



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Scienze del Farmaco

SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE FARMACOLOGICHE
Indirizzo in Farmacologia, Tossicologia e Terapia,
XXV ciclo

**Studio dell'attività antiossidante di metaboliti secondari
da piante medicinali nella prevenzione
del danno vascolare**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Pietro Giusti

Coordinatore di Indirizzo : Ch.mo Prof. Pietro Palatini

Supervisore :Ch.mo Prof. Guglielmina Frolidi

Dottorando : Riccardo Bertin

INDICE

Abstract	5
Abbreviazioni	9
1. Introduzione	11
1.1 I radicali liberi e gli antiossidanti.....	11
1.2 L'aterosclerosi.....	14
1.3 Metaboliti secondari.....	19
• Baicaleina.....	21
• (-)-Bilobalide.....	23
• Eupatorina.....	25
• Galangina.....	26
• Magnololo.....	27
• Miricetina.....	29
• Oleuropeina.....	30
• Silibinina.....	31
2. Obiettivi sperimentali	35
3. Materiali e metodi	37
3.1 Reattivi saggi <i>in vitro</i>	37
3.2 Reattivi saggi <i>ex vivo</i>	37
3.3 Metodi <i>in vitro</i>	39
• DPPH <i>scavenging assay</i>	39
• ORAC <i>assay</i>	44
3.4 Metodi <i>ex vivo</i>	47
• Isolamento di LDL umane da frazioni plasmatiche.....	47

• TBARS test.....	48
• Cinetica di ossidazione delle LDL.....	50
• Isolamento di cellule endoteliali dal funicolo ombelicale umano.....	52
• Test di vitalità cellulare (MTT test).....	54
• Misurazione ROS intracellulari mediante DCFH-DA.....	55
4. Elaborazione dati	57
5. Risultati	59
6. Discussione	81
7. Bibliografia	95

Abstract

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF MEDICINAL PLANT-DERIVED SECONDARY METABOLITES IN VASCULAR DAMAGE PREVENTION

Oxygen and nitrogen-derived free radicals play an important role in the pathogenesis of several human diseases including neurodegeneration, chronic inflammation, cancer and cardiovascular disorders such as atherosclerosis, ischemic heart disease and hypertension. Epidemiological and experimental studies suggest the hypothesis that oxidative modifications of the endothelium and low-density lipoproteins (ox-LDLs) are crucial targets for the lipid-induced initiation and progression of atherogenesis; therefore, the preservation of the endothelial antioxidant capacity and the inhibition of LDL peroxidation by specific antioxidants are an attractive strategy to prevent and possibly to treat atherosclerosis and other related cardiovascular disorders.

Baicalein (isolated from *Scutellaria baicalensis* G.), (-)-bilobalide (*Ginkgo biloba* L.), eupatorin (*Eupatorium semiserratum* D.C.), galangin (propolis), magnolol (*Magnolia officinalis* L.), myricetin (*Myrica rubra* S.Z.), oleuropein (*Olea europaea* L.) and silybinin (*Silybum marianum* L.) are plant-derived compounds widely used in traditional medicine: the aim of this study was to investigate their radical-scavenging capacity, in order to prevent ox-LDLs generation and endothelial dysfunction, using different *in vitro* and *ex vivo* assays.

Antiradical properties were firstly analysed using both 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) scavenging assays, in that these methods rely on either single electron transfer or hydrogen atom transfer reaction kinetics. The DPPH assay was set in a final concentration range of 10^{-7} – 10^{-2} M, confirming a remarkable reducing capacity for each phenolic compound, especially for myricetin, oleuropein and baicalein. The ORAC detection proved that oleuropein, myricetin and magnolol are the most active compounds. In both DPPH and ORAC assays, the compound (-)-bilobalide did not show any noteworthy antioxidant activity.

Oxidation of LDLs may provide the crucial link between plasma LDL and atherogenesis: for this reason, the antioxidant effect of each compound was studied on the susceptibility of human LDLs to oxidation. A determination of the extent of LDL oxidation was pointed out spectrophotometrically by measuring the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), after incubation with 10 μ M CuSO₄, and by monitoring the oxidation kinetics profile of LDL particles at 234 nm. Free radical damage to lipids results in the production of

malondialdehyde (MDA), which reacts with thiobarbituric acid under high temperature and acidity conditions generating a chromogen; the lowest levels of TBARS, measured as nMol MDA/mg LDLs, were observed for oleuropein 2.5 μ M and baicalein 5.0 μ M.

The kinetics of LDL oxidation was studied using the lag time index. Magnolol, oleuropein and myricetin (0.5 μ M) exhibited a significantly higher LDL protection degree than the other polyphenols, with a considerable prolongation of the lag phase.

Besides these evaluations, we used human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) primary cultures to investigate ROS production. The HUVECs represent an interesting model which plays a pivotal role in the study of different pathological processes, including arterial disease. The protective function of antioxidants towards oxidative stress was measured in a range from 0.01 μ M to 5 μ M through the dichlorofluorescein assay, a fluorimetric probe used to evaluate the intracellular peroxides generation. ROS detection was carried out both in basal conditions and after 500 μ M H₂O₂ addition, as an external oxidative stimulus. In basal conditions, the phytoconstituents showed a mild antioxidant activity, even at different specific concentrations, highlighting an heterogeneous trend. Under H₂O₂-induced oxidative stress, galangin 5 μ M showed a higher antioxidant activity, and myricetin showed a significant antioxidant profile at 0.01 μ M, 0.1 μ M and 5 μ M, even if in a less extent.

The results suggest polyphenolics as a possible strategy against the oxidative stress-related disorders as atherosclerosis. This encourages the future research of plant-derived compounds as effective antioxidant agents, in order to decrease *in vivo* ox-LDLs production and to provide a suitable basis for novel pharmacological development against free radicals damage.

Abstract

STUDIO DELL'ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE DI METABOLITI SECONDARI DA PIANTE MEDICINALI NELLA PREVENZIONE DEL DANNO VASCOLARE

Le specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto rivestono un ruolo importante nella patogenesi di numerose malattie, tra le quali la neurodegenerazione, l'infiammazione cronica, il cancro e disordini cardiovascolari come l'aterosclerosi, le cardiopatie ischemiche e l'ipertensione. Studi sperimentali ed epidemiologici suggeriscono l'ipotesi che le modificazioni ossidative a carico dell'endotelio e delle lipoproteine a bassa densità (ox-LDL) rappresentano un fattore di cruciale importanza per l'iniziazione e la progressione dei processi aterosclerotici; preservare perciò l'integrità endoteliale e inibire la perossidazione delle LDL rappresentano una valida strategia per prevenire e, probabilmente, trattare l'aterosclerosi ed altri eventi cardiovascolari. Baicaleina (estratta da *Scutellaria baicalensis* G.), (-)-bilobalide (*Ginkgo biloba* L.), eupatorina (*Eupatorium semiserratum* D.C.), galangina (propoli), magnololo (*Magnolia officinalis* L.), miricetina (*Myrica rubra* S.Z.), oleuropeina (*Olea europaea* L.) e silibinina (*Silybum marianum* L.) sono composti di origine vegetale ampiamente utilizzati in medicina tradizionale nella cura di svariate malattie. Lo scopo di questo studio è stato focalizzato sulla determinazione della loro capacità antiradicalica, al fine di prevenire la formazione di ox-LDL ed attenuare la disfunzione endoteliale, ricorrendo all'impiego di diversi saggi *in vitro* ed *ex vivo*.

Le proprietà antiradicaliche dei metaboliti secondari sono state inizialmente studiate ricorrendo ai saggi dell'1,1-difenil-2-picrilidrazile (DPPH) e dell'*Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC). Si tratta di metodi che si avvalgono di cinetiche di reazione basate sul trasferimento di singolo elettrone o mediante cessione di un atomo di idrogeno. Il DPPH *scavenging assay* è stato eseguito entro un intervallo di concentrazioni compreso tra 10^{-7} M e 10^{-2} M confermando una notevole capacità riducente per ciascun composto polifenolico, specialmente per miricetina, oleuropeina e baicaleina. L'analisi ORAC ha indicato come oleuropeina, miricetina e magnololo siano i composti più attivi. In entrambi i protocolli, il composto (-)-bilobalide non ha mostrato alcuna attività degna di nota.

I processi di ossidazione delle LDL potrebbero, di fatto, rappresentare il nesso cruciale tra LDL plasmatiche ed aterogenesi: per questa ragione l'effetto antiossidante di ciascun composto è stato studiato in relazione alla suscettibilità delle LDL umane all'ossidazione. La determinazione del grado di ossidazione delle LDL è stata rilevata misurando la formazione di

specie reattive dell'acido tiobarbiturico (TBARS), a seguito dell'incubazione con CuSO_4 10 μM e monitorando il profilo cinetico di ossidazione delle LDL a 234 nm. I danni radicalici provocati a carico della frazione lipidica si traducono nella produzione di malondialdeide (MDA), una molecola in grado di reagire con l'acido tiobarbiturico in condizioni di alta temperatura ed acidità generando un addotto cromogeno; i composti oleuropeina 2.5 μM e baicaleina 5 μM hanno evidenziato i minori valori di TBARS, misurati come nMol MDA/mg LDL.

Il profilo cinetico delle LDL trattate con ciascun fitocostituente è stato studiato ricorrendo all'indice di *lag time*. Alla concentrazione di 0.5 μM il magnololo, l'oleuropeina e la miricetina hanno mostrato un grado di protezione delle LDL significativamente più elevato rispetto agli altri polifenoli, con un notevole prolungamento della fase di latenza.

Successivamente, si è passati allo studio delle colture primarie di cellule endoteliali umane isolate da vena ombelicale (HUVEC), per indagare la produzione di ROS. Le HUVEC rappresentano infatti un modello di fondamentale importanza nello studio di diversi processi patofisiologici correlati al sistema vascolare. L'attività degli antiossidanti nei confronti dello stress ossidativo è stata misurata nell'intervallo di concentrazione 0.01 - 5 μM mediante il saggio della diclorofluorescina, una sonda fluorimetrica impiegata per valutare la produzione intracellulare di perossidi. La determinazione delle specie reattive dell'ossigeno è stata condotta sia in condizioni basali, sia dopo l'aggiunta di H_2O_2 500 μM . In condizioni basali, i fitocostituenti hanno mostrato una modesta attività antiossidante mentre in condizioni di stress ossidativo indotto da H_2O_2 , la galangina 5 μM ha dimostrato un più spiccato carattere antiossidante; anche la miricetina ha mostrato un profilo antiossidante significativo a 0.01 μM , 0.1 μM e 5 μM , seppur di minore entità.

I risultati ottenuti *in vitro* suggeriscono che i polifenoli rappresentano una classe di composti naturali in grado di contrastare le disfunzioni ossidative legate all'aterosclerosi. Tali evidenze sperimentali incoraggiano la ricerca futura di derivati vegetali come efficaci agenti dotati di attività antiossidante anche *in vivo*, al fine di limitare la produzione di ox-LDL e fornire un adeguato presupposto per lo sviluppo di farmaci contro i danni provocati dalle specie radicaliche, in particolare a livello cardiovascolare.

ABBREVIAZIONI

$\cdot\text{O}_2^-$: anione superossido

$\cdot\text{OH}$: radicale idrossile

$^1\text{O}_2$: ossigeno singoletto

$\text{A}\cdot$: radicale

A^+ : radicale catione

AAPH: 2,2'-azobis(2-amidino-propano) diidrocloreuro

AH: antiossidante

ApoB: apolipoproteina B

ASC: acido ascorbico

AUC: *area under the curve*

BAI: baicaleina

BHA: butilidrossianisolo

BHT: butilidrossitoluene

BIL: (-)-bilobalide

COX-2: ciclossigenasi 2 (inducibile)

CuSO₄: solfato di rame

DCFH-DA: diclorofluorescina diacetato

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (terreno di coltura)

DMSO: dimetilsolfossido

DPPH: 1,1-difenil-2-picrilidrazile

DPPHH: difenilpicrilidrazina

EBM-2: *Endothelial Basal Medium* (terreno di coltura)

EC₅₀: concentrazione efficace 50%

EDTA: acido etilendiamminotetraacetico

EGM-2: *Endothelial Growth Factor* (terreno di coltura)

EUP: eupatorina

FBS: siero bovino fetale

FL: fluoresceina

GAL: galangina

H₂O₂: perossido di idrogeno

HAT: *Hydrogen Atom Transfer*

HUVEC: *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*

IDL: *Intermediate-Density Lipoprotein*

LDL: *Low-Density Lipoprotein*

LPS: lipopolisaccaride

MAG: magnololo
MDA: malondialdeide
MIR: miricetina
mm-LDL: *minimally modified Low-Density Lipoprotein*
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro
NAC: *N*-acetilcisteina
NF- κ B: *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
NO: ossido nitrico
OLE: oleuropeina
ORAC: *Oxygen Radical Absorbance Capacity*
ox-LDL: *oxidized Low-Density Lipoprotein*
PBS: tampone fosfato
pD₂: -log EC₅₀
Pen/Strep: penicillina/streptomicina
PheO[·]: radicale fenolico (fenossile)
PheOH: antiossidante fenolico
R³-IGF-1: *Recombinant human analog of Insulin-like Growth Factor 1*
rhEGF: *recombinant human Epidermal Growth Factor*
rhFGF-b: *recombinant human Fibroblast Growth Factor – basic*
ROO[·]: anione perossile
ROO[·]: radicale perossile
ROOH: idroperossido
ROS: specie reattive dell'ossigeno
SET: *Single Electron Transfer*
SIL: silibina
SOD: superossido dismutasi
SR: *Scavenger Receptor*
TBA: acido tiobarbiturico
TBARS: *ThioBarbituric Acid Reactive Substances*
TCA: acido tricloroacetico
TEAC: *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*
TLC: cromatografia su strato sottile
TNF- α : *Tumor Necrosis Factor-alpha*
VCAM: *Vascular Cell Adhesion Molecule*
VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*
VLDL: *Very Low-Density Lipoprotein*

1. INTRODUZIONE

1.1 I radicali liberi e gli antiossidanti

In ogni cellula dell'organismo umano avvengono processi biochimici che consumano ossigeno per produrre energia. Tuttavia, dal processo vitale di utilizzo dell'ossigeno derivano dei prodotti secondari "di scarto" potenzialmente dannosi: i radicali liberi.

I radicali liberi si possono definire come specie chimiche dotate di uno o più elettroni spaiati e capaci di esistere in maniera indipendente (Halliwell et al., 1999); rappresentano quindi molecole particolarmente instabili e chimicamente reattive, in grado di contribuire in maniera significativa alla patogenesi di numerose disfunzioni di tipo cronico e degenerativo, quali l'infiammazione, l'aterosclerosi, il danno cardiaco, l'ischemia, il diabete mellito ed il cancro (Shu-Jing Wu et al., 2008). I radicali possono essere prodotti da fattori esogeni (radiazioni ionizzanti, inquinamento ambientale, fumo di sigaretta, diete sbilanciate, alcool, radiazioni solari ed esposizione a xenobiotici di diversa natura) o da meccanismi endogeni, come risultato di processi biologici e metabolici (tra cui la respirazione mitocondriale, l'attività enzimatica, la fagocitosi o il metabolismo degli acidi grassi polinsaturi). I radicali maggiormente diffusi e più direttamente coinvolti nel danno organico appartengono alla famiglia delle specie reattive dell'ossigeno (ROS); i più importanti comprendono l'anione superossido (O_2^-), il radicale idrossile (OH), il perossido di idrogeno (H_2O_2) e l'ossigeno singoletto (1O_2), potenzialmente responsabili del danno cellulare mediante perossidazione dei lipidi di membrana, lesioni al DNA, modificazioni a carico di proteine e carboidrati ed alterazioni dell'omeostasi ionica.

La formazione di radicali è limitata dall'esteso sistema antiossidante di cui dispone il nostro organismo: in condizioni normali infatti, lo stress ossidativo "basale" permane a livelli tali da non arrecare danni significativi a livello cellulare e tissutale. I meccanismi di difesa possono essere di due tipi: enzimatici e non enzimatici. I primi comprendono la superossido dismutasi (SOD), la catalasi e la perossidasi; tra i componenti di natura non enzimatica si possono citare, tra i tanti, diversi antiossidanti endogeni quali l'acido urico, la bilirubina, l'acido lipoico, l'ubichinolo e numerose proteine chelanti di specie metalliche, quali l'albumina, la ferritina, la transferrina e la ceruloplasmina (Prior et Guohua, 1999). Anche la nutrizione svolge un ruolo importante nel mantenere l'efficacia delle difese endogene: tra gli antiossidanti di origine alimentare vanno menzionati i flavonoidi, i polifenoli in genere e vitamine quali l' α -tocoferolo, l'acido ascorbico e i carotenoidi (Prior et Guohua, 1999).

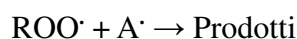
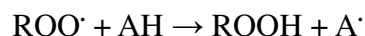
Gli antiossidanti sono sostanze chimiche con un basso potenziale di riduzione, indice di una

maggior capacità di donare idrogeno o elettroni e quindi di ridurre le specie reattive dotate di elettroni spaiati (ISTISAN, 2005). Il meccanismo antiossidante presuppone che la forma radicalica di tali molecole, una volta ossidate, sia non reattiva o scarsamente reattiva nei confronti delle altre molecole, prevenendo o inibendo quindi la propagazione “a catena”, tipica dei processi radicalici.

In base al diverso meccanismo d'azione, gli antiossidanti possono essere suddivisi in due classi principali, di seguito elencate.

- Tipo I: *metal scavengers*. Sono molecole che prevengono la formazione di radicali liberi agendo soprattutto da agenti chelanti dei metalli; il loro meccanismo si basa sulla riduzione dell'energia di attivazione delle reazioni nella fase di iniziazione dell'ossidazione lipidica. Esempi sono l'acido etilendiamminotetraacetico (EDTA), l'acido citrico e l'acido ascorbico.
- Tipo II: *chain breakers*. Sono molecole facilmente ossidabili che intrappolano i radicali presenti nel sistema, responsabili della propagazione della reazione a catena. Gli antiossidanti di questo tipo possono disattivare le specie radicaliche tramite due meccanismi fondamentali: per trasferimento di un atomo di idrogeno (*Hydrogen Atom Transfer*, HAT) o per trasferimento di un singolo elettrone (*Single Electron Transfer*, SET).

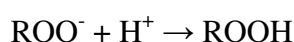
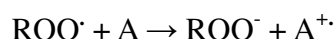
Per quanto riguarda i primi (HAT), possiamo rappresentare lo schema di reazione come segue:



dove AH indica l'antiossidante, A \cdot il radicale che da esso si origina per trasferimento di idrogeno, ROO \cdot il radicale perossile responsabile della propagazione della catena ossidativa ed ROOH l'idroperossido formato come prodotto di reazione del radicale perossile. E' importante notare che in base a questa sequenza di reazioni una molecola di antiossidante riesce ad intrappolare due unità di perossile. Le reazioni HAT sono indipendenti dal solvente e dal pH del mezzo e, generalmente, avvengono secondo cinetiche rapide, concludendosi nel

giro di qualche minuto (Prior et al., 2005; Ndhlala et al., 2010).

Per quanto riguarda gli antiossidanti che agiscono per trasferimento elettronico (SET), si tratta di molecole ricche di elettroni che, pur non possedendo idrogeni facilmente trasferibili, sono ugualmente in grado di interrompere la catena di ossidazione. Queste, infatti, agiscono trasferendo un elettrone al radicale perossile per trasformarsi in radicale catione, secondo lo schema seguente:



Si forma quindi un anione perossile (ROO^-) e un radicale catione (A^+) della molecola coinvolta.

Esempi di antiossidanti interruttori di catena sono il butilidrossianisolo (BHA), il butilidrossitoluene (BHT), il propilgallato, i tocoferoli ed i fenoli.

In natura i limiti tra tali classi di antiossidanti non sono così netti, sia perché il meccanismo d'azione di alcune specie antiossidanti non è stato ancora ben definito, sia perché esistono sostanze, quali i composti fenolici, che possono comportarsi sia da *metal scavengers* sia da *chain breakers* (Cuvelier, 1997).

Nei tessuti, oltre ad essere intermedi di reazioni enzimatiche e chimiche, i radicali svolgono anche la funzione di molecole segnale; rappresentano dunque un'importante ruolo di mediazione per l'omeostasi tissutale, tale da renderli necessari per il corretto funzionamento cellulare. Recenti studi hanno messo in luce come le specie reattive dell'ossigeno siano coinvolte nella regolazione redox-dipendente di numerose funzioni cellulari, tra le quali il metabolismo e la risposta a segnali di stress o di crescita; l' H_2O_2 , appartenente alla famiglia dei ROS, è prodotto dai mitocondri mediante un enzima specializzato per modulare i processi di crescita e morte cellulare (Giorgio et al., 2007).

