di *C. medica* cv Diamante sull'enzima α -amilasi con un valore di IC_{50} di 438.50 $\mu\text{g/ml}$.

Tabella 5.9. Inibizione degli enzimi digestivi α -amilasi e α -glucosidasi da parte degli estratti e degli oli essenziali da *C. medica* cv Diamante.

Campione	α-amilasi	α-glucosidasi
Estratti	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Cedri immaturi</i>		
Mesocarpo	702.18 \pm 5.7**	539.66 \pm 6.4**
Endocarpo	844.53 \pm 3.6**	472.86 \pm 4.7**
<i>Cedri maturi</i>		
Epicarpo	258.66 \pm 4.9**	263.18 \pm 5.6**
Mesocarpo	707.39 \pm 5.6**	633.06 \pm 3.4**
Endocarpo	426.04 \pm 4.4**	574.07 \pm 5.8**
Semi	>1000	>1000
Fiori	>1000	>1000
Foglie	438.50 \pm 5.2**	777.83 \pm 5.4**
Oli essenziali		
HDF	>1000	>1000
HD	>1000	>1000
CP	>1000	>1000
SFE	>1000	>1000
Acarbose	50.0 \pm 0.9	35.5 \pm 1.2

IC_{50} media \pm S.D. (n = 3). NA: non attivo. One-way ANOVA test: ** $p < 0.001$; Dunnett's test: ** $p < 0.01$. Acarbose: controllo positivo. HD: olio essenziale dell'epicarpo dei frutti maturi ottenuto per idrodissillazione; CP: olio essenziale dell'epicarpo dei frutti maturi ottenuto per spremitura meccanica; SFE: olio essenziale dell'epicarpo dei frutti maturi ottenuto per estrazione in fase supercritica; HDF: olio essenziale delle foglie ottenuto per idrodissillazione.

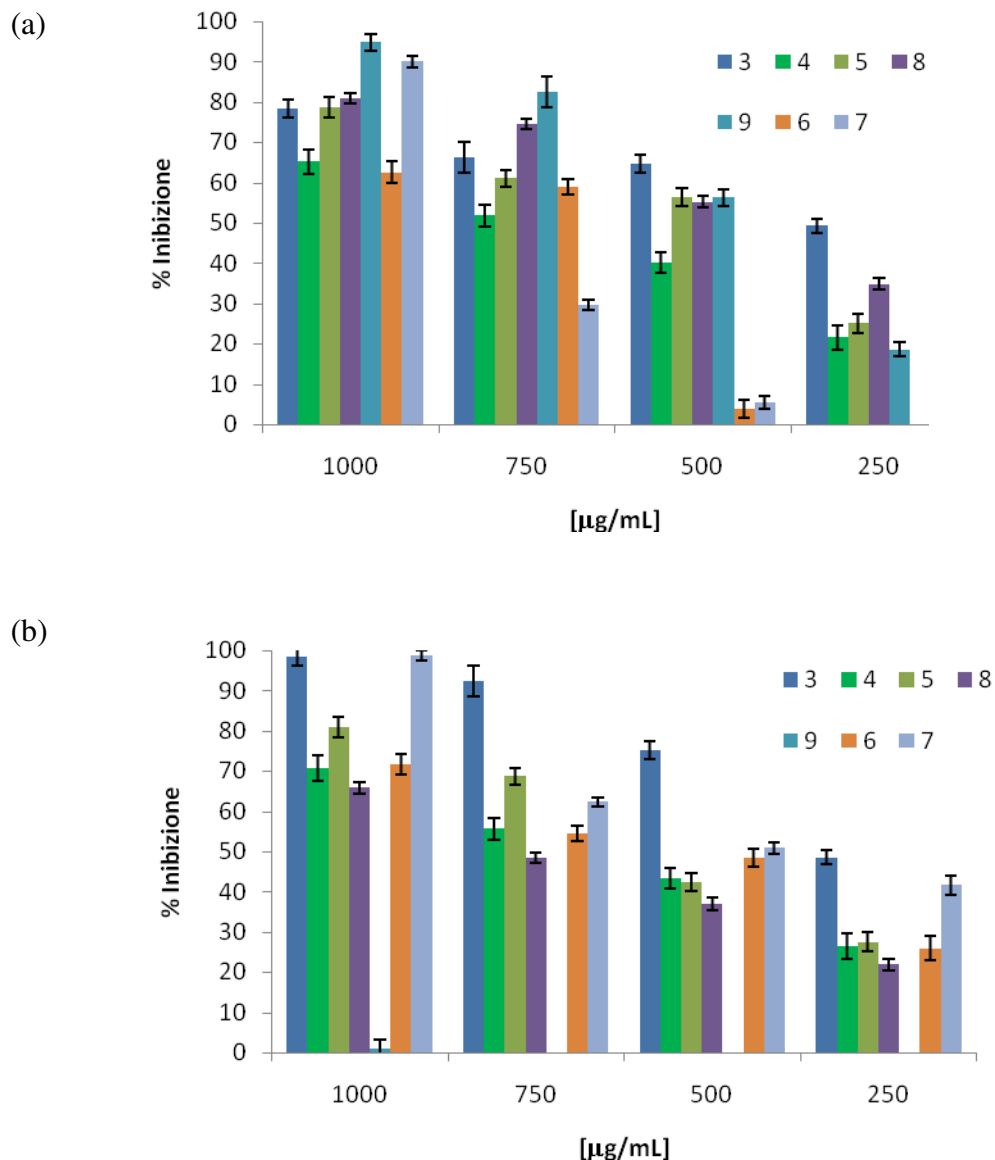


Figura 5.11. Attività di inibizione sull' α -amilasi (a) e α -glucosidasi (b) degli estratti di *C. medica* cv Diamante. 3: estratto dell'epicarpo dei frutti maturi; 4: estratto del mesocarpo dei frutti maturi; 5: estratto dell'endocarpo dei frutti maturi; 6: estratto del mesocarpo dei frutti immaturi; 7: estratto dell'endocarpo dei frutti immaturi; 8: estratto idroalcolico delle foglie.

Il dato significativo ottenuto *in vitro* nell'inibizione degli enzimi digestivi α -amilasi e α -glucosidasi dall'estratto idroalcolico dell'epicarpo dei frutti maturi di Cedro ha indirizzato la selezione di questo campione per successivi studi sulla valutazione della secrezione dell'insulina *in vitro* e dei parametri metabolici *in vivo*.

La valutazione della secrezione di insulina è stata effettuata sulla linea cellulare β pancreatica murina MIN6, linea cellulare ad alto potere secretorio di insulina e per questo ritenuta un buon modello sperimentale (Persaud, 1958).

La misurazione degli effetti dell'estratto di Cedro, testato alle concentrazioni 0.5 mg/ml e 1 mg/ml, sulla secrezione insulinica in cellule MIN6 ha indicato un effetto di diretta stimolazione sul rilascio esocitotico di insulina.

L'estratto di *C. medica* cv Diamante inizia la stimolazione della secrezione di insulina in maniera concentrazione-dipendente quando le cellule sono trattate con una concentrazione di glucosio 2 mM.