La produzione, la trasformazione ed il metabolismo dei radicali sono processi finemente regolati nei tessuti, ed un loro malfunzionamento può portare all'instaurarsi di un danno tissutale di tipo infiammatorio. La cronicizzazione del fenomeno infiammatorio, a sua volta, rappresenta una delle principali cause che predispongono al deterioramento cellulare, allo sviluppo di patologie neoplastiche ed all'esordio di malattie neurodegenerative e cardiovascolari. Questo è ciò che si verifica quando nel tessuto o nella cellula la regolazione dell'omeostasi dei radicali non funziona correttamente e si instaura una situazione di stress

dovuta ad un'aumentata presenza di radicali ossidanti. In questo caso si parla di *stress ossidativo*, ad indicare una condizione di sbilanciamento verso l'ossidazione del tessuto, misurabile dalla comparsa di specie ossidate e/o dalla diminuzione dei livelli endogeni di riducenti (ISTISAN, 2005).

Si deve inoltre osservare che lo stress ossidativo assolve anche ad importanti funzioni fisiologiche, come meccanismo utile per inviare segnali biochimici: il perossido di idrogeno è biosintetizzato da uno specifico enzima e avrebbe un ruolo determinante di molecola-segnale nei processi di apoptosi per la difesa ad insulti di natura infettiva.

La cronicizzazione dello stress ossidativo, al contrario, rappresenta una condizione di rischio per l'esordio di processi patologici. E' oramai nota la correlazione tra numerose patologie e le alterazioni dello stato ossidoriduttivo nella cellula; tali alterazioni possono rappresentare un ruolo patogenetico o, al contrario, esserne la diretta conseguenza (ISTISAN, 2005). Nel primo caso, la produzione di specie pro-ossidanti (o l'attenuazione dei sistemi antiossidanti) altera morfologicamente e funzionalmente la fisiologia cellulare, portando ad un maggiore rischio di modificazioni dei processi vitali della cellula e dell'omeostasi dei tessuti ed aumentando, di fatto, la probabilità di insorgenza di fenomeni patologici; nel secondo caso, le modificazioni redox a livello cellulare possono essere secondarie ad alcuni processi patologici (infezioni virali, o trattamenti farmacologici in campo oncologico, ad esempio), e possono essere ricercate come utile *biomarker* di progressione della malattia.

In tal senso, il trattamento con antiossidanti può rappresentare un supplemento importante non tanto a fini strettamente terapeutici, ma piuttosto per migliorare lo stato di salute e la qualità di vita degli individui.

La nostra attenzione si è principalmente focalizzata sulle ripercussioni del danno radicalico nei confronti delle LDL e delle cellule endoteliali della parete arteriosa dei vasi; tale situazione rappresenta, infatti, un punto cruciale nello sviluppo della reazione infiammatoria cronica dell'intima vascolare alla base dell'aterogenesi.

1.2 L'aterosclerosi

Le malattie cardiovascolari rappresentano a tutt'oggi la prima causa di morte a livello mondiale: nel 2008 l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha stimato quasi 18 milioni di decessi, pari al 30% di tutti i decessi documentati, con un'incidenza particolarmente marcata

nei Paesi a basso e medio reddito (WHO, *Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control*, 2011).

In Europa, le patologie cardiovascolari sono all'origine di oltre quattro milioni di decessi ogni anno (pari al 47% di tutti i decessi registrati), con un impatto economico che raggiunge i 196 miliardi l'anno, ripartiti tra costi di assistenza sanitaria (54%), conseguente perdita di produttività nei settori occupazionali (24%) e costi relativi a trattamenti terapeutici informali (22%) (*European Cardiovascular disease Statistics*, 2012).

Anche il quadro nazionale conferma l'andamento generale, con un'incidenza del 44% sulla totalità dei decessi. Fra le prime cause di mortalità sono riportate la cardiomiopatia ischemica (28%) e gli eventi cerebrovascolari (13%), collocati al terzo posto per rilevanza dopo le malattie tumorali (*Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute, ISS*).

Le patologie cardiovascolari sono causa non solo di decesso, ma anche di una significativa compromissione della qualità di vita di chi ne è colpito in maniera non letale – con importanti ricadute sulle risorse assistenziali e farmaceutiche. In Italia la prevalenza di cittadini affetti da invalidità cardiovascolare è pari al 4,4 %; il 23,5% della spesa farmaceutica italiana è destinata a farmaci che agiscono sul sistema cardiovascolare (*Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute, ISS*).

L'aterosclerosi è una patologia infiammatoria cronico-degenerativa che coinvolge le arterie di grande e medio calibro e che si caratterizza per la presenza di *ateromi*, ossia di formazioni della parete vascolare costituite da tessuto fibroso e lipidi – soprattutto colesterolo e suoi esteri – liberi ed endocellulari, in proporzioni variabili.

Tutte le età possono esserne colpite; le lesioni aterosclerotiche conclamate si osservano tuttavia nell'adulto, per farsi sempre più estese e gravi con il progredire degli anni. Il genere maschile risulta più frequentemente e severamente colpito del femminile, almeno fino al periodo della menopausa (fra 45 e 55 anni la mortalità da malattia coronario-sclerotica nei maschi è cinque volte superiore che nelle femmine). Dopo la menopausa l'incidenza è simile nei due sessi, pur restando più elevata in quello maschile.

Il processo aterogenico si può definire multifattoriale: numerosi infatti sono i fattori di rischio che possono concorrere all'insorgenza della malattia. Alcuni fattori di rischio incidono sulla malattia sistemica (e vengono pertanto definiti “generalì”), mentre altri si riflettono quasi esclusivamente sulla sede in cui l'aterosclerosi si esprime con maggiore gravità (“localì”). Fra i primi, sono comunemente considerati gli stati iper(dis)lipidemici – sia correlati all'apporto

dietetico che ad alterate condizioni endogene – e i disturbi del metabolismo, come nel caso del diabete, dell'iperuricemia e di alcune enzimopatie; l'obesità, il fumo di sigaretta, l'iperomocisteinemia e l'ipertensione. Fra i fattori locali vanno invece menzionate le radiazioni ionizzanti per le aree sottoposte a terapia radiante, le arteriti croniche, o particolari condizioni di stress emodinamico accentuato. E' comunque ammessa una predisposizione familiare all'aterosclerosi e, in alcune condizioni, una vera e propria ereditarietà ad acquisire la malattia in forma accelerata (Bersot, 2011).

Gli eventi iniziali che scatenano l'aterogenesi risiedono principalmente nel danno endoteliale e nell'accumulo di lipoproteine a bassa densità (LDL) nell'intima delle arterie. Tra i fattori che predispongono allo sviluppo della lesione endoteliale troviamo lo *stress emodinamico*, ovvero l'attrito che esercita la corrente sanguigna sulla superficie vasale, particolarmente accentuato in corrispondenza delle ramificazioni e delle curvature dei vasi.

L'accumulo di LDL è invece promosso da una situazione di ipercolesterolemia, oltre che da un aumento della permeabilità endoteliale danneggiata e dal legame delle lipoproteine con costituenti extracellulari dell'intima (soprattutto proteoglicani), che ne aumentano il tempo di residenza *in loco*. Ne deriva un'aumentata inclusione nell'intima vasale, che favorisce la modificazione ossidativa delle lipoproteine con formazione di idroperossidi, lisofosfolipidi, ossisteroli e prodotti di degradazione degli acidi grassi. Sono possibili anche modificazioni a carico della porzione apoproteica, rappresentate dalla rottura del *backbone* peptidico o dalla sostituzione di specifici residui amminoacidici (Libby, 2005).

Si è osservato che tali processi sono favoriti dalla presenza di un quadro infiammatorio, piuttosto che dall'assenza dei caratteristici sistemi antiossidanti presenti nel plasma: esiste infatti una vera e propria "barriera antiossidante plasmatica", rappresentata soprattutto da residui tiolici (-SH).

In condizioni fisiologiche il *core* lipidico delle LDL è costituito da colesterolo esterificato e trigliceridi, mentre lo strato esterno è costituito da colesterolo non esterificato e fosfolipidi (tra cui la fosfatidilcolina) ed una molecola proteica, l'apolipoproteina B100. A seguito della perossidazione radicalica degli acidi grassi insaturi, le LDL vanno incontro ad una reazione a catena che porta alla formazione di idroperossidi del colesterolo esterificato e della fosfatidilcolina (Yoshida et al., 2010).

Il processo di ossidazione delle LDL prevede due fasi principali; durante la fase iniziale, le modificazioni ossidative dei lipidi coinvolgono solo in minima parte l'ApoB100, o non la alterano affatto. Tali LDL sono definite "minimamente modificate" (*mm-LDL*) e mantengono

l'affinità per i recettori delle LDL; presentano una piccola carica negativa, possono attivare segnali anti-apoptotici ed indurre modificazioni infiammatorie accompagnate da un aumento di chemochine e citochine (Fig. 1). Il reclutamento di cellule dell'infiammazione può scatenare l'espressione di un'estesa varietà di citochine, in grado di amplificare l'ossidazione delle mm-LDL e portare successivamente alla formazione delle LDL ossidate (*ox-LDL*) (Yoshida et al., 2010).

Le mm-LDL sono potenti modulatori dell'infiammazione, in grado di innescare risposte immunitarie sia innate che adattative: possono pertanto indurre l'espressione di diverse molecole d'adesione per monociti e linfociti verso il sito della lesione arteriosa (Yla-Herttuala et al., 1994; Shaw et al., 2000). In queste condizioni i monociti circolanti penetrano attraverso le giunzioni intracellulari a livello intimale, grazie al segnale mediato dalle citochine e dallo stimolo chemiotattico promosso dalle stesse mm-LDL (Gerrity, 1981; Osterud et Bjorklid, 2003). I macrofagi aumentano l'espressione di uno specifico recettore, chiamato *scavenger* (SR), in grado di legare e successivamente fagocitare le *ox-LDL*. Diversamente dalle mm-LDL, le *ox-LDL* presentano affinità esclusivamente per recettori SR, i quali non sono sotto-regolati dai livelli di colesterolo e continuano a veicolare l'entrata di lipoproteine ossidate nei macrofagi anche quando i livelli intracellulari di colesterolo sono già elevati (Brown et al., 1980; Steinberg, 1997; Suzuki et al., 1997). Maggiore è la concentrazione di *ox-LDL* nell'intima vascolare, maggiore sarà l'espressione degli SR sulla membrana dei macrofagi (Yoshida et al., 2010).

Il processo di endocitosi recettore-mediata porta alla trasformazione dei macrofagi nelle cosiddette *foam cells* ("cellule schiumose"), nelle quali il citoplasma è infarcito di *droplets* lipidici (Fig. 1). Un agglomerato vasale di *foam cells* rappresenta la forma più precoce di lesione vascolare ed è definita "*fatty spot*"; quest'ultima può dare inizio alla formazione della stria lipidica (Ross, 1993).

La successiva morte delle cellule schiumose comporta un'ulteriore secrezione di mediatori dell'infiammazione e fattori di crescita che inducono la migrazione e la proliferazione delle cellule muscolari lisce dalla media nell'intima, dove si accumulano, si differenziano ed acquisiscono un fenotipo capace di secernere matrice extracellulare; in tal caso determinano la trasformazione della stria lipidica in una lesione ateromatosa avanzata. Alla crescita delle lesioni può contribuire anche l'adesione di piastrine all'intima denudata e il formarsi di trombi intramurali, conseguenti ad erosione o ad ulcerazione delle placche aterosclerotiche.

Nella patogenesi della malattia, l'ossidazione delle LDL rappresenta un passaggio chiave per la formazione delle placche ateromatose (Fig. 1): le modificazioni ossidative a carico delle

lipoproteine ne alterano le proprietà biologiche aumentandone il potere aterogeno e la tossicità.

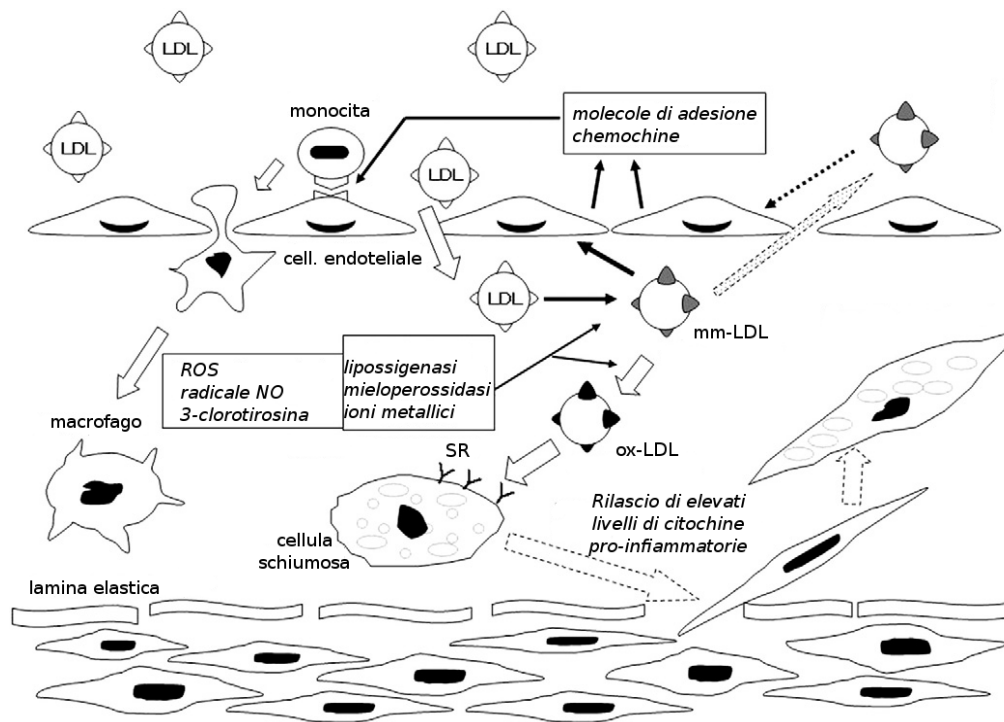


Figura 1. Meccanismi vascolari coinvolti nell'ossidazione delle LDL e nella formazione delle cellule schiumose. Le LDL che penetrano nell'intima vascolare possono essere ossidate da enzimi quali la lipossigenasi e la mieloperossidasi, in presenza o in assenza di ioni metallici. Le LDL minimamente modificate (*mm-LDL*) presentano una scarsa affinità per i recettori *scavenger* macrofagici (SR) e possono retrodiffondere nel torrente circolatorio. Tali LDL minimamente modificate possono stimolare l'espressione di molecole di adesione e chemochine. Le LDL ossidate (*ox-LDL*) possono essere fagocitate dai macrofagi mediante *scavenger receptors*, portando alla formazione delle cellule schiumose; adattato da Yoshida et al., 2010.

Sulla base di tali considerazioni si è sviluppata la “teoria delle modificazioni ossidative”, secondo la quale l'ossidazione delle LDL nello spazio intimale costituisce un contributo significativo all'esordio ed alla progressione dell'aterosclerosi. Esistono numerose evidenze che supportano tale teoria (Halliwell et al., 1999; Yoshida et al., 2010):

1. l'identificazione di ox-LDL *in vivo*;
2. la presenza di colesterolo ossidato, lipidi ossidati, isoprostani F2 e prodotti derivati dalla degradazione perossidativa (come il 4-idrossinonenale e la malondialdeide) nelle lesioni aterosclerotiche umane ed animali;
3. la capacità delle ox-LDL di portare alla formazione di cellule schiumose in modelli sperimentali *in vitro*;

4. la stretta somiglianza fra le LDL isolate dalle placche ateromatose e le LDL ossidate ottenute *in vitro*;
5. la presenza di anticorpi che riconoscono le ox-LDL nel plasma di pazienti affetti da malattia coronarica. La concentrazione di anticorpi ha dimostrato una correlazione positiva con la progressione aterosclerotica a carico delle arterie carotidee, misurata mediante tecniche di tomografia assiale computerizzata;
6. l'evidenza di dati epidemiologici che supportano l'azione protettiva di antiossidanti inibitori della perossidazione lipidica (specialmente l' α -tocoferolo) nei confronti dell'aterosclerosi.

Il bersaglio principale di tali processi ossidativi è rappresentato dai doppi legami degli acidi grassi insaturi; una volta iniziata la lipoperossidazione, si innesca una reazione a catena che porta all'amplificazione del numero di lipoperossidi associato ad un riarrangiamento dei doppi legami degli acidi grassi, con la formazione di dieni coniugati (Esterbauer et al., 1992).

1.3 Metaboliti secondari

Il regno vegetale rappresenta la principale fonte di composti antiossidanti; questi agiscono rallentando o contrastando la diffusione e la propagazione di reazioni radicaliche potenzialmente dannose per macromolecole come il DNA, gli zuccheri, i lipidi e le proteine. Gli antiossidanti vegetali più rappresentativi appartengono alla famiglia dei polifenoli, una classe di metaboliti secondari estremamente diversificata grazie alle numerose reazioni di idrossilazione, glicosilazione, metilazione e polimerizzazione che avvengono durante la loro biosintesi. Questi fitocomposti possono essere suddivisi in tre grandi gruppi, a seconda della loro struttura chimica: fenoli ed acidi fenolici, derivati dell'acido idrossicinnamico e flavonoidi (Manach et al., 2004).

I polifenoli sono gli antiossidanti più abbondanti nella nostra dieta e sono presenti soprattutto in frutta, ortaggi, cereali, olive, legumi secchi, cioccolato e bevande come tè, caffè e vino. Nonostante la loro ampia distribuzione, gli studi condotti sugli effetti biologici dei polifenoli sono iniziati solamente negli ultimi anni. La loro struttura chimica di riferimento è caratterizzata da numerosi gruppi ossidrilici dislocati come sostituenti laterali su anelli

aromatici, ma possono essere considerati polifenoli anche composti con un solo anello aromatico (D'Archivio et al., 2007).

L'azione antiossidante dei polifenoli è principalmente di tipo *chain-breaker*: prevede la cessione di un radicale idrogeno secondo lo schema di reazione riportato in Fig. 2:

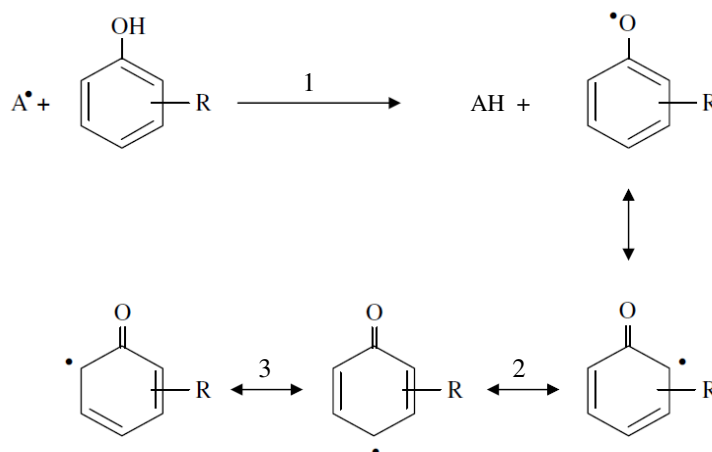


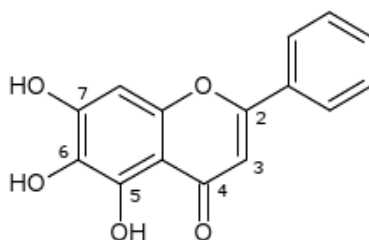
Figura 2. Meccanismo d'azione di uno *scavenger* polifenolico. Da Gregoris et al., 2010.

Si forma un radicale fenossile che risulta molto meno reattivo della specie A', grazie alla delocalizzazione dell'elettrone spaiato sull'anello aromatico; ciò consente alla molecola di partecipare molto più lentamente alle reazioni radicaliche. La reazione (1) è tanto più spostata verso destra quanto maggiore è la capacità del polifenolo a cedere un H'. Tale attitudine può essere determinata mediante:

1. l'energia di dissociazione del legame O-H: la tendenza a donare la specie H' aumenta al diminuire dell'energia di dissociazione di legame, che risulta influenzata dalle caratteristiche elettrochimiche dei sostituenti laterali presenti sulla molecola (ad esempio, la presenza di un sostituito elettron-attrattore favorisce la dissociazione di legame).
2. La posizione del legame -OH: è necessaria una buona mobilità del radicale A' verso il gruppo -OH perché avvenga la reazione tra i due componenti;
3. la stabilità del radicale fenossilico: nei polifenoli l'elettrone spaiato sull'ossigeno viene delocalizzato sull'anello aromatico. Anche in questo caso, la stabilità chimica è influenzata dai sostituenti presenti sull'anello: sostituenti elettron-attrattori tendono ad attrarre l'elettrone spaiato e ad aumentarne la delocalizzazione (Laguerre et al., 2007).

I composti naturali per i quali è stato eseguito lo studio antiossidante sono: baicaleina (estratta da *Scutellaria baicalensis* G.), (-)-bilobalide (*Ginkgo biloba* L.), eupatorina (*Eupatorium semiserratum* D.C.), galangina (propoli), magnololo (*Magnolia officinalis* L.), miricetina (*Myrica rubra* S.Z.), oleuropeina (*Olea europea* L.) e silibinina (*Silybum marianum* L.).

1. **Baicaleina** (estratta da *Scutellaria baicalensis* G.)