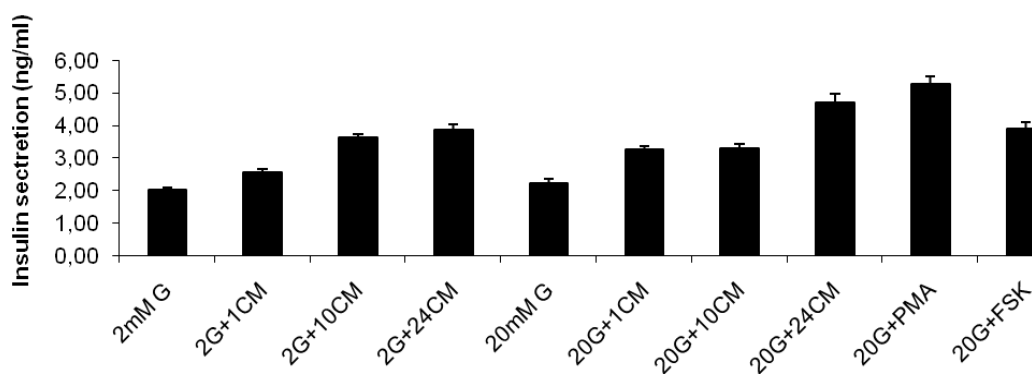


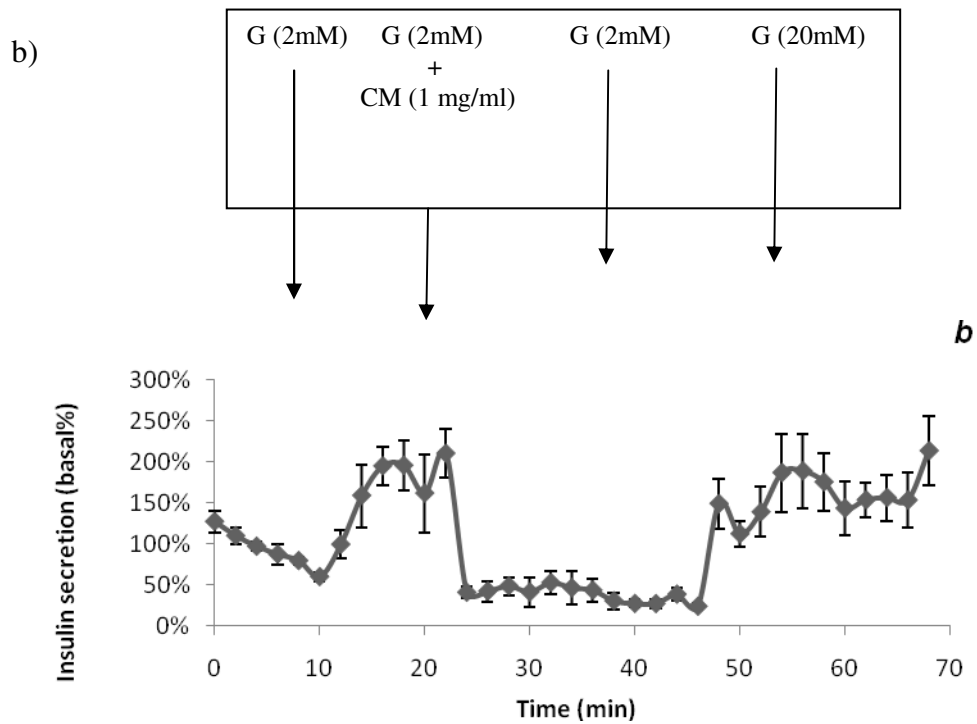
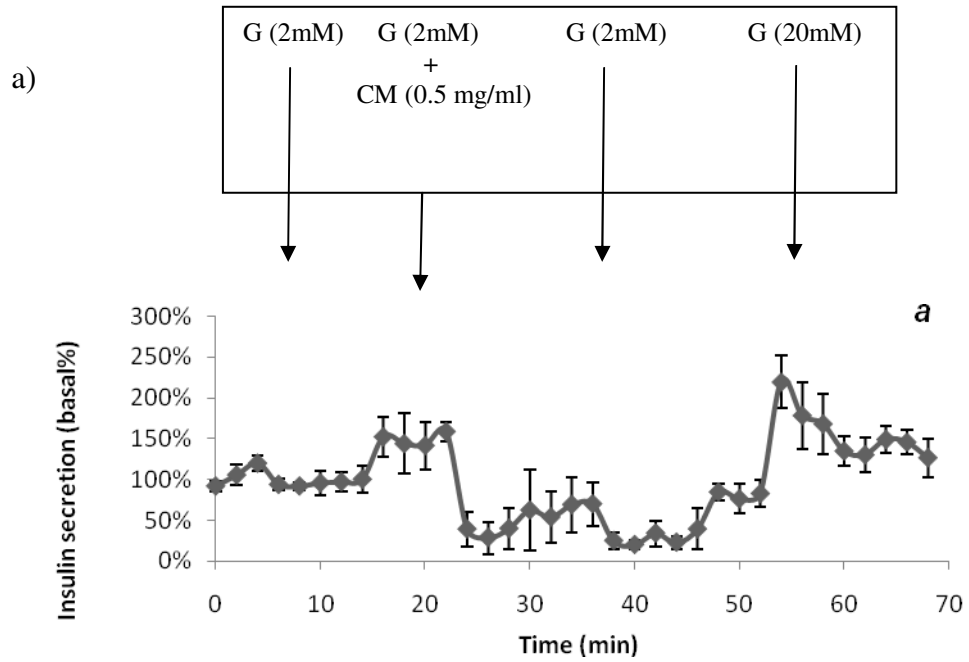
Figura 5.12. Effetto dell'estratto idroalcolico dell'epicarpo dei frutti di Cedro sulla secrezione di insulina in cellule MIN6 incubate (30 min) in buffer contenente solo glucosio 2 mM (2mM G) o concentrazioni crescenti di estratto di Cedro (1-24 mg/ml). PMA: Phorbol myristate acetate; FSK: Forkolin. CM: estratto di Cedro. I dati rappresentano la media \pm S.D. ($n = 8$), $P < 0.05$.

L'esposizione di pseudo isole all'estratto alla concentrazione di 1 mg/ml porta ad un rapido incremento della risposta secretoria al glucosio.

Come mostrato in figura 5.13 (a) l'esposizione a concentrazioni sottostimolatorie di glucosio (2 mM) induce un lieve, transitorio e reversibile effetto stimolatorio sulla secrezione di insulina. L'esposizione a concentrazioni di glucosio 2 mM associato a una concentrazione di 0.5 mg/ml dell'estratto di Cedro (CM) determina un incremento della secrezione insulinica per circa 10 minuti.

Un dosaggio dell'estratto di Cedro di 1 mg/ml determina, come mostrato in Fig. 5.13 (b) lo stesso andamento della curva, ma con effetti più pronunciati in termini di aumento della percentuale di secrezione di insulina.

L'effetto stimolatorio dell'estratto di *C. medica* cv Diamante, per entrambe le concentrazioni testate, in associazione a concentrazioni di glucosio stimolatorie sulla secrezione insulinica (20 mM) risulta transiente [Fig. 5.13 (c) e (d)].