La baicaleina (5,6,7-triidrossiflavone, PM 270.24 g/mol) è un flavone isolato dalle radici di *Scutellaria baicalensis* (Fam. Labiateae), un'erba perenne di altezza variabile tra i 20 ed i 60 cm diffusa soprattutto nelle regioni dell'est asiatico. E' una delle cinquanta erbe fondamentali della Medicina Tradizionale Cinese, ampiamente utilizzata come rimedio antinfiammatorio ed antipertensivo, nel trattamento di disturbi cardiovascolari e come agente antibatterico ed antivirale con minimi effetti collaterali (Li-Weber, 2009). Studi presenti in letteratura ne riportano la capacità di inibire l'aggregazione piastrinica, di diminuire la produzione di endotossine e di attenuare il danno da riperfusione nei tessuti ischemici (Havsteen, 1983; Shen et al., 2003); altri studi hanno messo in evidenza la capacità della baicaleina di inibire isoforme diverse di lipossigenasi (Lin et al, 1996), di bloccare la biosintesi dei leucotrieni ed il rilascio di enzimi lisosomiali. E' stato anche suggerito che la baicaleina possa inibire i processi angiogenici bloccando la proliferazione delle cellule muscolari lisce sottoposte a danno meccanico *in vitro* (Peng et al., 2008).

Numerosi principi attivi sono stati isolati dalle radici di *Scutellaria*: baicaleina, baicalina, wogonina e β -sitosterolo sono considerati i più rappresentativi.

La *Scutellaria* è anche una delle sette erbe che compongono il *sho-saiko-to*, uno dei più famosi rimedi fitoterapici del Giappone, impiegato nel trattamento di alcune patologie croniche del fegato; studi clinici presenti in letteratura hanno infatti evidenziato la capacità di prevenire il danno epatico acuto in modelli murini di epatopatia indotta da tetracloruro di

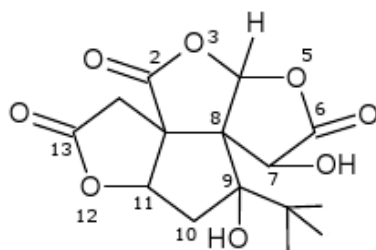
carbonio (Huang et al., 2012) e di impedire la trasformazione della cirrosi epatica in epatocarcinoma (Capasso et al., 2006).

Dal punto di vista chimico la baicaleina rappresenta la porzione agliconica della baicalina; è dotata di quattro legami a rotazione libera, cinque accettori e tre donatori di legami idrogeno. La sostanza si presenta in forma di polvere gialla solubile in alcol etilico, metanolo, etere, acetone, etile acetato ed acido acetico glaciale riscaldato.

Recenti studi hanno messo in evidenza alcune interessanti potenzialità antitumorali della baicaleina, da sola o in associazione con altri agenti, nei confronti del cancro al seno (Zhou et al., 2009; Wang et al., 2010), del carcinoma epatocellulare (Chiu et al., 2011; Liang et al., 2012), dell'adenocarcinoma pancreatico (Donald et al., 2012), del cancro alla vescica (Li et al., 2012), della leucemia (Himeji et al., 2007; Otsuyama et al., 2007; Wang et al., 2009), del cancro al colon (Taniguchi et al., 2008; Huang et al., 2012) e dell'osteosarcoma (Zhang et al., 2013), promuovendo l'apoptosi delle cellule tumorali per probabile attivazione delle caspasi (soprattutto caspasi-3 e caspasi-9), accompagnata dalla sotto-regolazione di Bcl-2 e dall'aumento dei livelli di Bax. Sono emerse inoltre alcune evidenze sperimentali circa la capacità *in vitro* della baicaleina nel ridurre i fenomeni di adesione, migrazione ed invasione cellulare, che presuppongono una potenziale attività antimetastatica (Zhang et al., 2013). Alcuni gruppi di ricerca hanno evidenziato la capacità protettiva di baicaleina nei confronti del danno radicalico e della rottura del DNA indotta dalle specie reattive dell'ossigeno grazie alle sue potenzialità antiossidanti e mediante l'attivazione di sistemi endogeni di riparazione (Kim et al., 2012).

Altri studi suggeriscono alcuni effetti della baicaleina nel miglioramento di sintomi clinici associati a patologie neurodegenerative, come il morbo di Parkinson. L'efficacia neuroprotettiva sembra sia strettamente correlata alle funzioni antinfiammatorie ed antiossidanti, oltre alla capacità di proteggere i mitocondri, di inibire la neurotossicità indotta dal glutammato, promuovere la crescita nervosa ed inibire l'attività di aggregazione proteica dell' α -sinucleina – considerata uno dei fattori critici alla base della neurodegenerazione nel morbo di Parkinson (Caruana et al., 2012; Yu et al., 2012).

2. (-)-Bilobalide (estratta da *Ginkgo biloba* L.)



La bilobalide (PM 326,30 g/mol) è un lattone sesquiterpenico estratto dalle foglie di *Ginkgo biloba* (Fam. Ginkgoaceae). Dal punto di vista biosintetico, è ottenuto dalle vie del mevalonato e del metileritritolo fosfato a partire dal geranyl-geranyl pirofosfato ed è considerato il composto terpenoide più abbondante delle foglie di *Ginkgo*; presenta tre legami a rotazione libera, otto accettori e due donatori di legami idrogeno.

Il *Ginkgo biloba* è una pianta originaria della Cina e considerata un fossile vivente, in quanto unica specie rappresentativa della famiglia delle Ginkgoaceae. È una pianta arborea che raggiunge un'altezza di 30 – 40 metri, con una chioma larga fino a 9 metri, piramidale nelle giovani piante e ovale negli esemplari più vecchi. Le foglie, che in autunno assumono una colorazione giallo vivo molto decorativa, hanno una forma tipica a ventaglio leggermente bilobata (da cui il nome della specie).

Questa droga non è menzionata nelle Farmacopee occidentali, mentre è presente in quella cinese e in altre Farmacopee orientali. I principali fitocostituenti appartengono alle classi dei glicosidi flavonici, diflavoni, diterpeni, acidi ginkgolici ed antocianosidi. I flavonoidi, a livello della rete capillare, diminuiscono la permeabilità ed aumentano il tono della parete vasale; per questa loro attività, le foglie di *Ginkgo* vengono utilizzate nei disturbi della circolazione periferica, in particolare nell'insufficienza circolatoria cerebrale (Capasso et al., 2006). L'estratto delle foglie ha dimostrato molte altre proprietà farmacologiche, tra cui un effetto di potenziamento della memoria e dell'apprendimento, l'attività antiossidante, l'attività anti-PAF (fattore di attivazione piastrinica) e le proprietà antischemiche. Oltre a questi, sono emersi anche effetti benefici di potenziamento della neuroplasticità, ovvero dell'abilità sinaptica nel subire adattamenti strutturali in relazione a specifiche richieste cognitive funzionali o a seguito di stati patologici rappresentati da demenza ed invecchiamento neuronale (Müller et al., 2012).

EGb761 è un estratto standardizzato delle foglie di *Ginkgo biloba* frequentemente utilizzato in studi sperimentali e dotato di proprietà antiradicaliche; contiene approssimativamente il 24% di glicosidi flavonici (rappresentati principalmente da quercetina, kaempferolo ed

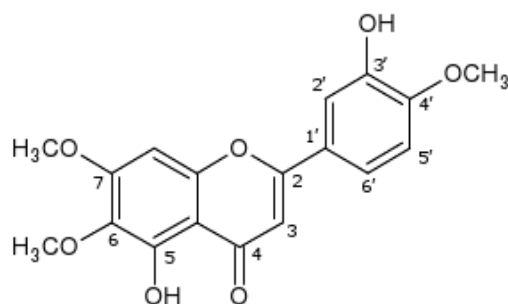
isoramnetina) ed il 6% di lattoni terpenici (2,8 – 3,4% ginkgolidi A, B e C e 2,6 – 3,2% bilobalide). Altri costituenti includono proantocianidine, glucosio, ramnosio, acidi organici ed acidi ginkgolici. EGb761 ha mostrato significativi effetti nel promuovere la vasodilatazione e migliorare la circolazione arteriosa, venosa e capillare; presenta attività anti-PAF inibendo l'aggregazione piastrinica e prolungando il tempo di sanguinamento. E' disponibile in Europa come estratto vegetale dagli anni novanta, ed attualmente è stato approvato in diversi Paesi come integratore alimentare destinato al trattamento sintomatico della demenza (*Drugs in R&D*, 2003), come componente di un approccio terapeutico finalizzato al trattamento dell'Alzheimer, della demenza vascolare e delle demenza di tipo misto.

Alcuni studi condotti *in vivo* su ratti obesi insulino-resistenti hanno evidenziato un ruolo protettivo di EGb761 nello sviluppo dell'aterosclerosi (Lim et al., 2011), riducendo in maniera dose-dipendente i livelli di molecole di adesione ed il grado di adesione dei monociti, oltre a manifestare possibili effetti pro-apoptotici nella massiccia proliferazione di cellule muscolari lisce.

Altri studi confermano l'attività anti-aterosclerotica sulla base delle proprietà antiossidanti ed antinfiammatorie di EGb761, grazie ad una riduzione dell'accumulo di colesterolo trasportato dalle ox-LDL nei macrofagi (associato ad una ridotta espressione di *scavenger receptors SR-A*) e all'aumentato efflusso di colesterolo dallo spazio intimale (mediato da un'aumentata espressione del trasportatore ABCA1 macrofagico) (Tsai et al., 2010), o a seguito della modulazione nell'espressione di VEGF - un importante fattore di regolazione dell'angiogenesi e della permeabilità vascolare coinvolto nella formazione delle cellule schiumose (Liu et al., 2009).

La bilobalide è responsabile di numerosi effetti biologici propri dell'estratto di *Ginkgo biloba*; presenta attività neuroprotettiva, mediante l'inibizione dei processi apoptotici e di morte cellulare neuronale (Kriegelstein et al., 1995; Ahlemeyer et al., 1999; Zhou et al., 2000; Defeudis, 2002; Suzuki et al., 2011), oltre alla capacità di indurre gli enzimi epatici CYP3A1 e CYP1A2 (Deng et al., 2008), che rendono il fitocomposto soggetto a possibili interazioni con altri prodotti vegetali o con farmaci di sintesi.

3. **Eupatorina** (estratta da *Eupatorium semiserratum* D.C.)



L'eupatorina (3',5-diidrossi-4',6,7-trimetossiflavone, PM 344.32 g/mol) è un flavonoide estratto dall'*Eupatorium semiserratum*, una pianta sempreverde della famiglia delle Asteraceae che può raggiungere i cinque metri di altezza. L'eupatorina è anche uno dei flavonoidi contenuti nel "tè di Giava" (*Ortosiphon stamineus*), una delle piante medicinali presenti nella Farmacopea Europea (Capasso, 2006), di cui si sfruttano le proprietà diuretiche e drenanti – sembra per interazione con i recettori renali A1 dell'adenosina - ed antinfiammatorie nel trattamento di cistiti, infiammazioni urogenitali e calcolosi renali. Il "tè di Giava" ha manifestato anche attività ipocolesterolemizzanti e risulta quindi indicato come trattamento coadiuvante nell'ipertensione ed in casi di ipercolesterolemia (Capasso et al., 2009).

L'influenza dell'eupatorina sui parametri pressori è stata valutata anche in un recente studio clinico randomizzato in cieco, finalizzato a valutare i diversi effetti evocati dalla somministrazione dell'estratto di foglie di *O. stamineus*, posto a confronto con il trattamento di idroclorotiazide 12,5 mg in pazienti sottoposti a monoterapia con calcio-antagonisti o ACE-inibitori. Gli esiti dello studio hanno evidenziato una blanda ma significativa attenuazione della pressione sistolica e diastolica nei soggetti trattati con l'estratto, anche se in maniera meno rilevante rispetto al trattamento con idroclorotiazide (Cicero et al., 2012).

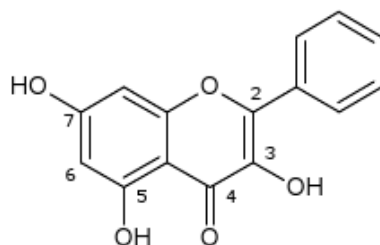
In letteratura sono presenti alcuni studi *in vitro* che evidenziano l'attività citostatica dell'eupatorina nei confronti di diverse linee cellulari umane, tra le quali l'adenocarcinoma della cervice uterina (HeLa), l'adenocarcinoma gastrico (MK-1) ed il cancro al seno (MDA-MB-468), o di linee cellulari murine quali il melanoma (B16F10) e il cancro al colon (26-L5), anche se il meccanismo d'azione non è ancora chiaro; tali osservazioni hanno tuttavia permesso di riscontrare un'elevata selettività dell'eupatorina nell'esercitare l'effetto antiproliferativo verso le cellule tumorali (Dolečková et al., 2012).

Altri studi presenti in letteratura hanno evidenziato la capacità dell'eupatorina e degli estratti di *Ortosiphon stamineus* nel ridurre *in vitro* l'espressione di geni pro-infiammatori quali

l'iNOS, la COX-2 ed il TNF- α e di attenuare la produzione di mediatori dell'inflammatione quali NO e PGE₂; l'eupatorina ha dimostrato anche una soddisfacente attenuazione della risposta infiammatoria indotta da carragenina nel topo, suggerendo interessanti applicazioni farmacologiche anche *in vivo* (Laavola et al., 2012).

Dal punto di vista chimico, l'eupatorina si presenta come polvere cristallina solubile in DMSO (> 10 mg/ml), acqua bollente, alcol e cloroformio; presenta sei legami a rotazione libera, sette accettori e due donatori di legami idrogeno.

4. Galangina (estratta dalla propoli)



La galangina (3,5,7-triidrossiflavone, PM 270.24 g/mol) è un flavonoide estratto dai rizomi di *Alpinia officinarum* e *Alpinia galanga* (Fam. Zingiberaceae), ed è presente nella propoli.

La propoli è un prodotto resinoso di odore aromatico e colore variabile tra il giallo e il verde bruno, raccolto dalle api sui germogli e le cortecce di alcuni alberi, rielaborato ed impiegato dalle stesse per otturare le fessure presenti nell'arnia e per mummificare i corpi di piccoli insetti predatori penetrati nell'alveare. Nella fase di rielaborazione, la propoli viene arricchita enzimaticamente. E' impossibile definire una composizione esatta ed universalmente valida della propoli, in quanto è estremamente variabile a seconda della vegetazione di origine, della stagione in cui viene elaborata e di molti altri fattori. Nel corso di numerosi studi su propoli di varia origine sono stati identificati più di 150 diversi composti, che possono essere suddivisi in cinque grandi categorie:

- resine (45 – 55%);
- cere ed acidi grassi (25 – 35%);
- oli essenziali e sostanze volatili (10%);
- polline (5%);
- composti organici e minerali (5%).

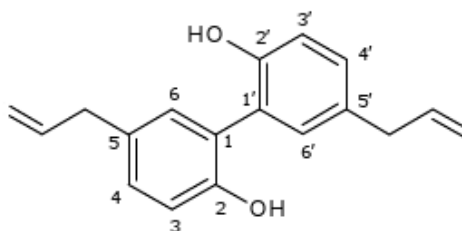
La propoli possiede attività antibatterica, antimicotica, antivirale, cicatrizzante ed immunostimolante, ed i flavonoidi sembrano essere i principali responsabili di tale spettro di attività. La propoli presente in commercio deve contenere non meno del 2% di flavonoidi, espressi come galangina (Capasso et al., 2006).

Accanto alle proprietà batteriostatiche ed antiossidanti, la galangina ha dimostrato effetti antimutagenici ed anticlastogenici (Heo et al., 1996; Sohn et al., 1998). Interessanti potenzialità antiproliferative sono state evidenziate nei confronti di numerosi tipi di tumore, tra i quali la leucemia (Bestwick et al., 2006), il cancro alla prostata (Szliszka et al., 2011), alla mammella (Murray et al., 2006) ed all'esofago (Wang et al., 2009), oltre a manifestare potenzialità pro-apoptotiche nel carcinoma epatocellulare mediante la modificazione del potenziale di membrana mitocondriale e la traslocazione della proteina pro-apoptotica Bax nel mitocondrio, con il successivo rilascio di fattori di induzione apoptotica e di citocromo C nel citosol (Zhang et al., 2010). Ulteriori indagini hanno messo in luce una possibile attività chemiopreventiva della galangina nei confronti del melanoma (Lu et al., 2007; Matsuda et al., 2009).

Grazie all'attività antiossidante, si è dimostrata in grado di modulare l'attività enzimatica e sopprimere la genotossicità di numerosi prodotti chimici (Heo et al., 2001).

Chimicamente, la galangina è un flavone dotato di quattro legami a rotazione libera, cinque accettori e tre donatori di atomi di idrogeno; si presenta come polvere aghiforme di colore giallo tenue solubile in cloroformio e benzene, moderatamente solubile in etanolo ed etere.

5. **Magnololo** (estratto da *Magnolia officinalis* L.)



Il magnololo [4-allil-2-(5-allil-2-idrossifenil)fenolo, PM 266.33 g/mol) è un neolignano ricavato dalla corteccia di *Magnolia officinalis* (Fam. Magnoliaceae), una pianta caducifoglia che può raggiungere i venti metri di altezza. La corteccia viene utilizzata nella Medicina

Tradizionale Cinese, dove è conosciuta col nome di *houpu*; è fortemente aromatica e contiene magnololo ed onochiolo, due composti fenolici che hanno dimostrato proprietà ansiolitiche, antiangiogeniche, antiallergiche ed antiasmatiche (Hunt, 1998). Nella Medicina Tradizionale Cinese l'estratto viene anche utilizzato per il trattamento di disordini mentali, soprattutto di natura depressiva (Watanabe et al., 1983; Nakazawa et al., 2003) e nel trattamento delle trombosi, dei disturbi nervosi e delle malattie gastrointestinali (Messerli, 2002).

Il magnololo ha dimostrato un ampio spettro di effetti antinfiammatori, riferiti alla capacità di inibire la produzione di ossido nitrico (NO) in macrofagi attivati con LPS (Matsuda et al., 2001) o di sopprimere la produzione *in vitro* di citochine in modelli di monociti umani mediante il blocco delle vie di trasduzione di NF- κ B e MAPK (Park et al., 2004).

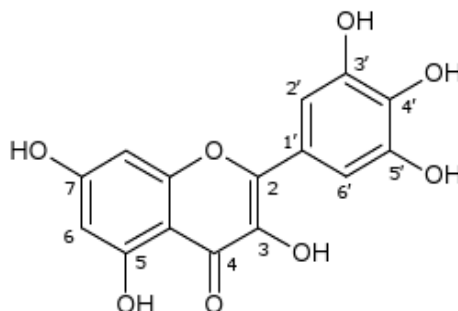
Nell'ambito cardiovascolare ha evidenziato numerosi effetti biologici, tra i quali la capacità di proteggere il muscolo cardiaco nell'infarto e nel danno da ischemia/riperfusion, di promuovere la vasodilatazione coronarica ed inibire i processi di apoptosi miocardica, inibire la proliferazione delle cellule muscolari lisce dei vasi sanguigni, ridurre i processi di adesione endoteliale dei neutrofilo e prevenire l'aggregazione piastrinica e la formazione di trombi intravasali (Ho et al., 2012). Oltre a questi, altri effetti protettivi trovano riscontro nell'attenuazione dei processi di trasduzione di specifiche proteine tirosin-chinasiche e nella diminuita espressione dell'attivatore di trascrizione 3 (STAT3) in cellule endoteliali stimulate con interleuchina 6 (Chen et al., 2006). Le proprietà antinfiammatorie del magnololo sono state associate *in vitro* ed *in vivo* ad un'attenuazione della traslocazione nucleare del fattore NF- κ B indotto da TNF- α e ad una ridotta espressione di molecole di adesione vascolare (VCAM-1), confermando ulteriormente un interessante profilo farmacologico nella prevenzione dell'aterosclerosi (Chen et al., 2002).

Gli studi antitumorali hanno evidenziato interessanti potenzialità antineoplastiche nei confronti di diverse linee cellulari tumorali, tra le quali il cancro del colon, l'epatoma, il fibrosarcoma, il melanoma, il carcinoma a cellule squamose, la leucemia e il cancro alla tiroide (Park et al., 2012).

Altri studi hanno invece riportato effetti antiaritmici in situazioni di occlusione coronarica acuta indotta nel ratto (Tsai et al., 1999), attività antifungina (Bang et al., 2000), attività antiossidante ed epatoprotettiva in ratti con epatopatia indotta da acetaminofene (Chen et al., 2009) e modulazione dei recettori GABA_A, mostrando effetti depressivi sul sistema nervoso centrale (Ai et al., 2001). Si ritiene che l'attività antiossidante sia dovuta al contributo dei sostituenti idrossilici ed allilici sulla struttura bifenolica (Ho et al., 2012). Dal punto di vista chimico, il magnololo è un bifenolo dotato di sette legami a rotazione libera, due accettori e

due donatori di legami idrogeno; si presenta come polvere bianca solubile in DMSO, metanolo ed etanolo.

6. **Miricetina** (estratta da *Myrica rubra* S.Z.)



La miricetina (3,5,7,3',4',5'-esaoidrossiflavone, PM 318.24 g/mol) è un flavone estratto principalmente da *Myrica rubra*, un arbusto sempreverde che può raggiungere i dieci-venti metri di altezza. Di questa pianta sono note le proprietà antiossidanti, antitumorali ed antivirali, dovute soprattutto alla presenza di acido ellagico, tannini ed antociani (Cheng et al., 2003; Bao et al., 2005; Sylvestre et al., 2005; Fang et al., 2006).

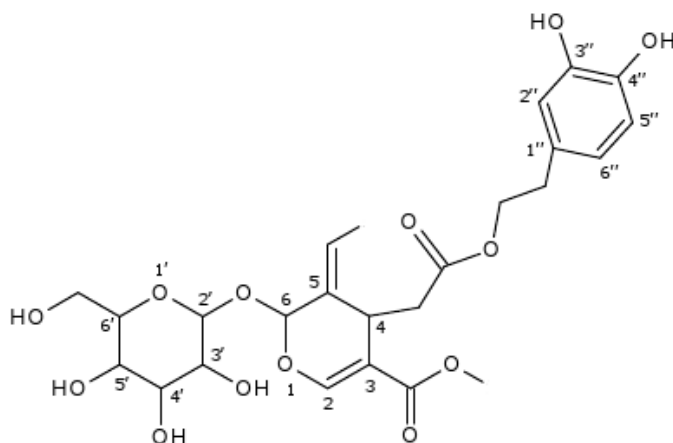
La miricetina si può ritrovare anche in frutta, verdura, bacche, erbe aromatiche e nel vino rosso. In letteratura sono pubblicati studi che ne evidenziano l'attività antinfiammatoria (Wang et al., 2010), oltre ad alcune evidenze cliniche circa l'azione chemiopreventiva nei confronti del cancro alla prostata (Knekt et al., 2002) e al pancreas (Nöthlings et al., 2007). Ne è stata messa in evidenza anche l'attività antiossidante e neuroprotettiva, oltre alla capacità di prevenire l'apoptosi cellulare e la neurodegenerazione (Ong et al., 1997). L'attività antiossidante è stata focalizzata nei confronti di specie radicaliche prodotte sia da sistemi enzimatici sia non enzimatici, soprattutto in relazione a $\cdot O_2^-$ e $\cdot OH$. Il confronto del potenziale antiossidante tra la forma glicosidica e l'aglicone ha messo in luce una maggiore efficienza anti-perossidativa della porzione agliconica (Ong et al., 1997). Tale attività sembra motivata dal particolare assetto strutturale, soprattutto in riferimento ai gruppi ossidrilici laterali, alla presenza del doppio legame in posizione 2,3, al gruppo ossidrilico in posizione 3 e al cheto-gruppo in posizione 4 (Ratty et al., 1988).

Sulla base di tali evidenze, la miricetina è stata oggetto di studi finalizzati a valutarne il carattere protettivo nelle lesioni aterosclerotiche: ha infatti dimostrato di esercitare un potente

effetto inibitorio nei confronti della modificazione ossidativa delle LDL, contravvenendo alla deplezione di α -tocoferolo endogeno presente nelle LDL native (Ong et al., 1997).

La miricetina si presenta come una polvere gialla solubile in alcool; è dotata di sette legami a rotazione libera, otto accettori e sei donatori di legami idrogeno.

7. Oleuropeina (estratta da *Olea Europaea* L.)



L'oleuropeina (PM 540.51 g/mol) è un estere del 2-(3,4-diidrossifenil)etanolo (o idrossitirosolo), un principio amaro isolato dalle foglie dell'ulivo (*Olea europaea*, Fam. Oleaceae) - una pianta medicinale presente nella Farmacopea italiana ed europea. La composizione dell'olio di oliva varia notevolmente in relazione al luogo di coltivazione, ma contiene principalmente gliceridi dell'acido oleico (65-85%). Nell'olio è presente anche un gran numero di composti di diversa natura: steroli, alcoli ed acidi terpenici, e una miscela di composti polari a struttura fenolica costituiti principalmente da acidi fenolici liberi o esterificati. La componente fenolica contribuisce in maniera preponderante al caratteristico aroma e sapore dell'olio e alle spiccate proprietà antiossidanti. In commercio sono disponibili estratti di *Olea europaea* L. titolati al 20% in oleuropeina, principio attivo ad azione vasodilatatrice ed antiossidante. Nella medicina tradizionale italiana le foglie essiccate di olivo vengono utilizzate come rimedio per il trattamento dell'ipertensione, sebbene non esistano ancora studi clinici randomizzati che ne confermino l'efficacia. La Commissione E tedesca, pur riportando che le foglie di olivo possiedono proprietà antispastiche, broncodilatatrici, ipotensive, coronarodilatatrici, antiaritmiche, antipiretiche, ipoglicemiche e diuretiche, non giustifica il loro uso come antipertensivo (Capasso et al., 2009).

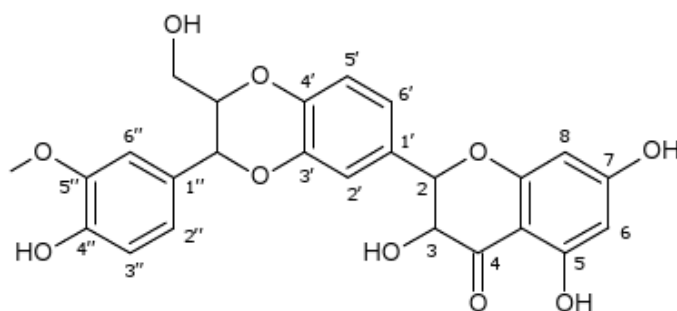
L'oleuropeina e il suo metabolita, l'idrossitirosolo, presentano una significativa attività antiossidante sia *in vivo* che *in vitro* e sono responsabili del sapore amaro e pungente dell'olio extra-vergine di oliva appena estratto. Le preparazioni a base di oleuropeina sono state proposte per diversi effetti farmacologici, tra i quali l'azione antiaterogena (Carluccio et al., 2003), batteriostatica e battericida *in vitro* (Saija et al., 2000), antivirale (Micol et al., 2005), ipotensiva (Khayyal et al., 2002) ed antidiabetica (Jemai et al., 2009); molte di queste proprietà sembrano essere associate al carattere antiossidante dell'oleuropeina, che ha dimostrato di possedere interessanti potenzialità antitumorali *in vitro* inibendo la proliferazione cellulare.

Negli studi condotti sul modello vascolare, l'oleuropeina in forma agliconica e glicosidica ha dimostrato una buona capacità nel ridurre l'espressione di molecole di adesione per i monociti, uno dei passaggi chiave che interessano l'esordio dei fenomeni aterosclerotici (Carluccio et al., 2003), e di prevenire l'aggregazione piastrinica, l'ossidazione delle LDL e la produzione di lipossigenasi ed eicosanoidi (Beauchamp et al., 2005).

Altri studi documentano che l'oleuropeina evoca effetti neuroprotettivi nei confronti del danno cerebrale da ipossia/riossigenazione, nell'ischemia cerebrale e nell'invecchiamento neuronale (Gonzalez-Correa et al., 2007; Mohagheghi et al., 2010; Pitozzi et al., 2010).

Dal punto di vista chimico l'oleuropeina possiede diciassette legami a rotazione libera, tredici accettori e sei donatori di legami idrogeno; si presenta in forma di cristalli igroscopici solubili in acetone, etanolo, metanolo, piridina ed acido acetico glaciale.

8. Silibinina (estratta da *Silybum marianum* L.)



La silibinina, conosciuta anche come silibina (PM 482.44 g/mol), è il principale costituente attivo della silimarina, una miscela di flavonolignani costituita da silibina ed isosilibina,

silicristina e silidianina, ricavata dal *Silybum marianum* (Fam. Asteraceae). Il “cardo mariano” (così come viene comunemente definito) è una pianta erbacea biennale diffusa in tutto il bacino del Mediterraneo e presente nella Farmacopea italiana; i frutti vantano proprietà epatoprotettive e sono utilizzati da molti anni nel trattamento dell’insufficienza epatica, nelle epatiti acute, in casi di cirrosi e nel trattamento di patologie correlate ad una incrementata permeabilità vascolare e fragilità capillare. La silimarina si concentra soprattutto nello strato proteico dell’epicarpo del frutto e non è presente nelle foglie (Capasso et al., 2006).

Più nello specifico, la silibina è una miscela di due diastereoisomeri – silibinina A e B – in rapporto approssimativamente equimolare; possiede proprietà epatoprotettive (antiepatotossiche). Una forma chimicamente modificata e formulata per la somministrazione iniettabile può essere infatti adoperata per il trattamento di intossicazioni acute da tossine epatotossiche, come l’*Amanita phalloides* (Legalon SIL®).

Le sue efficienti proprietà antiossidanti ed antinfiammatorie nei confronti di monociti umani stimolati con LPS sembrano essere dovute alla capacità di inibire il rilascio di perossido di idrogeno e TNF- α (Bannwart et al., 2010); gli effetti antinfiammatori di silibinina e silimarina sono mediati dalla soppressione dei prodotti di espressione genica di NF- κ B, tra i quali la COX-2 e lo stesso TNF- α (Manna et al., 1999).

L’efficacia antiproliferativa della silibina è stata studiata in numerosi modelli tumorali *in vitro* ed *in vivo*, tra i quali il cancro al fegato, il melanoma, il cancro alla prostata, il glioblastoma, l’osteosarcoma, il tumore gastrico, il cancro ai polmoni, al colon ed altri ancora (Deep et al., 2010); i meccanismi coinvolti in tale attività sono da ricercarsi nell’attivazione di specifici *check points* cellulari ed inibitori di chinasi ciclina-dipendenti, nella diminuzione dei livelli di cicline e chinasi ciclina-dipendenti e nella capacità di indurre l’arresto del ciclo cellulare nelle cellule tumorali, promuovendo i processi apoptotici (Deep et al., 2010).

La scarsa solubilità in acqua e la ridotta biodisponibilità della silimarina hanno promosso lo sviluppo di particolari sistemi di delivery, come nel caso della *Silipide* (un complesso di silimarina e fosfatidilcolina, Siliphos®), oltre a formulazioni che prevedono la complessazione con molecole di β -ciclodestrina, o la combinazione con glicosidi per aumentarne la solubilità in acqua e l’effetto epatoprotettivo. Si stanno progettando anche particolari forme di somministrazione mediante nanosospensioni per uso orale o intravenoso, finalizzate ad una veicolazione sito-specifica del principio attivo verso il fegato o la milza (Wang et al., 2012).

La silibina si presenta come polvere bianca o gialla inodore, che può dissolversi in etanolo ed acetone, mentre risulta insolubile in acqua. Contiene dieci legami a rotazione libera e cinque donatori di legami idrogeno.

In Tab. 2 sono riassunte le caratteristiche principali delle droghe da cui sono ricavati i fitocostituenti finora descritti.

Tabella 2. Elenco delle droghe dalle quali sono stati identificati i metaboliti secondari oggetto del presente studio.

Denominazione botanica	Droga	Principali fitocostituenti	Proprietà principali della droga
<i>Scutellaria baicalensis</i>	radici	flavonoidi (baicaleina, baicalina, wogonina), β -sitosterolo	antinfiammatoria, antipertensiva, disturbi cardiovascolari, antibatterica ed antivirale
<i>Ginkgo biloba</i>	foglie	lattoni terpenici (ginkgolidi, bilobalide), flavonoidi	indicata in caso di arteriopatie periferiche, demenza, disturbi circolatori
<i>Ortosiphon stamineus</i>	foglie	terpeni, flavonoidi (eupatorina, sinensetina)	diuretica e depurativa, ipocolesterolemizzante
propoli		resine, acidi grassi, oli essenziali, flavonoidi (galangina)	antibatterica, antimicotica, antivirale, immunostimolante, cicatrizzante
<i>Magnolia officinalis</i>	corteccia	bifenoli (magnololo ed onochiolo)	ansiolitica, antiangiogenica, antiallergica ed antiasmatica, antiossidante
<i>Myrica rubra</i>	corteccia, foglie, frutti	flavonoidi (miricetina, quercetina), tannini	antiossidante, antinfiammatoria, chemiopreventiva, antivirale
<i>Olea europaea</i>	foglie	glucosidi secoiridoidi (oleuropeina)	antiossidante, antipertensiva
<i>Silybum marianum</i>	frutti	flavolignani (silimarina), flavonoidi	epatoprotettiva, antiossidante, chemiopreventiva, antinfiammatoria

2. OBIETTIVI SPERIMENTALI

L'ipotesi di partenza verte sul presupposto ruolo cruciale delle specie radicaliche nella patogenesi di numerose malattie croniche a carattere progressivo, tra cui le cardiopatie, l'ischemia, il diabete mellito e l'aterosclerosi *in primis*.

Le statistiche riportate dall'*European Heart Network* e dalla Società Europea di Cardiologia nel 2012 hanno evidenziato come ogni anno le malattie cardiovascolari uccidono più di 4,3 milioni di persone in Europa e sono responsabili del 48% di tutti i decessi, oltre a costituire una tra le più importanti cause di infermità grave.

Dall'attualità e dall'impellenza di ricerca nel campo delle patologie vascolari è nato il nostro interesse per lo studio dell'attività antiossidante di composti naturali di origine vegetale. Questa scelta è basata sul fatto che, tra i principali fattori coinvolti nell'eziopatogenesi di tali malattie, vi siano una condizione infiammatoria cronica - spesso associata a disfunzione endoteliale - ed un aumentato stato di *stress ossidativo*, definito come sbilanciamento tra produzione di radicali e difese antiossidanti dell'organismo. I radicali nei tessuti svolgono la funzione di molecole segnale, oltre ad essere intermedi fisiologici di reazioni enzimatiche e biochimiche. Sono dunque necessari al corretto funzionamento delle cellule e, anche facendo uso massiccio di sostanze riducenti, sarebbe insensato oltre che impossibile eliminarli. Tuttavia, la cronicizzazione di uno stato di stress ossidativo costituisce una condizione di rischio che favorisce l'instaurarsi di una situazione patologica.

Per ottenere un quadro completo ed attendibile del profilo antiossidante delle sostanze studiate si è deciso di ricorrere dapprima all'impiego di protocolli sperimentali *in vitro* finalizzati a determinare l'attività *scavenger*, per passare poi a un approccio *ex vivo*, focalizzato sulla misurazione del carattere protettivo di tali composti nei confronti di LDL e cellule endoteliali umane.

Inizialmente è stato effettuato uno *screening* qualitativo mediante adsorbimento su lastra TLC per accertare la presenza di un significativo potenziale antiossidante, quindi sono state eseguite due analisi quantitative: una principalmente basata sul meccanismo del trasferimento elettronico (*DPPH scavenging assay*) e una basata sul trasferimento di atomo di idrogeno (*ORAC assay*). Si è poi intrapreso lo studio dei modelli biologici, osservando dapprima il profilo di degradazione ossidativa delle LDL e la relativa capacità protettiva dei diversi fitocostituenti mediante test TBARS e cinetica di ossidazione, quindi valutando la capacità di attenuare la formazione di specie radicaliche intracellulari in colture primarie di cellule endoteliali umane (HUVEC) mediante l'impiego di 2',7'-diclorofluorescina diacetato.

Nella presente ricerca si è pertanto determinata l'attività antiossidante di numerosi metaboliti secondari di origine vegetale ricorrendo a diversi approcci sperimentali per individuare nuovi prodotti ad attività antiossidante, anche come potenziali *lead compounds* di impiego nella profilassi e nella terapia di patologie correlabili al danno ossidativo, soprattutto a livello vascolare.

Più nel dettaglio, i composti vegetali per i quali è stato eseguito lo studio sono: baicaleina (estratta da *Scutellaria baicalensis* G.), (-)-bilobalide (*Ginkgo biloba* L.), eupatorina (*Eupatorium semiserratum* D.C.), galangina (propoli), magnololo (*Magnolia officinalis* L.), miricetina (*Myrica rubra* S.Z.), oleuropeina (*Olea europea* L.) e silibinina (*Silybum marianum* L.). Ad eccezione della bilobalide, appartengono tutti alla classe dei polifenoli che, tra i composti naturali descritti in letteratura, sono quelli che possiedono in genere un potenziale di riduzione di media entità rispetto ad altri antiossidanti, che li rende paragonabili all' α -tocoferolo (Jovanovic et al., 1996; Rice-Evans et al., 1996) ma meno efficaci dell'acido ascorbico (Buettner, 1993).

La scelta di questi fitocomposti è stata motivata dallo studio della letteratura scientifica e dalle considerazioni legate all'uso tradizionale delle droghe vegetali di origine; si è anche presa in considerazione la loro diversa struttura chimica, caratterizzata da un assetto funzionale che lascia supporre significative potenzialità antiossidanti. La loro attività dipende infatti dalla combinazione di requisiti strutturali e di potenziale di riduzione, ovvero dal *pattern* di idrossilazione e dalla loro reattività come donatori di idrogeno o di elettroni (Rice-Evans et al., 1996).

3. MATERIALI E METODI

3.1 Reattivi saggi *in vitro*

AAPH 2,2'-azobis-(2-metilpropionamidina) diidrocloreuro 98% (*Acros Organics*); $C_8H_{18}N_6 \cdot 2HCl$ (PM = 271,19 g/mol)

DMSO dimetilsolfossido 99,9% (*Carlo Erba*)

DPPH 2,2-difenil-1-picrilidrazile (*Sigma-Aldrich*); $C_{18}H_{12}N_5O_6$ (PM = 394,32 g/mol)

Etile acetato (*Merck*); $C_4H_8O_2$ (PM = 88,10 g/mol)

Fluoresceina acido libero (*Sigma-Aldrich*); $C_{20}H_{12}O_5$ (PM = 332,31 g/mol)

Metanolo grado di purezza HPLC (*Carlo Erba*)

PBS tampone fosfato (*Lonza*): NaCl 139,9 mM; KCl 2,7 mM; $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ 1,5 mM; KH_2PO_4 8,1 mM, pH 7,4 priva di ioni Ca^{2+} e Mg^{2+}

Trolox acido (\pm)-6-idrossi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carbossilico 97% (*Sigma-Aldrich*); $C_{14}H_{18}O_4$ (PM = 250,29 g/mol)

3.2 Reattivi saggi *ex vivo*

BHT butilidrossitoluene (*Sigma-Aldrich*); $C_{15}H_{24}O$ (PM = 220,35 g/mol)

Collagenasi tipo 2 (250 u/mg) in polvere liofilizzata (*Worthington*)

CuSO₄ solfato di rame (II) (*Sigma-Aldrich*); PM = 159,61 g/mol

DCFH-DA 2',7'-diclorofluorescina diacetato (*Sigma-Aldrich*); $C_{24}H_{16}C_{12}O_7$ (PM = 487,29 g/mol) si dissolve in DMSO appena prima dell'utilizzo

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium con 4,5 g/L glucosio, L-Glutamina senza Nipiruvato (*Lonza*)

EBM-2 Endothelial cell Basal Medium-2 (*Lonza*)

EGM-2 Endothelial cell Growth Medium-2 arricchito con 2% FBS, 0,04% idrocortisone, 0,4% rhFGF-b, 0,1% VEGF, 0,1% R³-IGF-1, 0,1% acido ascorbico, 0,1% rhEGF, 0,1% GA-1000 e 0,1% eparina (*Lonza*)

FBS siero fetale bovino (*Lonza*), scomplementato (30 min a 56°C), conservato a -20°C

Isopropanolo acido. 100 ml isopropanolo (*Sigma-Aldrich*) + 0,33 ml HCl 36%

KBr bromuro di potassio (*Sigma-Aldrich*); PM = 119,00 g/mol

MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro] (*Sigma-Aldrich*). Soluzione (5mg/ml) in PBS, resa sterile con filtro Millipore (0,22 µm) e stoccata a riparo dalla luce

Na₂-EDTA acido etilendiamminotetracetico disodico diidrato (*Sigma-Aldrich*); C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈ · 2H₂O (PM = 372,24 g/mol)

PBS tampone fosfato (*Lonza*): NaCl 139,9 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ · H₂O 1,5 mM; KH₂PO₄ 8,1 mM, pH 7,4 priva di ioni Ca²⁺ e Mg²⁺

Pen/Strep soluzione di penicillina (10.000 U/ml) e streptomina (10.000 µg/ml) conservata a -20°C (*Lonza*)

TBA acido 2-tiobarbiturico (*Sigma-Aldrich*); C₄H₄N₂O₂S (PM = 144,15 g/mol)

TCA acido tricloroacetico (*Merck*); CCl₃COOH (PM = 163,39 g/mol)

Tripsina Soluzione 2,5% (10X) conservata a -20°C (*Lonza*)

3.3 Metodi *in vitro*

DPPH[•] scavenging assay

Il DPPH[•] scavenging assay è un saggio impiegato nello studio dell'attività antiradicalica *in vitro* e comunemente utilizzato per la valutazione dell'attività scavenger verso i radicali liberi. Si tratta di un metodo riproducibile ed accurato che si basa sulla decolorazione di una soluzione del radicale 1,1-difenil-2-picrilidrazile (DPPH[•]), come descritto nel protocollo originale di Blois (1958). Il DPPH[•] è una molecola radicalica stabile, grazie ad un esteso sistema di delocalizzazione dell'elettrone spaiato (Fig. 3). L'assetto elettronico delocalizzato previene infatti la dimerizzazione della molecola (come invece accade per molte altre specie radicaliche) ed è responsabile dell'intensa colorazione viola, dotata di assorbanza massima a 515 - 520 nm. Quando una soluzione di DPPH[•] viene posta a contatto con un substrato donatore di elettroni o di idrogeno si passa ad una forma non-radicalica stabile, con viraggio della soluzione a giallo tenue; l'entità della decolorazione è proporzionale all'attività antiradicalica evidenziata nei confronti del DPPH[•] e può essere monitorata per analisi spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 517 nm.