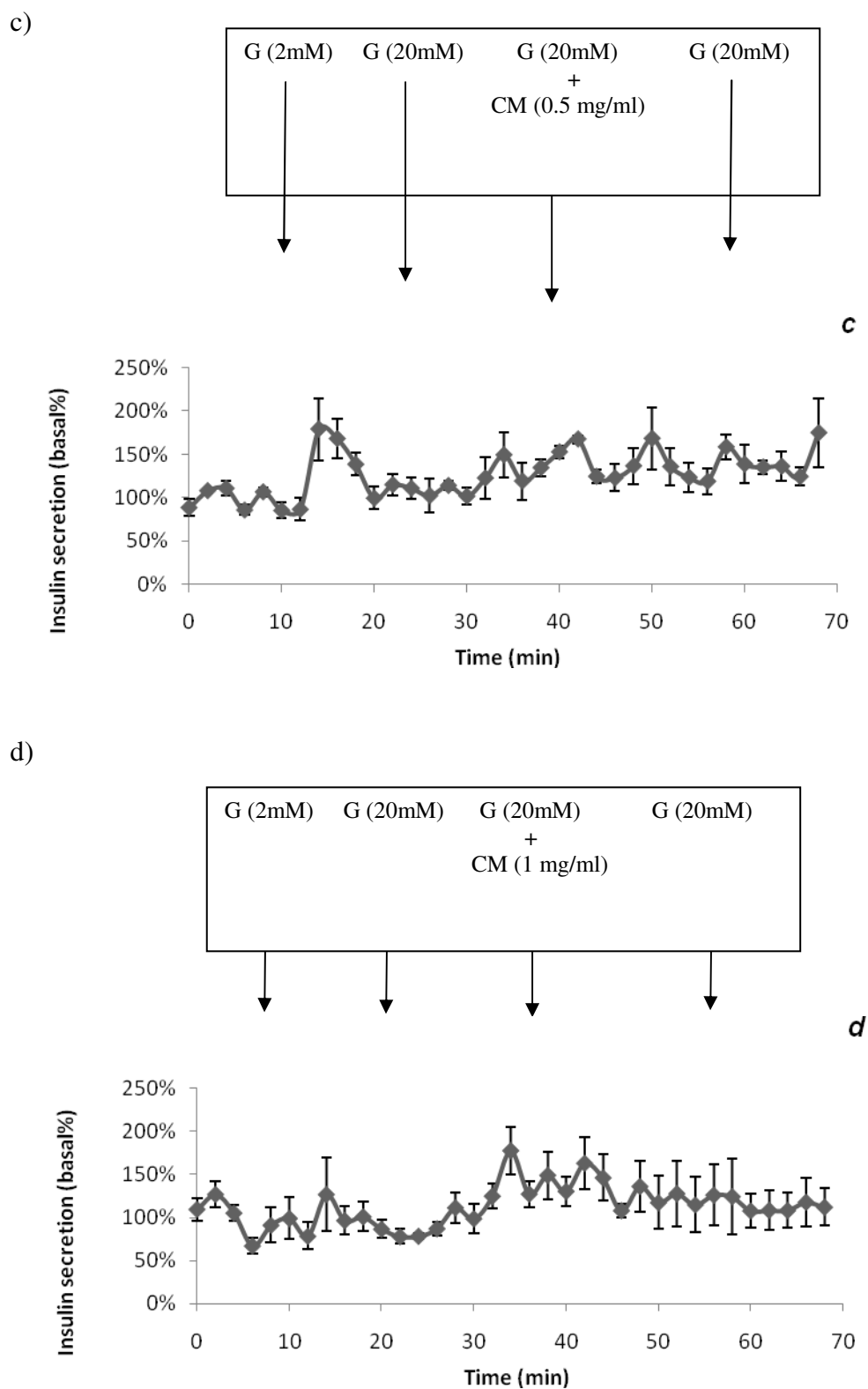


Figura 5.13. “Time course” e reversibilità dell’effetto dell’estratto dell’epicarpo dei frutti di Cedro sulla secrezione insulinica da pseudo isole di cellule MIN6. Le cellule MIN6 sono state perfuse con buffer contenente glucosio (G) 2 mM o 20 mM, in presenza o assenza di estratto di Cedro (CM) alla concentrazione di 1 mg/ml e 0.5 mg/ml, come evidenziato in figura. La rilevazione della secrezione insulinica è stata effettuata attraverso prelievi ogni 2 minuti. I punti rappresentano la media \pm SD ($n = 4$).

Tali risultati evidenziano come l'attività ipoglicemizzante dell'estratto di Cedro possa essere legata anche all'incremento della secrezione di insulina in cellule β pancreatiche in presenza di concentrazioni sottostimolatorie di glucosio.

L'estratto è stato testato su topi CD-1 (Harlan) di età tra le 12 e le 16 settimane e peso compreso tra 20 e 25 g. Dopo 30 giorni dall'inizio della somministrazione gli animali sono stati sacrificati ed il sangue è stato prelevato per le determinazioni ematologiche e biochimiche.

Tutti i parametri biochimici testati hanno mostrato livelli compresi nei range fisiologici; differenze statistiche sono state riscontrate per il peso corporeo, la glicemia, il colesterolo e i trigliceridi.