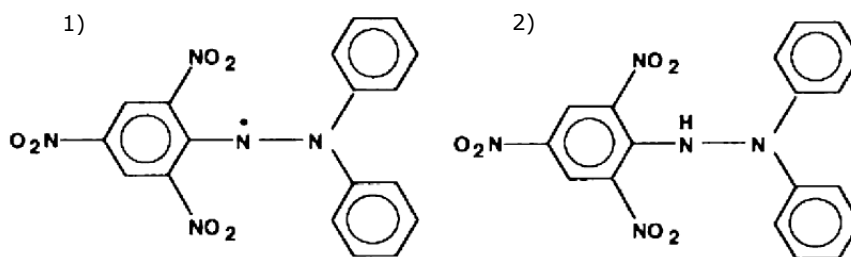
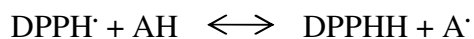


Figura 3. Struttura chimica del radicale difenil-picrilidrazile (1) e della sua forma ridotta difenilpicrilidrazinica (2).

Il meccanismo di reazione del DPPH[•] scavenging assay è principalmente basato sul trasferimento di elettroni (SET); lo studio delle cinetiche ossidoriduttive del DPPH[•] nei confronti di antiossidanti polifenolici ha infatti evidenziato un processo rapido di trasferimento elettronico degli anioni fenossido, a scapito di una lenta cessione di atomi di idrogeno delle specie fenoliche neutre da parte del DPPH[•] (Huang et al., 2005).

La riduzione del DPPH[•] a difenilpicrilidrazina (DPPHH) può essere riassunta dalla seguente reazione:



dove AH indica una generica specie antiossidante e A[·] ne rappresenta la relativa forma radicalica.

Nel presente studio le specie di maggiore interesse appartengono alla famiglia dei polifenoli. Gli antiossidanti fenolici (PheOH) sono considerati dei terminatori di radicali; questa loro attività dipende principalmente da alcune condizioni strutturali, tra le quali l'energia di dissociazione del legame O-H, la risonanza mesomerica del radicale fenolico (PheO[·]) e l'ingombro sterico dei sostituenti laterali nell'anello aromatico (Shahidi e Naczki, 1995). Normalmente la reazione chimica che si verifica è qui di seguito riproposta:

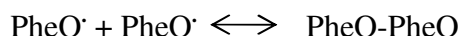


dove (I), (II), (III),... sono strutture di risonanza.

La concentrazione residua di DPPH[·] dipenderà esclusivamente dalla concentrazione e dalla struttura dei composti fenolici, poiché ci sono due reazioni teoriche di terminazione (Sánchez-Moreno et al., 1998):



tuttavia l'eq. 1) è impedita dall'ingombro sterico e l'eq. 2) può verificarsi in alcuni casi, ma potrebbe essere impedita dal volume molecolare di PheOH e dagli eventuali sostituenti laterali. L'eq. 2) compete con la reazione seguente:



Le reazioni chimiche e la successiva interpretazione dei dati sperimentali possono essere influenzate da numerosi fattori, tra i quali il tipo di solvente utilizzato per solubilizzare il DPPH[·] e l'antiossidante, il pH del mezzo, le condizioni di esposizione a luce ed ossigeno, il

tempo adottato per la valutazione dell'effetto antiradicalico, le concentrazioni relative utilizzate e la conformazione strutturale dei campioni a supposta attività antiossidante (Bondet et al., 1997; Ozcelik et al., 2003).

L'efficienza antiradicalica di una generica specie AH nei confronti del DPPH[•] può essere valutata ricorrendo ad alcuni parametri caratteristici: l'EC₅₀ (ovvero la concentrazione di substrato necessaria a ridurre del 50% l'assorbanza del DPPH[•] disponibile nel *medium* di reazione), direttamente correlabile alla potenza antiossidante del campione; la stechiometria (data dal numero di moli di DPPH[•] ridotte da una mole di AH), o il monitoraggio della cinetica di decadimento dell'assorbanza del DPPH[•], ricorrendo all'analisi della velocità di decolorazione (considerata rapida se < 5 min, intermedia per tempi compresi fra 5-30 min e lenta per tempi > 30 min necessari a raggiungere lo *steady-state*) (Sanchez-Moreno et al., 1998), al modello cinetico di appartenenza, alla pendenza della curva di decadimento dell'assorbanza ed all'energia di attivazione propria della reazione chimica tra DPPH[•] e AH. Nel nostro caso è stato preso in considerazione come parametro di riferimento il valore di EC₅₀ proprio di ciascun fitocostituente.

Quindi sono stati elaborati due diversi protocolli di studio per valutare, sia qualitativamente che quantitativamente, il potenziale *scavenger* di ciascun campione.

a) Analisi qualitativa

Per poter apprezzare l'attività antiossidante dei metaboliti secondari di interesse si è approntata un'analisi preliminare di tipo qualitativo ricorrendo all'uso della *Thin Layer Chromatography* (TLC), una tecnica cromatografica su lastra di semplice preparazione e rapida esecuzione.

La TLC si basa sulla diversa ripartizione dei composti tra una fase stazionaria ed una fase mobile, in funzione dell'affinità di ogni sostanza con esse; l'eluente sale per capillarità attraverso la piastrina trascinando con sé in maniera differente i singoli componenti della miscela, separandoli.

Protocollo sperimentale. Con l'ausilio di un capillare di vetro, si caricano 5 µl di soluzione madre del campione [10^{-2} M] su una lastrina di plastica, rivestita da uno strato di 0,2 mm di gel di silice (*Macherey-Nagel* Polygram SIL G/UV₂₅₄, 40x80 mm), a circa un centimetro e

mezzo dal margine inferiore. La lastrina viene successivamente trasferita in una camera a chiusura ermetica contenente uno strato di fase mobile alto circa un centimetro, posto sul fondo, in maniera tale che il margine inferiore della lastrina al di sotto del fronte di caricamento vi sia immerso. E' stato scelto come eluente una miscela 1:1 di metanolo ed etile acetato (Tepe et al., 2005).

In queste condizioni la corsa cromatografica dura in media una decina di minuti; quando il fronte del solvente è prossimo a raggiungere il margine superiore si estrae la piastra dalla cameretta, la si asciuga con un getto d'aria calda, quindi vi si nebulizza una soluzione metanolica di DPPH' allo 0,2 % p/v. Per lo sviluppo, la lastra rimane al buio per 60 minuti a temperatura ambiente; la presenza di attività antiossidante è visualizzata dalla comparsa di aree di decolorazione, più o meno intense, su fondo viola.

b) Analisi quantitativa

I metodi sperimentali che valutano la capacità antiossidante per trasferimento di singolo elettrone (SET) sono tipicamente basati sul viraggio colorimetrico di una specie ossidante che si riduce (Huang et al., 2005). Il grado di variazione cromatica è proporzionale alle concentrazioni di antiossidante e l'*endpoint* viene raggiunto quando la reazione è conclusa. Per queste ragioni le reazioni del DPPH' con una specie antiossidante possono essere monitorate per perdita del segnale di risonanza paramagnetica elettronica (ESR) o per diminuzione dell'assorbanza a 517 nm – lunghezza d'onda alla quale la forma radicalica del DPPH' presenta un picco di assorbimento (mentre la forma ridotta alla medesima lunghezza d'onda manifesta un profilo trascurabile) (Fig. 4).

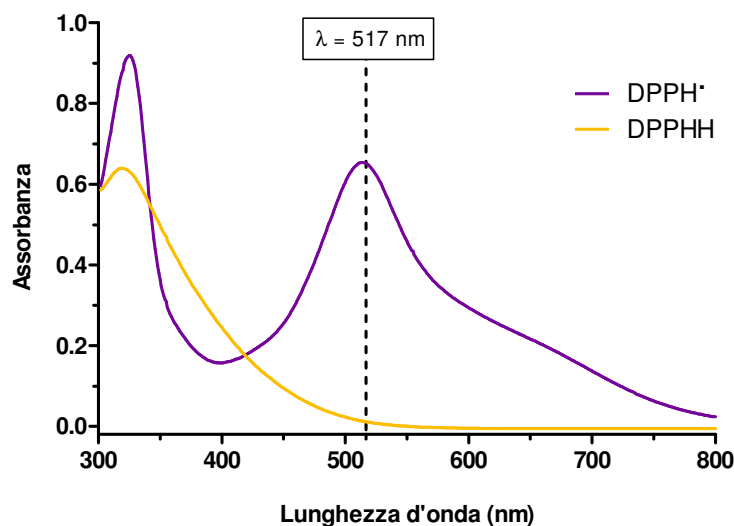


Figura 4. Spettro di assorbanza del DPPH• in condizioni non ridotte (linea viola) e in forma ridotta (linea gialla); la lunghezza d'onda di 517 nm risulta ottimale per monitorare il viraggio colorimetrico della sonda radicalica.

Protocollo sperimentale. Inizialmente si prepara una soluzione metanolica di DPPH• 70 μM , da conservare in una bottiglia di vetro ambrato con tappo a vite. Parallelamente si preparano le soluzioni degli analiti a partire da soluzioni madre precostituite.

55 ml di soluzione metanolica di DPPH• vengono omogeneamente ripartiti in 11 aliquote e trasferiti in altrettante *vials* ambrate, quindi si procede all'aggiunta del campione in maniera da ottenere le concentrazioni finali entro l'intervallo 10^{-7} M - 10^{-2} M.

Le *vials* vengono agitate energicamente, quindi lasciate a riposo per 60 minuti al riparo dalla luce e a temperatura ambiente. Dopo l'incubazione si procede alla lettura spettrofotometrica dei campioni ($\lambda = 517$ nm) e del solo DPPH• addizionato con analoghe quantità crescenti di metanolo (*blank*). Per tale determinazione sono state impiegate cuvette in quarzo con sezione di 10 mm ed uno spettrofotometro *Beckman Coulter* modello DU 800.

L'effetto *scavenging* esercitato dai campioni sul DPPH• può essere facilmente ricavato a partire dalla seguente equazione:

$$DPPH \text{ s.e. (\%)} = \left[\frac{A_0 - (A - A_b)}{A_0} \right] \cdot 100$$

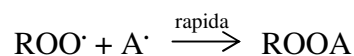
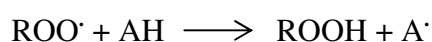
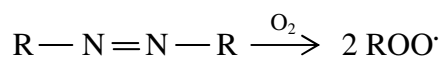
Con A_0 l'assorbanza del solo DPPH• al quale vengono addizionate quantità crescenti di metanolo, A l'assorbanza della soluzione di DPPH• trattata con il campione vegetale in esame ed A_b l'assorbanza della soluzione metanolica del solo campione; questo consente di eliminare

eventuali interferenze di assorbanza proprie dell'analita durante la lettura spettrofotometrica. Tutte le soluzioni sono state preparate giornalmente e conservate a temperatura ambiente al riparo dalla luce.

Dopo la lettura spettrofotometrica, l'efficacia antiossidante è determinata ricorrendo all'estrapolazione dell'EC₅₀ propria di ciascun metabolita.

ORAC assay

Il saggio ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) permette di misurare l'inibizione dell'ossidazione indotta dai radicali perossidici da parte di una specie AH, rispettando il classico modello antiossidante dell'interruzione di catena radicalica per trasferimento di atomo di idrogeno (HAT) (Ou et al. 2001). Nel metodo di base, un radicale perossidico reagisce con una sonda fluorescente degradandola, portando alla formazione di un prodotto non fluorescente. La capacità antiossidante è determinata dalla diminuzione della fluorescenza in funzione alla quantità di prodotto formato nel tempo:



Le sonde fluorescenti che vengono più frequentemente utilizzate sono la fluoresceina (3'6'-diidrossi-spiro[isobenzofuran-1[3H],9'[9H]-xanten]-3-one; FL), o la diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA): sono considerate le più stabili e le meno reattive (Ishige et al., 2001). I prodotti ossidati di FL indotti dai radicali perossidici sono stati identificati mediante LC-MS, confermando che il meccanismo d'azione appartiene al gruppo HAT (Ou et al., 2001). La reazione della sonda fluorescente con un generatore di radicali perossidici è seguita da una diminuzione nel tempo del segnale di fluorescenza. Gli antiossidanti, proteggendo la molecola-sonda dalla degradazione ossidativa, rallentano il decadimento del segnale con un

ritardo quantificabile mediante l'uso di un fluorimetro (Gillespie et al., 2007; Ndhlala et al., 2010). Il tempo di decadimento della sonda fluorofora risulta proporzionale alla quantità ed all'attività degli antiossidanti presenti nel campione in esame. L'effetto protettivo dell'antiossidante si calcola in base alla differenza tra le aree della curva di decadimento della sonda con il solo generatore di radicali (*blank*) e quella del campione in esame (Fig. 5):

$$AUC = \int \text{antiox} - \int \text{blank}$$

I valori ORAC sono comunemente espressi come equivalenti trolox (acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbossilico), che è un analogo idrosolubile della vitamina E. Per esprimere in questo modo l'attività *scavenger* è necessario costruire una curva di taratura, ricorrendo alla AUC di cinque concentrazioni standard di trolox; gli equivalenti possono essere calcolati mediante un'equazione lineare del tipo $y = ax + b$, che tiene conto delle concentrazioni scalari di trolox impiegate e dell'area netta sottesa alla curva di decadimento della fluoresceina. Il modello di regressione lineare risulta rispettato entro l'intervallo di concentrazioni [6.25 – 50 μM] di trolox. I dati vengono normalmente espressi come μmol di equivalenti trolox (TE) per grammo di campione ($\mu\text{Mol TE/g}$) (Cao et al., 1993; Ou et al., 2001).

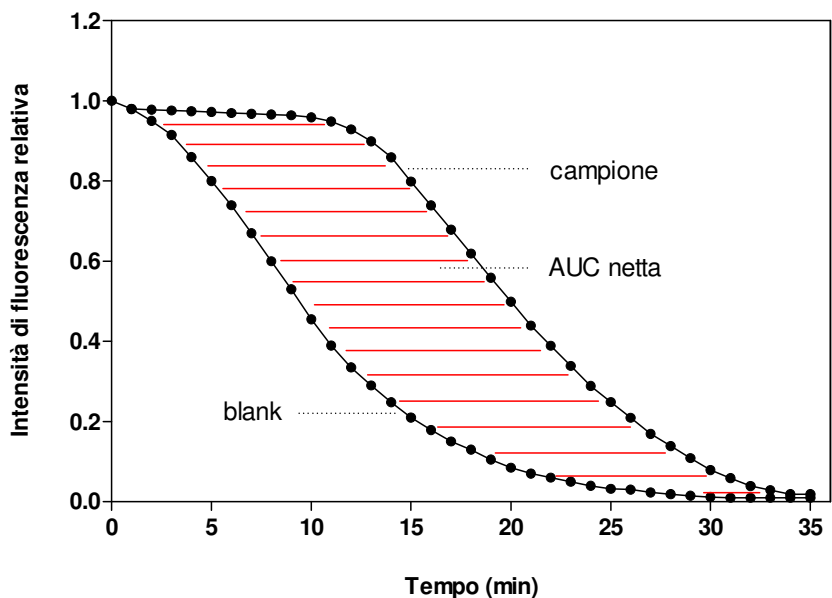


Figura 5. Tipica curva di decadimento di un campione a confronto con il controllo; il campione ritarda l'ossidazione della sonda fluorescente. Il valore ORAC è calcolato sottraendo l'area sottesa alla curva del blank da quella del campione (AUC netta).

L'ORAC *assay* è un saggio impiegato per studiare la capacità antiossidante di numerosi composti e prodotti alimentari ed è stato adottato per indicare l'attività di vari integratori alimentari (Bank et al., 2004).

Protocollo sperimentale. Si preparano la soluzione del campione (5 μ M) e la soluzione di fluoresceina in PBS alla concentrazione finale di 0.08 μ M, da conservare in ghiaccio e al riparo dalla luce.

Parallelamente si preparano le soluzioni di standard antiossidante (trolox) e del generatore di radicali perossidici (AAPH): il trolox viene solubilizzato in PBS in modo da ottenere una soluzione madre 10^{-4} M, dalla quale sono preparate per diluizione progressiva le soluzioni di 50 μ M, 25 μ M, 12.5 μ M e 6.25 μ M. La soluzione di AAPH viene preparata in PBS alla concentrazione di 0.15 M; tutte le soluzioni vanno preparate estemporaneamente e tenute in ghiaccio e al riparo dalla luce. Quindi si imposta il lettore di piastre (VictorTM X3, PerkinElmer) per la lettura cinetica di fluorescenza a 37°C per un'ora, con lunghezze d'onda di eccitazione a 485 nm ed emissione a 530 nm, pre-riscaldando lo strumento a 37°C per 10 min. In una piastra da 24 pozzetti si sono aggiunti 750 μ L di soluzione di FL 0.08 μ M, 125 μ L di soluzione tampone o soluzione standard di trolox (6.25 – 50 μ M) o soluzione campione (5 μ M), quindi si aggiungono 125 μ L di soluzione AAPH in ciascun pozzetto e si procede subito alla lettura fluorimetrica, mediante scansioni regolari ad intervalli di un minuto per 60 minuti complessivi.

Una volta ottenute le curve di decadimento del segnale di fluorescenza, si calcolano le AUC relative a ciascun pozzetto sottraendo il valore medio della AUC del *blank* alle AUC di trolox e campione in esame. Si ottiene in questo modo l'AUC netta e, attraverso di essa, la retta di calibrazione e la relativa equazione per ottenere il valore finale espresso in TEAC.

3.4 Metodi *ex vivo*

Isolamento di LDL umane da frazioni plasmatiche

Una delle tecniche più comunemente utilizzate per separare le diverse classi di lipoproteine del plasma con l'ultracentrifuga preparativa prevede la rimozione sequenziale di HDL, VLDL ed IDL dal campione in esame (Fig. 6). Tale metodica risulta abbastanza costosa e richiede del personale tecnico specificamente preparato: per questo motivo la separazione delle LDL per studiare i metaboliti secondari è stata affidata a Raffaella Marin ed al gruppo di ricerca del Dipartimento di Medicina dell'Università di Padova.

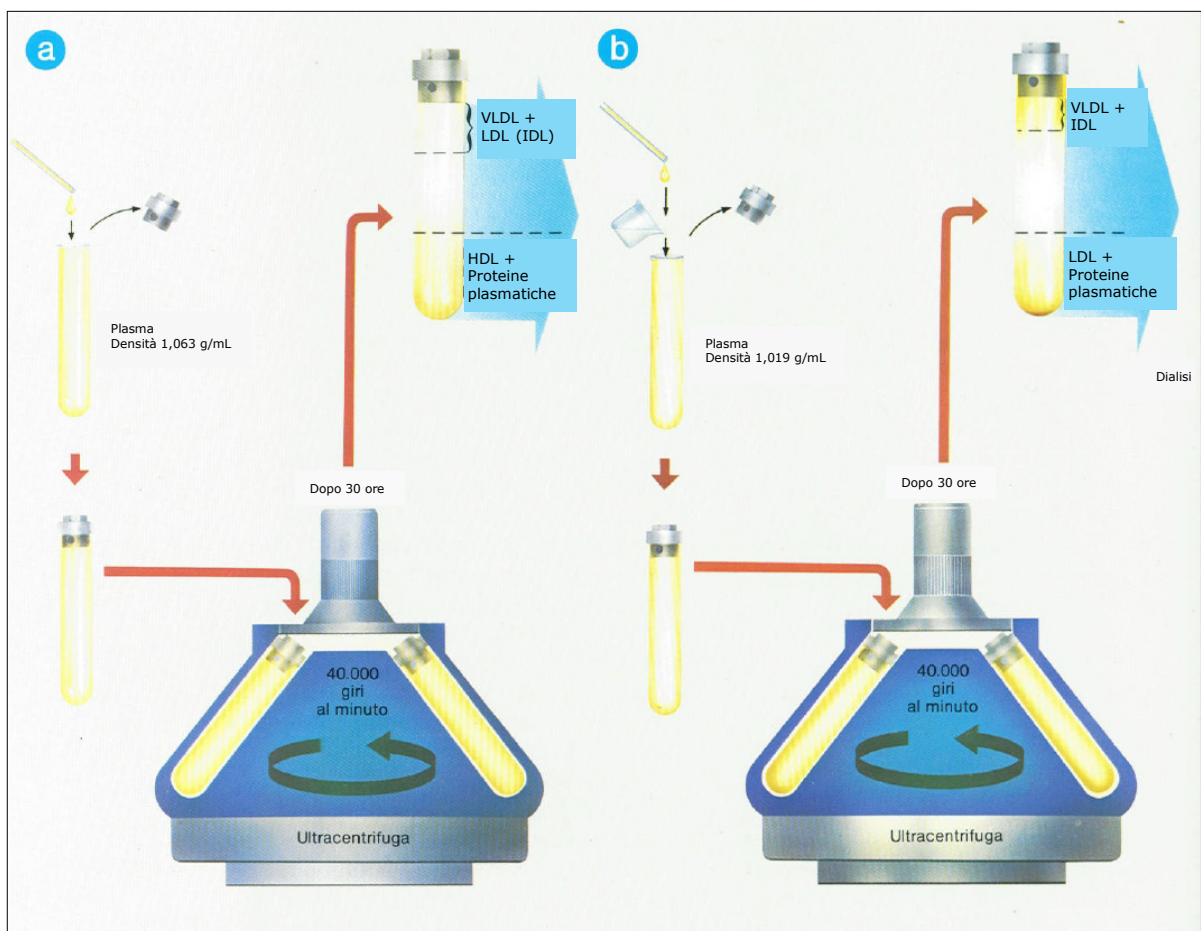


Figura 6. Ultracentrifugazione sequenziale per l'isolamento delle LDL. Con la prima ultracentrifugazione alla densità di 1,063 g/mL si separano nel surnatante le VLDL, le LDL ed eventuali IDL presenti nel plasma del campione di partenza (a), quindi dopo ultracentrifugazione alla densità di 1,019 g/mL è possibile separare la sola frazione delle LDL, stratificata nella parte inferiore del tubo (b). Immagine adattata da Crepaldi et al., 1993.

Protocollo preparativo. I campioni di sangue, prelevati da soggetti sani normolipidemicici di ambo i sessi e di età compresa fra i 25 ed i 35 anni, a digiuno, sono stati raccolti in

vacutainers. Se ne è separato il plasma mediante centrifugazione a 2500 rpm per 15 minuti a 10°C, in presenza di Na₂-EDTA (0.04% p/v).

Le LDL sono state isolate dal plasma per ultracentrifugazione sequenziale: la procedura è stata iniziata nello stesso giorno in cui si sono effettuati i prelievi ematici. Si è utilizzata un'ultracentrifuga *Beckman Optima XL90*, dotata di un rotore *Beckman 50 Ti* ad angolo fisso (Havel et al., 1955; Schumaker et al., 1986). Il plasma così ottenuto, del volume pari a circa 40 mL, si porta alla densità di 1.063 g/mL per aggiunta di KBr solido. La soluzione si trasferisce poi in un tubo da centrifuga in poliallometere diluendo ulteriormente con una soluzione di KBr alla densità di 1.063 g/mL e pH = 7.4. La correttezza dei valori di densità è confermata mediante l'utilizzo di un densitometro (Densito 30P, *Mettler Toledo*).

L'ultracentrifugazione si esegue a 40.000 rpm, a 6°C per 30 ore. Le VLDL, le IDL e le LDL sono rimosse dai 40 mL di surnatante mediante taglio del tubo. La densità del surnatante è ulteriormente corretta a 1.019 g/mL, quindi si esegue una nuova ultracentrifugazione nelle medesime condizioni di velocità, temperatura e tempo di rotazione. Le LDL (densità 1.019 – 1.063 g/mL) sono recuperate nei 4 mL di sottonatante; il dosaggio del colesterolo, eseguito per tutte le frazioni isolate mediante taglio del tubo, si è attestato a valori di circa 90%. La frazione contenente le LDL è stata dializzata in maniera esaustiva e successivamente concentrata mediante membrana Amicon ultra-4 100K (*Millipore Corporation, USA*).

Le concentrazioni di apolipoproteina B e colesterolo si sono misurate nel plasma e nelle frazioni isolate con l'ultracentrifugazione mediante Automatic Analyzer *Cobas Mira plus* (*Horiba ABX, France*); l'ApoB è stata determinata con metodo immunoturbidimetrico (*Horiba ABX, France*). I valori di colesterolo del plasma e delle frazioni si sono determinati con metodo enzimatico colorimetrico (*Horiba ABX, France*) (Roschlau et al., 1974), il contenuto proteico con metodo Lowry (Lowry et al., 1951).

TBARS test

Il TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) test consente di misurare in maniera pressoché istantanea lo stato di perossidazione lipidica delle LDL come indice di stress ossidativo. Le LDL sono sottoposte ad uno stimolo ossidativo (mediante uno ione metallico o un composto azo-iniziatore), sia in presenza che in assenza di antiossidanti. Tra i prodotti di degradazione ossidativa che ne derivano viene adottato come marker rappresentativo la

malondialdeide (MDA), che ha la capacità di legarsi chimicamente all'acido tiobarbiturico (TBA) aggiunto all'ambiente di reazione. In opportune condizioni di acidità e di temperatura, i substrati ossidati formano infatti un addotto cromogeno TBA-MDA-TBA (Fig. 7), determinabile per via spettrofotometrica e/o fluorimetrica (Buege et al., 1978).

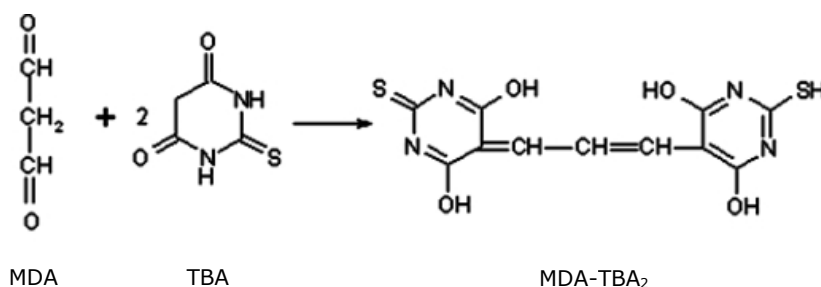


Figura 7. Formazione dell'addotto cromogeno TBA-MDA-TBA a seguito della reazione tra malondialdeide ed acido tiobarbiturico.

Protocollo sperimentale. Dopo aver effettuato una dialisi esaustiva delle LDL in PBS privo di EDTA, si prelevano 480 μL di sospensione a concentrazione 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e si trasferiscono in sei eppendorf con chiusura di sicurezza (*Eppendorf safe-lock tubes* 2.0 mL), quindi si aggiungono 24 μL di soluzione metanolica diluita del campione e si lasciano a riposo per 15 minuti circa. Successivamente si aggiungono 12 μL di soluzione acquosa di CuSO_4 0.4 mM, ottenendo una concentrazione finale pari a 10 μM nel mix di reazione. Si chiudono le eppendorf e si lasciano a bagnomaria per 1 ora a 37°C, per favorire i processi di ossidazione a carico delle LDL. Trascorso il periodo di incubazione, le eppendorf vengono trasferite in ghiaccio e si aggiungono 50 μL di una soluzione acquosa di $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ per chelare il CuSO_4 ed arrestare i processi di ossidazione. Si procede quindi all'aggiunta di BHT (25 μL , 2 g/L), 250 μL di TCA 100 g/L e 500 μL di TBA 6.7 g/L; il BHT (butilidrossitoluene) è un fenolo alchilato ad azione antiossidante, il TCA (acido tricloroacetico) viene impiegato per acidificare l'ambiente di reazione e favorire il legame dell'acido tiobarbiturico (TBA) con la malondialdeide prodotta per degradazione perossidativa delle LDL. Le *vials* vengono insufflate con N_2 gassoso e si agitano delicatamente, quindi si trasferiscono in acqua bollente per 20 minuti. Trascorso tale periodo, nel quale si forma l'addotto MDA-TBA₂, le eppendorf sono trasferite in ghiaccio e sottoposte a centrifugazione a 3000g per 5 minuti. Si estrae il surnatante da ciascuna eppendorf, trasferendolo in cuvette di quarzo per la lettura

spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 532 nm. L'assorbanza viene trasformata in equivalenti di MDA utilizzando il relativo coefficiente ϵ di estinzione molare:

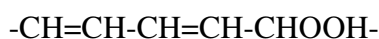
$$\epsilon_{MDA} = 1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Quindi per la legge di Lambert-Beer, secondo cui $A = \epsilon \cdot c \cdot l$, si potrà ottenere la concentrazione c di MDA:

$$c = \frac{A}{\epsilon \cdot l} = \frac{A}{1,56 \cdot 10^5}$$

Cinetica di ossidazione delle LDL

Questo tipo di studio permette di monitorare la progressione ossidativa a carico delle LDL mediante la regolare ripetizione di letture spettrofotometriche ad una lunghezza d'onda fissa (234 nm), caratteristica per la determinazione dei dieni coniugati che si formano in seguito alla perossidazione degli acidi grassi. I dieni coniugati sono idroperossidi lipidici che derivano dalla degradazione ossidativa delle LDL e presentano la seguente struttura di riferimento:



L'ossidazione *in vitro* delle LDL rispetta una cinetica caratteristica, che comprende tre fasi: latenza, propagazione e decomposizione (Esterbauer et al., 1989) (Fig. 8). La prima fase corrisponde al tempo durante il quale l'assorbanza dei dieni aumenta solo debolmente, poiché risulta strettamente correlata alla quantità di antiossidanti endogeni contenuti nelle LDL (α -tocoferolo, carotenoidi, retinilsteato) in grado di proteggere gli acidi grassi polinsaturi dall'ossidazione e di ritardare il processo di perossidazione lipidica e l'inizio della successiva fase di propagazione. La seconda fase corrisponde all'ossidazione vera e propria e coinvolge dapprima i fosfolipidi di superficie, quindi i lipidi idrofobici all'interno della lipoproteina (colesterolo e trigliceridi) e prevede un rapido incremento dell'assorbanza dei dieni. Tale incremento sembra principalmente dovuto alla formazione di idroperossidi del colesteril-linoleato (Lass et al., 1996). La terza fase corrisponde al riarrangiamento e/o alla

decomposizione dei prodotti di ossidazione: i dieni coniugati subiscono reazioni consecutive che li trasformano in un'ampia varietà di prodotti secondari, dotati di assorbanza entro l'intervallo 210-240 nm (Esterbauer et al., 1989).

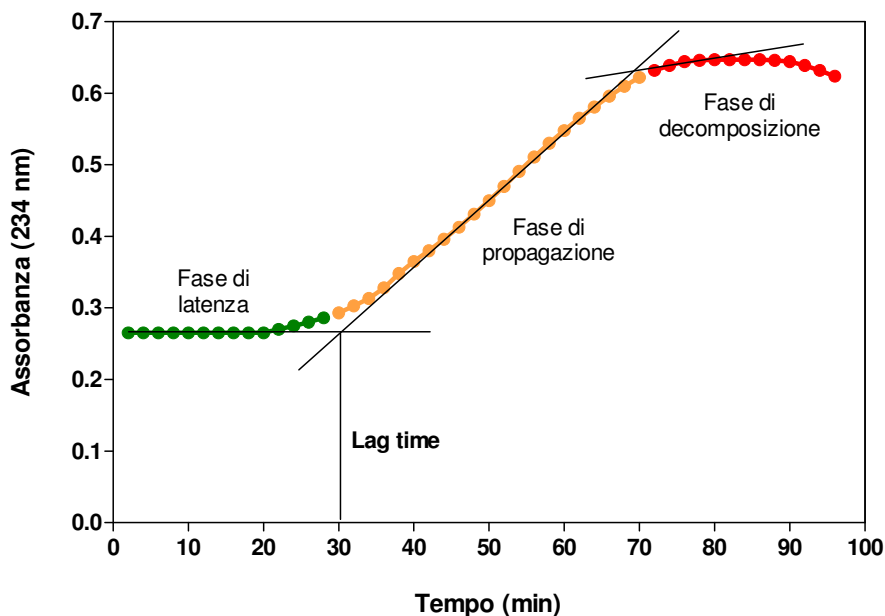


Figura 8. Profilo cinetico di ossidazione delle LDL per monitoraggio dell'assorbanza a 234 nm. Sono visibili le tre fasi di degradazione ossidativa: latenza (*verde*), propagazione (*giallo*) e decomposizione (*rosso*). Il lag time viene calcolato come intercetta tra la retta tangente alla porzione lineare della fase di latenza e la tangente alla fase di propagazione.

Gli antiossidanti, aggiunti alla sospensione delle lipoproteine, hanno la capacità di prolungare la fase di latenza. Pertanto la quantificazione della fase di latenza rappresenta una valida metodica per stabilire la suscettibilità delle LDL all'ossidazione e l'effetto protettivo degli antiossidanti nei loro confronti (Fig. 9).

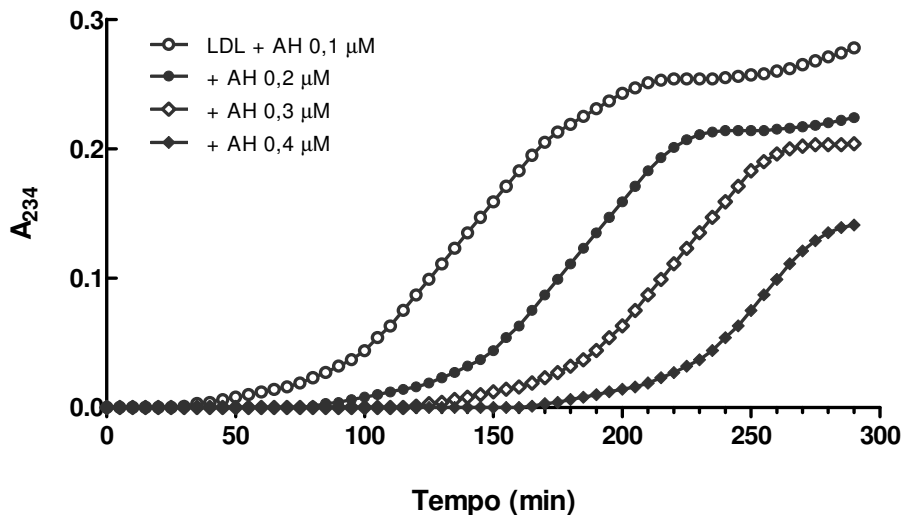


Figura 9. Effetto di un antiossidante nei confronti dell'ossidazione *in vitro* delle LDL. All'aumentare della concentrazione di antiossidante la curva cinetica si sposta verso destra; maggiore è il potere antiossidante, maggiore sarà lo spostamento verso destra – ed il lag time della curva.

Protocollo sperimentale. Dopo aver effettuato una dialisi esaustiva delle LDL in PBS privo di EDTA, si prelevano 480 µL di sospensione alla concentrazione 25 µg/mL e si trasferiscono in sei eppendorf, quindi si aggiungono 24 µL di soluzione metanolica diluita del campione e si lasciano a riposo per 15 minuti circa. Successivamente si aggiungono 12 µL di soluzione acquosa di CuSO₄ 0.4 mM, in modo da ottenere una concentrazione finale di 10 µM nella sospensione. Si trasferisce il contenuto di ciascuna provetta in cuvette di quarzo e si procede alla lettura cinetica preimpostando lo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 234 nm e alla temperatura di 37°C, effettuando delle scansioni ad intervalli regolari di 5 minuti.

Isolamento di cellule endoteliali dal funicolo ombelicale umano

Protocollo preparativo. Le colture primarie di cellule endoteliali umane (HUVEC) sono state ottenute da funicoli ombelicali di donne sane sottoposte a parto cesareo, per gentile concessione del Dipartimento di Scienze Ginecologiche e della Riproduzione Umana dell'Università di Padova.

Una volta prelevati, i funicoli sono stati raccolti in contenitori sterili riempiti con una soluzione costituita dal 49% in DMEM, 49% PBS e 2% Pen/Strep e conservati in ambiente refrigerato per non più di 24 ore dalla resezione chirurgica. Le cellule sono state isolate

secondo la metodica descritta da Jaffe et al. (1973), operando in ambiente sterile sotto cappa a flusso laminare. I funicoli vengono puliti esternamente e privati di eventuali parti lese; la vena ombelicale è incannulata con ago *butterfly* e mantenuta in sede mediante fissaggio con una pinza emostatica. La vena è poi ripulita da eventuali coaguli intravasali mediante lavaggi ripetuti con soluzione fisiologica sterile. In seguito, dopo aver chiuso l'estremità inferiore del funicolo con un'altra pinza emostatica, si inietta nella vena una soluzione di collagenasi (30 mg di collagenasi in 30 mL di PBS sterile) fino a riempirne completamente il lume. Il funicolo è poi posto in incubatore per 18 minuti a 37°C. Successivamente si apre l'estremità inferiore e si raccoglie il liquido contenuto nella vena ombelicale in una falcon sterile da 50 mL, anche mediante lavaggio forzato della vena con una soluzione di blocco della collagenasi, costituita da DMEM, 10% FBS e 1% Pen/Strep per arrestare l'azione proteolitica della collagenasi. Il funicolo è ulteriormente ripulito dalle rimanenti cellule endoteliali ricorrendo a lavaggi ripetuti con PBS, raccogliendo nella falcon ogni residuo. Le cellule sono ottenute per centrifugazione della sospensione a 1500 rpm per 5 minuti; il surnatante è aspirato ed il pellet risospeso in 2 mL di terreno completo EGM-2, pronto per essere trasferito in fiasche da 25 cm², da riporre in incubatore in condizioni controllate di temperatura (37°C), umidità relativa (90%) e CO₂ (5%).

Il giorno successivo alla semina, le cellule sono lavate con PBS sterile in modo da rimuovere eritrociti ed eventuali residui ematici presenti, e si aggiunge nuovo terreno di coltura (EGM-2, 7.5 mL). Tutte le operazioni sono svolte in condizioni di sterilità, necessarie per la crescita cellulare (Fig. 10). Trascorsi 3-4 giorni dal prelievo, le cellule raggiungono la confluenza formando un monostrato continuo.

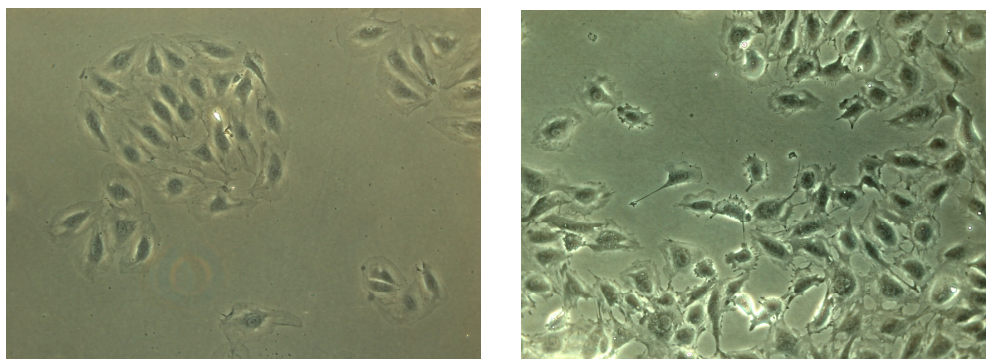


Figura 10. Cellule HUVEC in coltura primaria: *cluster* cellulari a poche ore dal distacco enzimatico (sx) e in condizioni di crescita verso la confluenza (dx).

Test di vitalità cellulare (MTT test)

La vitalità delle cellule può essere stimata mediante l'utilizzo di un sale giallo solubile di tetrazolio, [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro] (MTT), che viene ridotto a sale di formazano – un cristallo colorato in viola insolubile in acqua – ad opera dell'enzima respiratorio mitocondriale succinato-tetrazolio reduttasi (Fig.11).

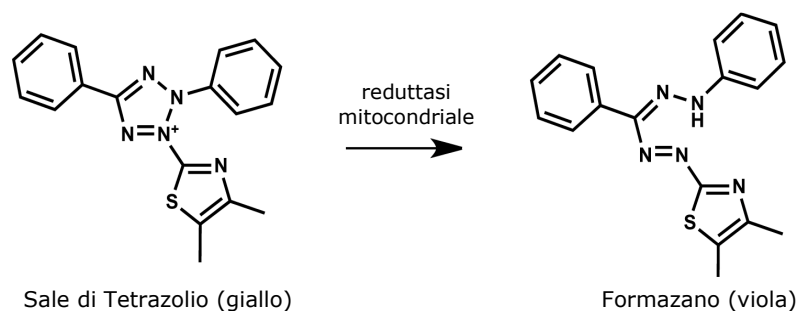


Figura 11. Riduzione enzimatica del sale di tetrazolio a formazano.

Si ritiene che l'MTT sia assunto dalle cellule tramite endocitosi, mentre i cristalli di formazano siano trasportati sulla superficie cellulare per esocitosi e che tali meccanismi di trasporto avvengano solo in cellule vive (e non in quelle morte o danneggiate). L'intensità di colorazione viola associata ai sali di formazano prodotti sarà proporzionale al numero di cellule vive presenti.

Protocollo sperimentale. Quando le cellule hanno raggiunto la confluenza, vengono tripsinizzate, sospese in terreno completo, contate e seminate alla densità di 10.000 cellule/pozzetto (in piastre da 96 pozzetti) con 200 μ L di terreno completo. Successivamente le cellule vengono incubate per 48 ore a 37°C per favorire l'adesione ai pozzetti. Terminata l'incubazione, il terreno è sostituito con uno contenente le diverse concentrazioni delle sostanze da esaminare. Dopo 24 ore di incubazione si aspira il liquido di incubazione e si aggiunge una soluzione di MTT tale che la quantità finale sia pari al 10% del volume totale del pozzetto. La piastra viene posta in agitazione per qualche minuto, quindi lasciata in incubatore per 4 ore. Si elimina poi il mezzo e si aggiungono a ciascun pozzetto 200 μ L di isopropanolo acido. Si esegue la lettura dell'intensità di colorazione alla lunghezza d'onda di 570 nm mediante VictorTM X3, PerkinElmer.