Come riportato in tabella 5.10, un aumento del peso corporeo è stato riscontrato negli animali di controllo e nei topi trattati con *C. medica* cv Diamante alla dose di 300 mg/kg. Di contro, una significativa diminuzione del peso corporeo si è osservata nei topi trattati alla dose di 600 mg/kg.

Nei topi trattati con quest'ultima dose si è osservata una diminuzione del glucosio ($P < 0.01$), del colesterolo e dei trigliceridi ($P < 0.05$). Inoltre, una diminuzione dei livelli di glucosio è stata osservata anche alla dose di 300 mg/kg ($P < 0.05$).

Tabella 5.10. Valutazione dei parametri metabolici (glucosio, colesterolo e trigliceridi) dopo trattamento con l'estratto idroalcolico dell'epicarpo dei frutti maturi di Cedro.

<i>Dose</i>	Peso (g)		Glucosio (mg/dl)	Colesterolo (mg/dl)	Trigliceridi (mg/dl)
	<i>giorno 0</i>	<i>giorno 30</i>			
Controllo	34.5 ± 1.9	40.3 ± 1.9*	119.3 ± 12.4	127.2 ± 10.8	99.3 ± 6.4
300	34.3 ± 2.2	38.0 ± 3.7*	109.0 ± 4.3°	122.5 ± 14.8	93.7 ± 5.9
600	34.8 ± 1.7	31.5 ± 2.1*	92.5 ± 4.7b	107.2 ± 9°	84.7 ± 12.2°

*= $P < 0.01$ vs giorno 0; a= $P < 0.05$ vs controllo; b= $P < 0.01$ vs controllo.

In precedenza l'estratto dell'epicarpo di un'altra specie di *Citrus*, il *C. sinensis*, è stato oggetto di studio per valutare il suo potenziale antidiabetico in topo trattati con alloxan (Parmar and Kar, 2007).

Lo studio ha dimostrato come l'estratto del *C. sinensis* abbassi i livelli massimi di glucosio e presenti un'attività antiperossidativa alla concentrazione di 25 mg/kg.

Somministrando una singola dose di alloxan (120 mg/kg) negli esperimenti si osservava un aumento dei livelli serici di glucosio e dell'attività dell' α -amilasi, un aumento della velocità di consumo di acqua e della perossidazione lipidica (LPO) in tessuti epatici, cardiaci e renali con una parallela riduzione dei livelli di insulina. La somministrazione di *C. sinensis* (alla concentrazione di 25 mg/kg) è stata in grado di normalizzare tutti gli effetti prodotti dall'alloxan, dimostrando il potenziale antidiabetico e antiperossidativo dell'estratto dell'epicarpo dei frutti di *C. sinensis*.

L'analisi fitochimica dell'estratto ha messo in evidenza la presenza in esso di un elevato contenuto di polifenoli totali, ai quali è possibile ascrivere gli effetti biologici *in vivo* della pianta.

In conclusione, la valutazione dell'attività ipoglicemizzante *in vitro* e *in vivo* dell'estratto idroalcolico dell'epicarpo di Cedro maturo può rappresentare sicuramente un buon punto di partenza per la progettazione di un potenziale utilizzo nella terapia e/o prevenzione del diabete.

BIBLIOGRAFIA

- Akaike T, Fujii S, Kato A, Yoshitake J, Miyamoto Y, Sawa T, Okamoto S, Suga M, Asakawa M, Nagai Y, Maeda H. (2000). Viral mutation accelerated by nitric oxide production during infection *in vivo*. *FASEB J.*, 14, 1447-1454.
- Conforti F, Statti G, Loizzo MR, Sacchetti G, Poli F, Menichini F. (2005). *In vitro* antioxidant effects and inhibition of α -amilase of two varieties of *Amarantus caudatus* seeds. *Biological and pharmaceutical bulletin*, 28, 1098-1102.
- Conforti F, Loizzo MR, Statti G, Menichini F. (2005). Antioxidant activity and inhibition of α -amylase of methanolic extract and fractions from *Achillea ligustica* All. *Biological and pharmaceutical bulletin*, 28, 1791-4.
- Amin I, Zamaliah MM, & Chin, WF. (2004) Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chemistry* 87, 581-586.
- Aviram M. (2000). Review of human studies on oxidative damage and antioxidant protection related to cardiovascular diseases *Free Radic Res* 33: S85-97.
- Ballard CG, Greig NH, Guillozet-Bongaarts AL, Enz A, Darvesh S. (2005). Cholinesterases: roles in the brain during health and disease. *Curr. Alzheimer. Res.* 2, 307-318.
- Christen Y. (2000). Oxidative stress and Alzheimer disease *Am J Clin Nutr* 71, 621S-629S.
- Conforti F., Statti G., Menichini F. (2007). Chemical and biological variability of hot pepper fruits (*Capsicum annuum* var. *acuminatum*) in relation to maturity stage. *Food Chem* 20, 1096-1104.
- Cyran HB. (1989). *The Asian Way with Herbs*, vol. 15. PRP Books, NSW, Australia.
- Gey GO, Gey MK. (1936). The maintenance of human normal cells in continuous culture. Preliminary report: cultivation of mesoplastic tumours and normal cells and notes on methods of cultivation. *Am. J. Cancer*, 27, 45-75.
- Gutteridge JM. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.* 41, 1819-1828.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. (1989). *Free radicals in biology and medicine* (2nd edn), Oxford University Press: Oxford.

- Hart PH, Brand C, Carson CF, Riley TV, Prager RH, Finlay-Jones JJ. (2000). Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflamm Res.*, 49, 619-26.
- Hauge-Evans AC, Squires PE, Belin VD, Roderigo-Milne H, Ramracheya RD, Persaud SJ, Jones PM. (2002). Role of adenine nucleotides in insulin secretion from MIN6 pseudoislets. *Mol Cell Endocrinol.*, 191, 167-176.
- Held S, Schieberle P, Somoza V. (2007). Characterization of α -terpineol as an anti-inflammatory component of orange juice by *in vitro* studies using oral buccal cells. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 8040-8046.
- Jones PM, Salmon DM, Howell SL. (1988). Protein phosphorylation in electrically permeabilized islets of Langerhans. Effects of Ca^{2+} , cyclic AMP, a phorbol ester and noradrenaline. *Biochem J.*, 254, 397-403.
- Kim DK, Lee KT, Baek NI, Kim SH, Park HW, Lim JP, Shin TY, Eom DO, Yang JH, Eun JS. (2004). Acetylcholinesterase inhibitors from the aerial parts of *Corydalis speciosa*. *Arch Pharm Res.* 27, 1127-31
- Kongkathip N, Dhumma-upakorn P, Kongkathip B, Chawanoraset K, Sangchomkaeo P, Hatthakitpanichakul S. (2002). Study on cardiac contractility of cycloeucaleanol and cycloeucalenone isolated from *Tinospora crispa*. *Journal of Ethnopharmacology* 83, 95-99.
- Kordali S, Cakir A, Ozer H, Cakmakci R, Kesdek M, Mete E. (2008). Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresour Technol.* 99, 8788-95.
- Kruk I, Michalska T, Lichszteid K, Kødna A, Aboul-Enein HY. (2000). The effect of thymol and its derivatives on reactions generating reactive oxygen species. *Chemosphere* 41, 1059-1064.
- Loizzo MR, Tundis R, Menichini F, Bonesi M, Statti GA, Deguin B, Tillequin F, Menichini F, Houghton PJ. (2007). Acetylcholinesterase inhibition by extracts and isolated flavones from *Linaria reflexa* Desf. (Scrophulariaceae). *Nat. Prod. Comm.* 2, 759-763.

- Loizzo MR, Tundis R, Menichini F, Menichini F. (2008). Natural products and their derivatives as cholinesterase inhibitors in the treatment of neurodegenerative disorders: an update. *Curr. Med. Chem.* 15, 1209-1228.
- Maeda H, Akaike T. (1998). Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry* 63, 854-865.
- Maiza-Benabdesselam F, Khentache S, Bougoffa K, Chibane M, Adach S, Chapeleur Y, Max H, Laurain-Mattar D. (2007). Antioxidant activities of alkaloid extracts of two Algerian species of *Fumaria*: *Fumaria capreolata* and *Fumaria bastardii* *Rec. Nat. Prod* 1, 28-35.
- Marin-Neto JA, Maciel BC, Secches AL, Gallo L. (1988). Cardiovascular effects of berberine in patients with severe congestive heart failure. *Clin Cardiol* 11, 253-260.
- Martin S, Padilla E, Ocete MA, Galves J, Jimenez J, Zarzuelo A. (1993). Antiinflammatory activity of the essential oil of *Bupleurum fruticosens*. *Planta Med.*, 59, 533-536.
- Melzer D. (1998). New drug treatment for Alzheimer's disease: lessons for healthcare policy. *Br Med J* 316, 762-764.
- Menphini A, Pagiotti R, Capuccella M. (1993). Antifungal activity of carvacrol chemotypes of winter savory harvested in Italy. *Riv. Ital. EPPOS* 4 (Spec. NUM.), 566-571; *Chem. Abstr.* (1995) 123, 220771a.
- Min YD, Kwon HC, Yang MC, Lee KH, Choi SU, Lee KR. (2007). Isolation of limonoids and alkaloids from *Phellodendron amurense* and their multidrug resistance (MDR) reversal activity. *Arch Pharm Res.* 30, 58-63.
- Misík V, Bezáková L, Máleková L, Kostálová D. (1995). Lipoxygenase inhibition and antioxidant properties of protoberberine and aporphine alkaloids isolated from *Mahonia aquifolium*. *Planta medica* 61, 372-3.
- Miyazawa M, Yamafuji C. (2005). Inhibition of acetylcholinesterase activity by bicyclic monoterpenoids. *J Agric Food Chem.*, 53, 1765-1768.
- Miyazawa M, Tougo H, Ishihara M. (2001). Inhibition of acetylcholinesterase activity by essential oil from *Citrus paradisi*. *Nat Prod Lett.* 15, 205-210.
- Moretti MDL, Peana AT, Satta M. (1997). A study on antiinflammatory and peripheral analgesic action of *Salvia sclarea* oil and its main components. *J. Essent. Oil Res.* 9, 199-204.