Misurazione ROS intracellulari mediante DCFH-DA

La funzione protettiva degli antiossidanti nei confronti dello stress cellulare può essere misurata ricorrendo all'impiego di un substrato reso fluorescente in seguito ad un'attivazione ossidativa intracellulare. Tale saggio fluorimetrico, comunemente adottato per valutare la produzione intracellulare di perossidi, fa riferimento all'impiego della 2'-7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA) – una molecola in grado di attraversare liberamente le membrane cellulari. La DCFH-DA è idrolizzata per via enzimatica dalle esterasi intracellulari a diclorofluorescina (DCFH) non fluorescente, perdendo così la capacità di retrodiffondere attraverso la membrana. In presenza di ROS, la DCFH viene ossidata a DCF altamente fluorescente, rivelabile e quantificabile mediante citofluorimetro o lettore di piastre (Fig. 12); la capacità antiossidante può essere pertanto correlata alla fluorescenza della sonda (Wang et al., 1999). Le cellule endoteliali in coltura sono pretrattate con i diversi campioni, quindi con DCFH-DA: ciò consente di valutare il ruolo protettivo dei metaboliti secondari nei confronti dello stress ossidativo intracellulare. La capacità di inibire la produzione di ROS può essere ulteriormente verificata incrementando lo stress ossidativo basale delle cellule HUVEC mediante esposizione ad agenti ossidanti quali il perossido d'idrogeno (H_2O_2).

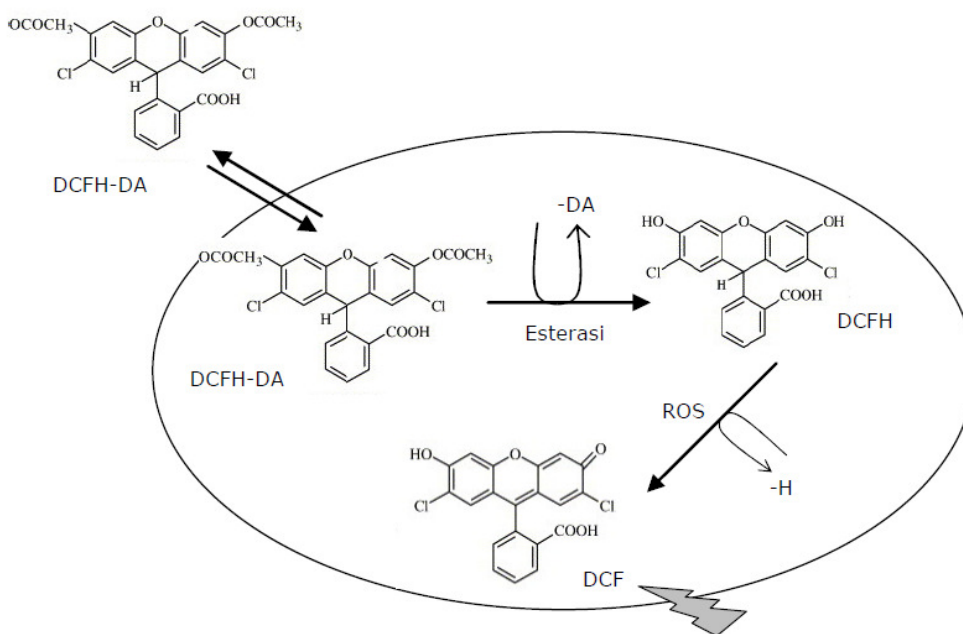


Figura 12. Meccanismo d'azione della diclorofluorescina diacetato nei saggi di misurazione dello stress ossidativo intracellulare. La DCFH-DA (non fluorescente) può diffondere liberamente attraverso la membrana plasmatica; una volta deacetilata a DCFH (non fluorescente) dalle esterasi intracellulari, diviene substrato per l'ossidazione a DCF (fluorescente) e può essere misurata per analisi fluorimetrica.

Protocollo sperimentale. Le cellule endoteliali, provenienti da due o più funicoli, vengono tripsinizzate, staccate e seminate in piastre nere da 96 pozzetti (10.000 per pozzetto) in terreno EGM-2 completo ed incubate per 48 ore. Trascorso tale periodo, il terreno è sostituito con *medium* EBM-2 e le cellule sono poi trattate con le soluzioni dei fitocostituenti addizionate al terreno, in maniera da ottenere le concentrazioni finali di 0.01 – 0.1 – 1 e 5 μM , lasciando a incubare per un'ora. Parallelamente si prevede un gruppo di pozzetti per il trattamento con N-acetilcisteina 2 mM, adottato come standard antiossidante. A 30 minuti dal termine dell'incubazione, ai trattamenti è aggiunta una soluzione di DCFH-DA in EBM-2, preparata estemporaneamente in modo da ottenere la concentrazione finale di 25 μM per pozzetto. Concluso tale periodo, il terreno presente nei pozzetti è aspirato e questi sono riempiti con una soluzione di siero al 2% in PBS, quindi si procede alla lettura fluorimetrica con lettore di piastre (VictorTM X3, *PerkinElmer*), impostando lo strumento a 37°C, λ di eccitazione a 485 nm e λ di emissione a 535 nm. Dopo aver eseguito la lettura in condizioni basali, a ciascun pozzetto si aggiungono 50 μL di una soluzione acquosa di H_2O_2 , così da ottenere la concentrazione finale di 500 μM per pozzetto. Si riprende la lettura fluorimetrica nelle medesime condizioni, effettuando scansioni regolari ogni 30 minuti fino alle 2 ore successive all'aggiunta dello stimolo pro-ossidante.

4. ELABORAZIONE DEI DATI

I dati relativi all'effetto *scavenger* dei metaboliti secondari sono stati espressi come Media \pm Errore Standard della Media (SEM) di un numero di esperimenti compreso fra tre e cinque.

Nel test DPPH il profilo di attività è stato espresso in percentuale (%) rispetto all'assorbanza della soluzione di DPPH utilizzata alla concentrazione 70 μ M e considerata come 100%. La potenza antiossidante è stata espressa ricorrendo al valore di pD_2 , definito come logaritmo negativo dell' EC_{50} ; l' EC_{50} è un parametro che indica la concentrazione di substrato che provoca il 50% della risposta antiossidante massima ottenuta sperimentalmente.

Per l'ORAC *assay* la capacità antiossidante è stata espressa come *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC), unità di misura definita come la quantità di trolox (μ L) necessaria per ottenere la stessa attività antiossidante del campione (μ Moli di equivalenti trolox per μ Moli di campione).

I dati di assorbanza ricavati dall'analisi TBARS e dalla cinetica di ossidazione delle LDL sono stati espressi come Media \pm Errore Standard della Media (SEM) di tre o più esperimenti. Nel test TBARS i dati sono stati riportati come nMoli di malondialdeide (MDA) per milligrammo di LDL, ricorrendo all'utilizzo del coefficiente ϵ di estinzione molare della MDA. Nella cinetica di ossidazione i dati sono stati espressi come *lag time*, ovvero l'intervallo di tempo, espresso in minuti, definito tra l'intercetta della linea di pendenza dei minimi quadrati della curva e la parallela all'asse delle ascisse passante per il valore minimo di assorbanza iniziale delle LDL (Fig. 8). Accanto ai valori di *lag time* è stato determinato anche il tasso di inibizione percentuale, definito come

$$T.I. (\%) = \frac{lag\ time_{campione} - lag\ time_{ctrl}}{lag\ time_{ctrl}} \cdot 100$$

I dati relativi all'effetto protettivo dei metaboliti secondari sulle cellule HUVEC sono stati espressi come Media \pm Errore Standard della Media (SEM) di un numero di esperimenti compreso fra tre e quattro. Nello studio della vitalità cellulare mediante MTT test i trattamenti sono stati espressi come percentuale (%) rispetto al controllo, considerato come 100%.

Il profilo di attività antiossidante intracellulare è stato espresso come intensità di fluorescenza relativa (MFI) normalizzato a 100% per ciascun controllo in condizioni basali.

La valutazione di significatività dei dati sperimentali è stata effettuata mediante test ANOVA per dati appaiati e Dunnett post-test; le differenze sono state considerate significative per valori di $p < 0,05$.

L'elaborazione dei dati, i grafici e l'analisi statistica sono stati ottenuti con l'ausilio del software GraphPad Prism, versione 5.01 (Chen et al., 2013).

5. RISULTATI

Metodi *in vitro*

Per poter apprezzare l'attività antiossidante dei singoli composti naturali si è approntata un'analisi preliminare di tipo qualitativo ricorrendo all'uso della *Thin Layer Chromatography* (TLC), secondo la metodica descritta nel capitolo "Materiali e metodi" (Tepe et al., 2005); il saggio è stato eseguito utilizzando l'acido ascorbico come standard di riferimento. I risultati dello studio condotto sui metaboliti secondari, apprezzabili come aree di decolorazione di diversa ampiezza ed intensità, sono riportati in Fig. 13.

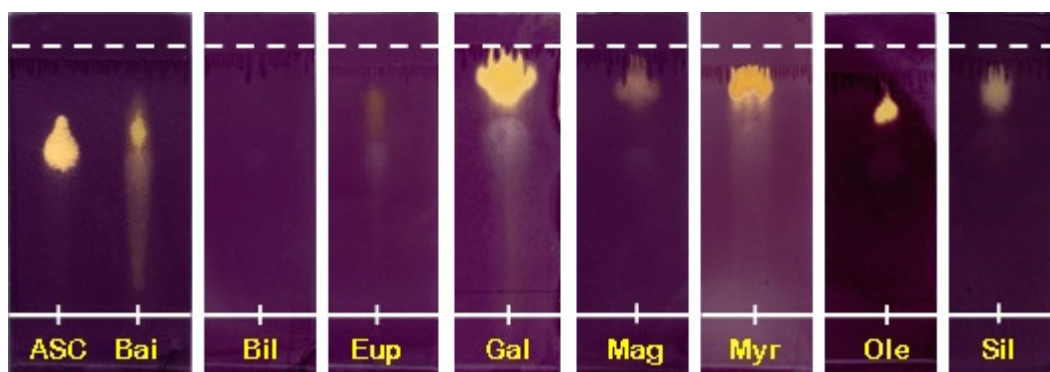


Figura 13. Lastre TLC dei fitocomposti; ciascun campione è stato caricato parallelamente ad una soluzione di acido ascorbico di pari concentrazione, considerato come standard di riferimento. Da sinistra verso destra: acido ascorbico, baicaleina, bilobalide, eupatorina, galangina, magnololo, miricetina, oleuropeina, silibinina.

L'analisi TLC, condotta nelle medesime condizioni di eluizione della fase mobile e di concentrazione dei campioni, ha evidenziato una buona capacità antiossidante da parte di tutti i fitocostituenti ad eccezione di bilobalide, per il quale non è stata visualizzata alcuna decolorazione apprezzabile a corsa cromatografica avvenuta. Il diverso spostamento dei campioni caricati dipende dalla differente ripartizione dei composti tra la fase stazionaria e la fase mobile.

Per quantificare l'effetto *scavenger* dei composti è stata successivamente eseguita una lettura spettrofotometrica dell'assorbanza della soluzione di DPPH[•] trattata con concentrazioni scalari e crescenti di ciascun fitocomposto. Il grafico riportato in Fig. 14 riassume il profilo antiossidante dei fitocostituenti entro l'intervallo 10^{-7} – 10^{-2} M.

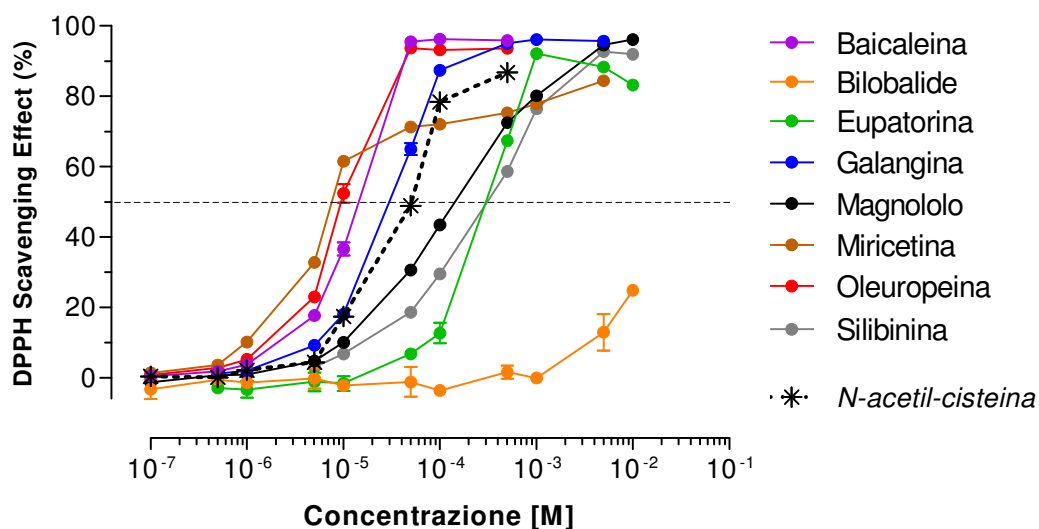


Figura 14. Profilo dell'attività *scavenger* dei fitocostituenti a concentrazioni scalari e crescenti. La linea orizzontale tratteggiata indica i valori di concentrazione corrispondenti al 50% dell'effetto antiradicalico (EC_{50}).

Sulla base del profilo antiradicalico di ciascuna curva, è stato possibile quantificare l'efficienza antiossidante mediante il calcolo dei valori di EC_{50} (parametro che indica la concentrazione efficace di substrato che provoca il 50% della risposta antiossidante massima ottenuta sperimentalmente), successivamente espressi ricorrendo al valore di pD_2 , definito come logaritmo negativo dell' EC_{50} ; ciò ha permesso di definire un preciso ordine di potenza antiossidante, come riportato in Tab. 15 – dove i fitocostituenti sono elencati secondo una classificazione decrescente di potenza:

Tabella 15. Potenza antiossidante dei composti naturali determinata mediante DPPH: *scavenging assay*.

Fitocomposti	$pD_2 \pm SEM$
Miricetina	5.234 ± 0.040
Oleuropeina	5.036 ± 0.036
Baicaleina	4.883 ± 0.013
Galangina	4.491 ± 0.014
Magnololo	3.837 ± 0.022
Silibina	3.657 ± 0.030
Eupatorina	3.519 ± 0.069
NAC	4.382 ± 0.023

I dati sono espressi come Media \pm SEM di cinque esperimenti

Per la bilobalide non è stato possibile definire valori attendibili di EC_{50} , come si può riscontrare dal grafico proposto in Fig. 14.

Accanto alla valutazione del meccanismo di trasferimento elettronico effettuata tramite il DPPH assay, si è indagato il potenziale antiossidante dei composti sulla base della cessione di atomi di idrogeno (HAT), in maniera tale da poter validare i dati precedentemente illustrati con una caratterizzazione “incrociata” maggiormente solida ed attendibile. I dati ottenuti mediante l'ORAC assay sono riportati in Fig. 16.

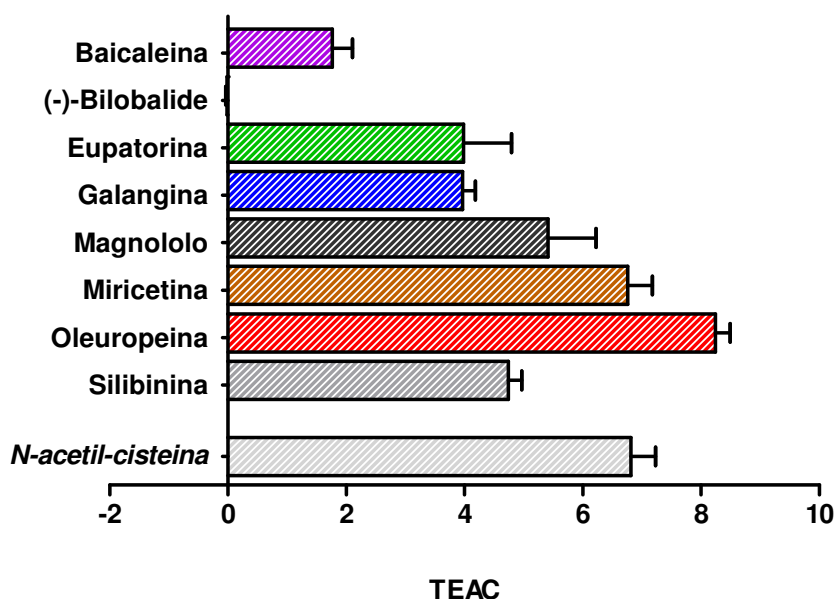


Figura 16. Profilo dell'attività ORAC dei fitocostituenti. I valori sono espressi in TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*); il protocollo è riportato nella sezione “Materiali e metodi”, pag. 44.

Dal grafico appare evidente come tutti i composti naturali studiati risultino avere una buona capacità antiossidante, ad eccezione della bilobalide; tali risultati confermano in larga parte la precedente analisi, ottenuta mediante DPPH scavenging assay. Nel dettaglio, la potenza antiossidante dei fitocomposti è riportata secondo ordine decrescente in Tab. 17.

Tabella 17. Potenza antiossidante dei composti naturali determinata mediante ORAC assay.

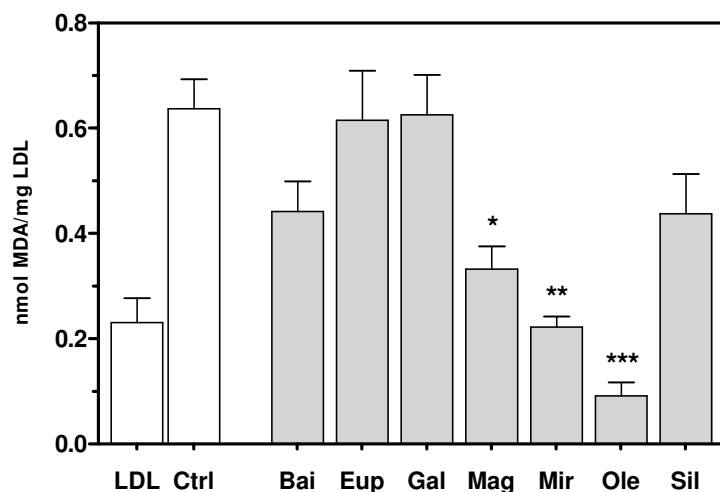
Fitocomposti	TEAC ± SEM
Oleuropeina	8.25 ± 0.49
Miricetina	6.76 ± 0.83
Magnololo	6.31 ± 1.57
Silibinina	4.74 ± 0.44
Eupatorina	3.98 ± 2.00
Galangina	3.97 ± 0.50
Baicaleina	1.77 ± 0.59
Bilobalide	-1.90 × 10 ⁻² ± 3.52 × 10 ⁻²
NAC	6.81 ± 0.42

I dati sono espressi come Media ± SEM di cinque esperimenti

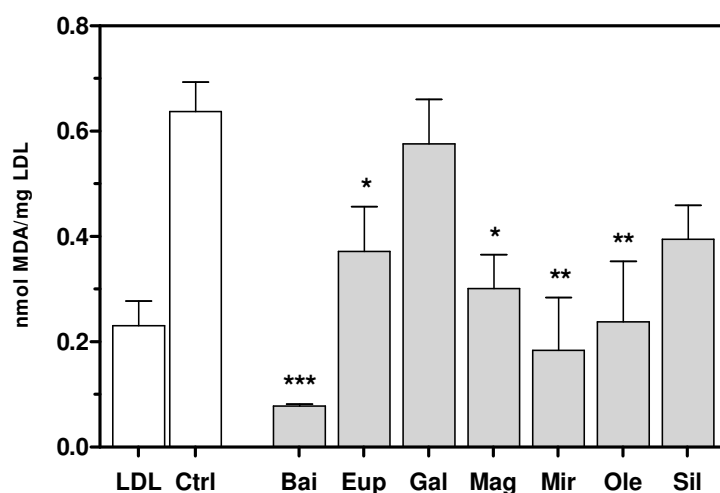
Metodi *ex vivo*

Una volta completati gli *screening* di base sull'attività antiradicalica dei fitocomposti, si è scelto un approccio sperimentale *ex vivo* nei confronti di LDL umane isolate dal plasma di volontari sani, estratte mediante ultracentrifugazione a gradiente di densità (protocollo preparativo riportato nella sezione "Materiali e metodi").

Inizialmente è stata eseguita l'analisi TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*), finalizzata alla misurazione della malondialdeide come prodotto finale della degradazione perossidativa delle LDL sottoposte ad uno stimolo pro-ossidante, in presenza dei composti naturali addizionati alla sospensione di lipoproteine umane. L'analisi è stata condotta scegliendo due diverse concentrazioni dei metaboliti secondari: 2.5 µM e 5 µM. I grafici ottenuti sono riportati in Fig. 18a) e 18b).



a) Trattamenti alla concentrazione di 2.5 μ M



b) Trattamenti alla concentrazione di 5.0 μ M

Figura 18. Profilo TBARS dei fitocostituenti nei confronti di LDL umana, alle due diverse concentrazioni utilizzate nello studio. I valori sono espressi come nMoli di malondialdeide (MDA) per milligrammo di LDL, media \pm SEM di tre o più esperimenti. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ trattamento verso controllo.