- Nunomura A, Castellani R, Zhu X, Moreira P, Perry G, Smith M. (2006). *Involvement of oxidative stress in Alzheimer's disease. J Neuropathol Exp Neurol* 65, 631-41.
- Orfila L, Rodríguez M, Colman T, Hasegawa M, Merentes E, Arvelo F. (2000). Structural modification of berberine alkaloids in relation to cytotoxic activity *in vitro* *J Ethnopharmacol* 71, 449-56.
- Orhan I, Kartal M, Kan Y, Sener B. (2008). Activity of essential oils and individual components against acetyl- and butyrylcholinesterase *Z Naturforsch* 63, 547-53.
- Parmar HS, Kar A. (2007). Antidiabetic potential of *Citrus sinensis* and *Punica granatum* peel extracts in alloxan treated male mice. *Biofactors*, 31, 17-24.
- Persaud SJ. (1958). Pancreatic beta-cell line: their role in beta-cell research and diabetes therapy. In: Latner A, Editor *Clinical Biochemistry*; 2nd edition Philadelphia: Saunders Co; 47.
- Pollack O. (1953). Reduction of Blood Cholesterol in Man *Circulation*, 7, 702-6.
- Rubinstein LV, Shoemaker RH, Paul KD, Simon RM, Tosini S, Skehan P, Scudiero DA, Boyd MR. (1990). Comparison of *in vitro* anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumour cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 82, 1113-1118.
- Santos FA, Rao VS. (2000). Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytother Res.*, 14, 240-4.
- Schulz V. (2003). Ginkgo extract or cholinesterase inhibitors in patients with dementia: what clinical trials and guidelines fail to consider. *Phytomedicine* 4, 74-79.
- Slobodníková L, Kostálová D, Labudová D, Kotulová D, Kettmann V. (2004). Antimicrobial activity of *Mahonia aquifolium* crude extract and its major isolated alkaloids *Phytother Res.* 18, 674-6.
- Small GW, Rabins PV, Barry PP. (1997). Diagnosis and treatment of Alzheimer disease and related disorders. Consensus statement of the American Association for Geriatric Psychiatry, the Alzheimer's Association, and the American Geriatrics Society. *JAMA* 278, 1363-1371.
- Tadera K, Minami Y, Takamatsu K, Matsuoka T. (2006). Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by flavonoids. *J Nutr Sci Vitaminol.* 52, 149-53.

- Tasker A, Perry EK, Ballard, CG. (2005). Butyrylcholinesterase: impact on symptoms and progression of cognitive impairment. *Expert Rev. Neurotherapeutics* 5, 101-106
- Wagner H, Bladt S. (1996). *Plant Drug Analysis*. Springer, Germany.
- Winrow VR, Winyard PG, Morris CJ, Blake DR. (1993). Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. *Br. Med. Bull.* 49, 506-22.
- Wood-Kaczmar A, Gandhi S, Wood N. (2006). *Understanding the molecular causes of Parkinson's disease Trends Mol Med* 12, 521-8.
- Yanishlieva NV, Marinova EM, Raneva VG, Gordon MH. (1999). Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems *Food Chem.* 64, 59-66.

Conclusioni

Fino ad oggi sono state studiate oltre 30.000 specie di piante. Nonostante ciò, il regno vegetale si presenta, con le sue almeno 500.000 specie esistenti, come una sorgente, appena saggiata, di nuovi composti chimici.

Per comprendere la complessità e la difficoltà della ricerca in questo campo, solitamente realizzata secondo programmi di “screening” a vasto raggio, è da ricordare che spesso una molecola dotata di attività è presente in un singolo genere o addirittura in una sola specie vegetale; talora anche parti diverse della stessa pianta possono presentare ampie variazioni nel contenuto di principi attivi.

Nel presente lavoro sperimentale è stata condotta un’approfondita indagine fitochimica e biologica del Cedro (*Citrus medica* L. cv Diamante), un endemismo in Italia, tipico della zona costiera dell’alto Tirreno della provincia di Cosenza.

Lo studio realizzato ha inteso fornire una caratterizzazione fitochimica degli estratti ottenuti con differenti tecniche dal frutto, dai fiori e dalle foglie di Cedro, al fine di evidenziare il legame tra metodica estrattiva e composizione fitochimica dell’estratto.

Il frutto è stato esaminato nelle diverse componenti, al fine di individuare eventuali siti di accumulo dei principi attivi in relazione a quelli di produzione. Sono stati, così, oggetto di studio l’epicarpo, dal quale si ottiene, come per quasi tutti gli agrumi, l’olio essenziale dagli orticoli che lo compongono, il mesocarpo, importante elemento di congiunzione tra l’epicarpo e l’endocarpo, che rappresenta la parte quantitativamente più abbondante del frutto e l’endocarpo. Separatamente sono stati analizzati anche i semi al fine di determinare la variabilità del contenuto fitochimico in relazione alle altre parti del frutto e a eventuali processi biosintetici propri. Il lavoro fitochimico è stato completato estendendo le analisi ad altre componenti della pianta, nello specifico le foglie e i fiori, al fine di individuare nuove fonti di principi attivi utili già ritrovati nei frutti ovvero evidenziare una composizione fitochimica diversa in relazione ad un metabolismo variato rispetto al frutto.

L’approccio verso lo studio fitochimico di una specie vegetale risulta come una complessa serie di “steps” operativi, aventi ognuno finalità differenti.

L’estrazione consente di ottenere il cosiddetto fitocomplesso della pianta: una miscela costituita dalla quasi totalità dei metaboliti secondari, che è la formulazione più

usata in fitoterapia, per il potenziamento dell'azione dovuta a effetti sinergici, generalmente legati alla presenza di più principi attivi aventi la stessa attività biologica.

L'isolamento e la caratterizzazione dei singoli principi attivi consente da una parte la classificazione chimica (oltre che botanica) della specie vegetale e permette di verificare come l'habitat abbia influito sul metabolismo della pianta stessa, e dall'altra consente di verificare, attraverso saggi specifici, quale sia l'attività di ogni singolo composto ed in che misura questo contribuisce all'attività dell'intero fitocomplesso.

In questo senso i risultati ottenuti dallo studio condotto sul *Citrus medica* L. cv Diamante hanno permesso di evidenziare, attraverso il dosaggio di markers fitochimici scelti come rappresentativi della composizione chimica e dell'attività biologica del fitocomplesso, quali differenze possano esprimere componenti della stessa pianta, correlando le differenze fitochimiche a quelle biologiche e permettendo di individuare la porzione della pianta da utilizzare per scopi diversi da quello alimentare.

La seconda fase del lavoro sperimentale ha avuto come scopo, infatti, un dettagliato studio mirato a valutare le potenzialità biologiche del Cedro. In particolare, gli estratti e gli oli essenziali ottenuti sottoponendo ad estrazione le differenti componenti del Cedro (endocarpo, mesocarpo ed epicarpo dei frutti maturi ed immaturi, fiori, foglie e semi) sono stati saggiati per valutare l'attività "radical scavenging" mediante l'impiego del DPPH test e l'attività antiossidante mediante il β -carotene bleaching test, l'attività antiinfiammatoria mediante la valutazione dell'inibizione della produzione di nitrossido e l'inibizione di acetilcolinesterasi e butirrilcolinesterasi, i due principali enzimi implicati nell'eziopatogenesi del Morbo di Alzheimer. Tra tutti ha mostrato di possedere una potente attività antinfiammatoria l'olio essenziale dell'epicarpo dei frutti maturi di Cedro ottenuto per idrodistillazione con un valore di IC_{50} di 17.0 μ g/ml. Si segnala, invece, per la spiccata attività di inibizione dell'enzima acetilcolinesterasi l'olio essenziale ottenuto per idrodistillazione delle foglie di Cedro, con un valore di IC_{50} di 27.7 μ g/ml.

Con lo scopo di valutare la capacità ipoglicemizzante dei campioni di Cedro oggetto del presente studio e con lo scopo di mettere in relazione tale attività con la composizione chimica, è stata studiata la capacità degli estratti e degli oli essenziali di Cedro di inibire gli enzimi α -amilasi e α -glucosidasi. Interessante è il dato relativo all'epicarpo dei frutti maturi, estratto per macerazione idroalcolica, che ha evidenziato

una potente azione inibitoria sia sull' α -amilasi sia sull' α -glucosidasi con valori di IC_{50} rispettivamente di 258.66 e 263.18 $\mu\text{g/ml}$. Il dato significativo ottenuto *in vitro* dall'estratto dell'epicarpo dei frutti maturi di Cedro ha indirizzato la selezione di questo campione per successivi studi sulla secrezione dell'insulina *in vitro* e sulla valutazione dei parametri metabolici *in vivo*. La misurazione degli effetti dell'estratto di Cedro sulla secrezione insulinica in cellule β pancreatiche murine MIN6 ha indicato un effetto di diretta stimolazione sul rilascio esocitotico di insulina.

Testato *in vivo* alla dose di 600 mg/kg, l'estratto ha portato ad una diminuzione del glucosio, del colesterolo e dei trigliceridi.

I risultati ottenuti confermano l'ipotesi iniziale del presente lavoro di tesi, in base al quale si ipotizzava un potenziale impiego degli estratti di Cedro in nuove formulazioni nutraceutiche.