I valori di controllo (“Ctrl”) sono riferiti alle LDL ossidate con CuSO_4 senza alcun trattamento preventivo con agenti antiossidanti. Dai dati ottenuti emerge un diverso comportamento protettivo a seconda della concentrazione di fitocostituenti adottata: nel primo caso, alla concentrazione di 2.5 μ M (Figura 4a) oleuropeina, miricetina e magnololo hanno dimostrato una migliore attività antiossidante, mentre alle concentrazioni di 5 μ M (Figura 4b) hanno dimostrato maggiore efficacia, nell’ordine, baicaleina, miricetina ed oleuropeina. I valori, espressi come media \pm SEM di tre o più esperimenti, sono riportati in ordine decrescente di attività antiossidante nelle tabelle 19 e 20.

Tabella 19. Valori TBARS riferiti alle concentrazioni 2.5 μ M

Fitocostituenti	nMol MDA / mg LDL \pm SEM
Oleuropeina	0.091 \pm 0.025
Miricetina	0.222 \pm 0.020
Magnololo	0.332 \pm 0.043
Silibinina	0.437 \pm 0.076
Baicaleina	0.442 \pm 0.057
Eupatorina	0.615 \pm 0.094
Galangina	0.626 \pm 0.076
Ctrl	0.637 \pm 0.056

Tabella 20. Valori TBARS riferiti alle concentrazioni 5.0 μ M

Fitocostituenti	nMol MDA / mg LDL \pm SEM
Baicaleina	0.078 \pm 0.003
Miricetina	0.183 \pm 0.101
Oleuropeina	0.238 \pm 0.115
Magnololo	0.301 \pm 0.064
Eupatorina	0.372 \pm 0.085
Silibinina	0.395 \pm 0.065
Galangina	0.576 \pm 0.084
Ctrl	0.637 \pm 0.056

Per una migliore valutazione dei dati ottenuti dall'analisi TBARS, è stato eseguito un monitoraggio spettrofotometrico delle variazioni di assorbanza delle LDL sottoposte a stress ossidativo, in presenza ed in assenza dei fitocostituenti. Tale studio ha permesso di consolidare i dati relativi al profilo antiossidante dei fitocostituenti ricorrendo ad una valutazione cinetica. Le curve relative a ciascun metabolita secondario sono riproposte di seguito (Figg. 21-27): ogni grafico pone a confronto una curva di controllo, relativa alle sole LDL sottoposte ad ossidazione in presenza di CuSO_4 , con due diverse curve relative a due distinte concentrazioni del composto naturale studiato. Ogni grafico è da considerarsi rappresentativo di tre o più esperimenti.

La baicaleina (Fig. 21) è stata impiegata alle concentrazioni di 1 e 1.5 μ M, evidenziando un *lag time* di 123 ± 7 minuti e 150 ± 27 minuti, rispettivamente. I tassi di inibizione percentuale, ottenuti mediante confronto con il relativo *lag time* di controllo, si sono attestati al 16,44% per il trattamento alla concentrazione di 1 μ M e al 42,64% per il trattamento a 1.5 μ M.

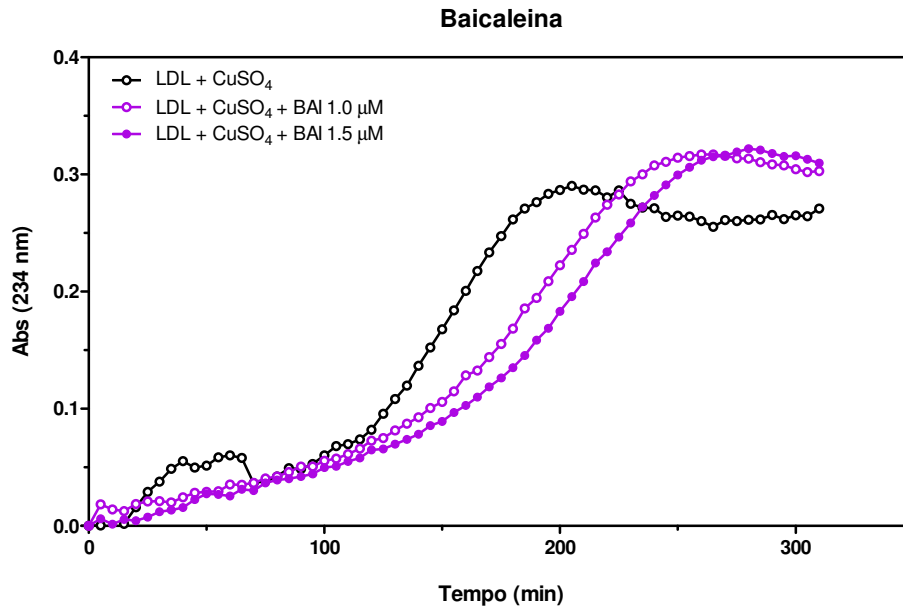


Figura 21. Cinetica di ossidazione delle LDL in assenza di antiossidante (curva in nero) e in presenza di baicaleina 1.0 μM e 1.5 μM (curve in viola).

L'eupatorina è stata studiata alle medesime concentrazioni (Fig. 22); la curva di controllo delle sole LDL in ambiente ossidante ha evidenziato un *lag time* pari a 172 ± 71 minuti, tuttavia per le curve dei trattamenti con il fitocomposto la determinazione del *lag time* non è risultata attendibile e non è stato possibile definire i relativi tassi di inibizione percentuale.

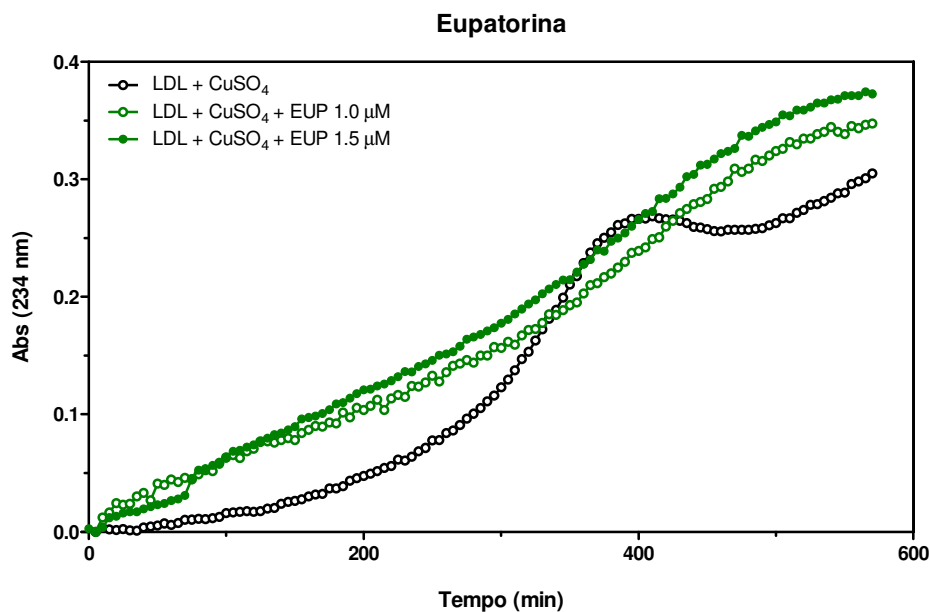


Figura 22. Cinetica di ossidazione delle LDL in assenza di antiossidante (curva in nero) e in presenza di eupatorina 1.0 μM e 1.5 μM (curve in verde).

Anche la galangina è stata studiata alle concentrazioni di 1 μM e 1.5 μM (Fig. 23); i tassi di inibizione percentuale, calcolati per confronto tra i valori di *lag time* del campione e del controllo, si sono attestati al 15,46% per la concentrazione di 1 μM e al 57,99% per il trattamento a 1.5 μM .

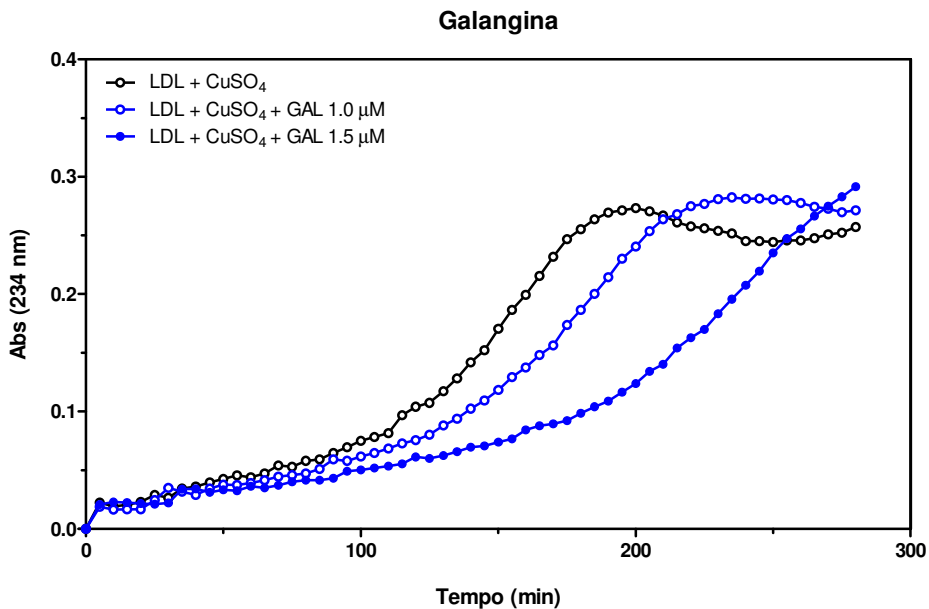


Figura 23. Cinetica di ossidazione delle LDL in assenza di antiossidante (curva in nero) e in presenza di galangina 2.0 μM e 3.0 μM (curve in blu).

Il magnololo, invece, è stato incubato alle concentrazioni di 0.5 μM e 1 μM (Fig. 24).

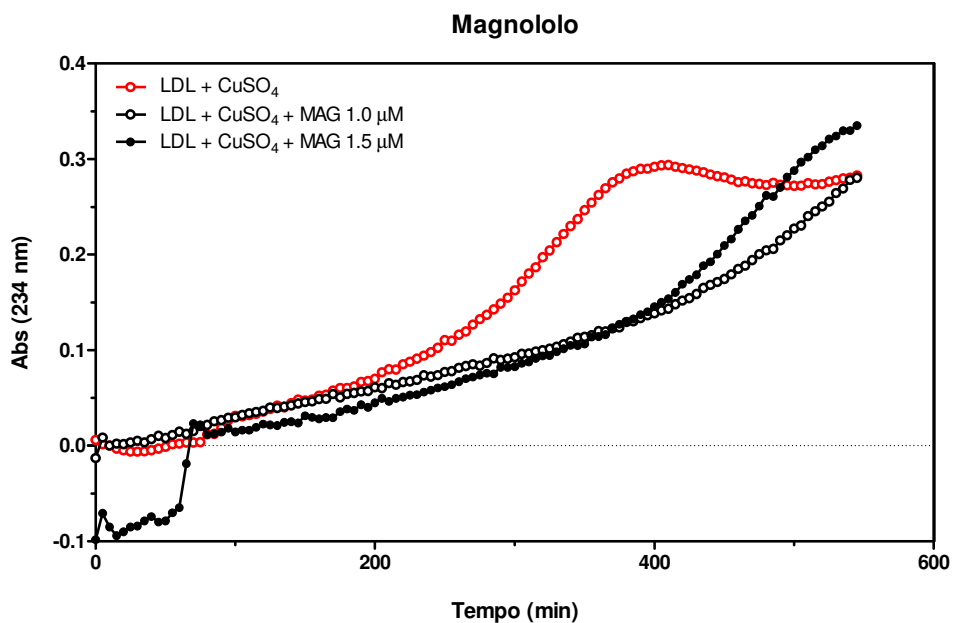


Figura 24. Cinetica di ossidazione delle LDL in assenza di antiossidante (curva in rosso) e in presenza di magnololo 0.5 μM e 1.0 μM (curve in nero).

Il valore del *lag time* di controllo è stato pari a 183 ± 21 minuti, mentre i tempi di latenza dei due trattamenti si sono attestati a 257 ± 66 minuti per la concentrazione di $0.5 \mu\text{M}$ e a 275 ± 61 minuti per quella $1 \mu\text{M}$. Ciò ha permesso di quantificare i valori di inibizione percentuale, pari a $39,18\%$ e $49,49\%$, rispettivamente.

La miricetina (Fig. 25) ha riportato i tempi di 201 ± 50 minuti per il trattamento a $1 \mu\text{M}$ e 351 ± 82 minuti alla concentrazione di $1.5 \mu\text{M}$, evidenziando dei tassi di inibizione percentuale di $13,59\%$ e $98,86\%$, rispettivamente.

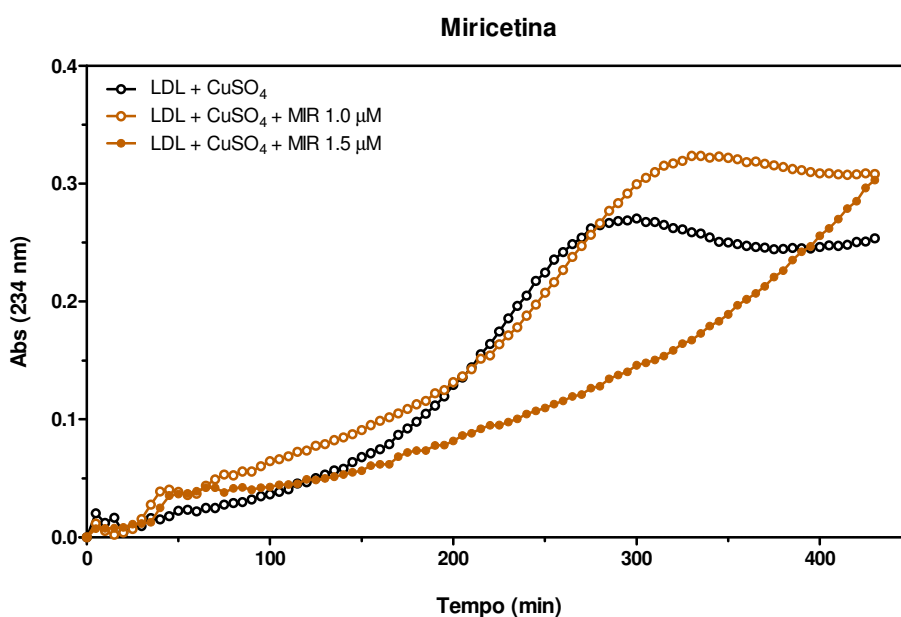


Figura 25. Cinetica di ossidazione delle LDL in assenza di antiossidante (curva in nero) e in presenza di miricetina $0,5 \mu\text{M}$ e $1,0 \mu\text{M}$ (curve in marrone).

Anche le curve ottenute con l'oleuropeina, alle stesse concentrazioni di studio, hanno dimostrato un buon effetto antiossidante (Fig. 26): i tassi di inibizione percentuale sono stati calcolati al $22,28\%$ per il trattamento $1 \mu\text{M}$ e al $104,42\%$ per il trattamento $1.5 \mu\text{M}$.

Similmente all'eupatorina, anche per la silibinina non è stato possibile estrapolare in maniera attendibile il *lag time* delle curve relative ai trattamenti (1.0 e $1.5 \mu\text{M}$), dal momento che il loro profilo non ha evidenziato alcun punto di flesso (Fig. 27).

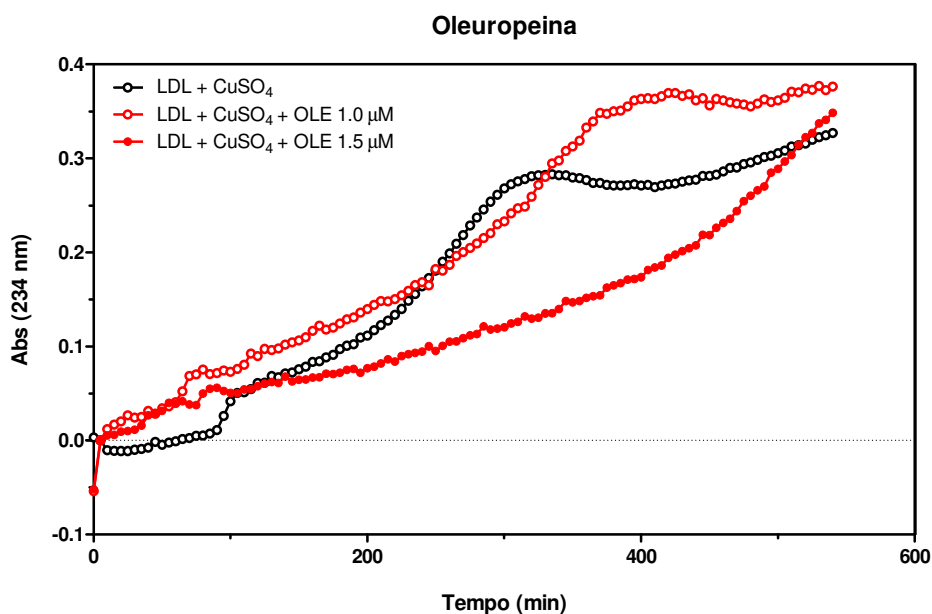


Figura 26. Cinetica di ossidazione delle LDL in assenza di antiossidante (curva in nero) e in presenza di oleuropeina 0.5 μM e 1.0 μM (curve in rosso).

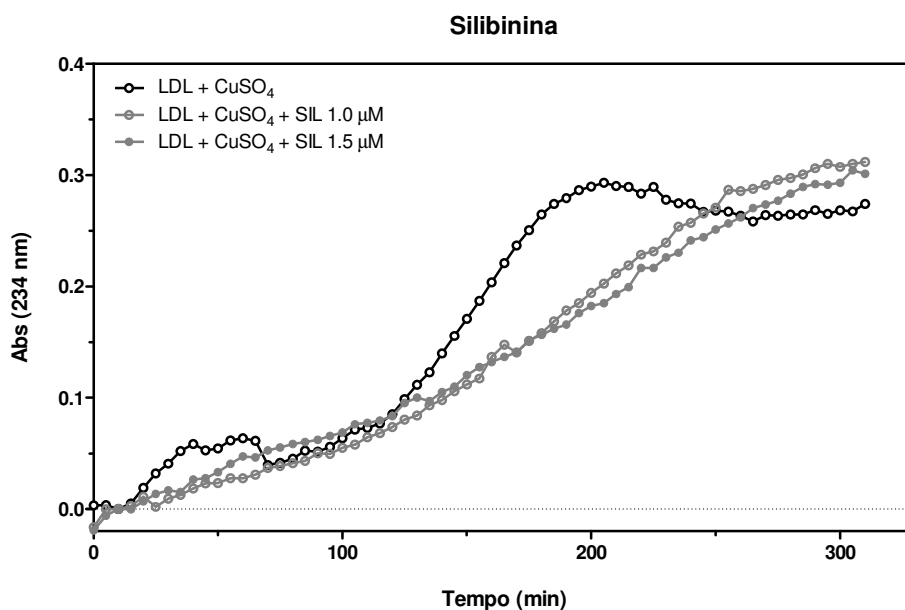


Figura 27. Cinetica di ossidazione delle LDL in assenza di antiossidante (curva in nero) e in presenza di silibinina 1.0 μM e 1.5 μM (curve in grigio).

I valori di *lag time* riferiti a ciascun trattamento e ai relativi controlli sono stati riassunti in Tab. 28; il tasso di inibizione percentuale è stato definito mediante la formula riportata nella sezione “Elaborazione dei dati”.

Come si può facilmente evincere dal confronto dei dati, oleuropeina, miricetina e magnololo hanno dimostrato un più elevato tasso di inibizione alla concentrazione 1 μM , mentre eupatorina, silibinina e baicaleina hanno evidenziato, alla medesima concentrazione, un profilo antiossidante del tutto trascurabile e scarsamente protettivo nei confronti della perossidazione lipidica delle LDL.

Tabella 28. Valori di *lag time* di ciascun fitocostituente, dei relativi controlli e del tasso di inibizione percentuale. *: $p < 0,05$ *lag time* campione verso *lag time* controllo.

Fitocomposti	Concentrazione	Lag time CTRL (min)	Lag time comp. (min)	T. inibizione (%)
Baicaleina	1.0 μM	106 \pm 5	123 \pm 7	16.44 %
	1.5 μM		150 \pm 27	42.64 %
Eupatorina	1.0 μM	172 \pm 71	---	---
	1.5 μM		---	---
Galangina	2.0 μM	111 \pm 28	127 \pm 22 *	15.46 %
	3.0 μM		177 \pm 53 *	57.99 %
Magnololo	0.5 μM	183 \pm 21	257 \pm 66	39.18 %
	1.0 μM		275 \pm 61 *	49.49 %
Miricetina	0.5 μM	176 \pm 37	201 \pm 50	13.59 %
	1.0 μM		351 \pm 82 *	98.86%
Oleuropeina	0.5 μM	183 \pm 33	221 \pm 18 *	22.28 %
	1.0 μM		374 \pm 78 *	104.42 %
Silibinina	1.0 μM	212 \pm 97	---	---
	1.5 μM		---	---

Sulla base del tasso di inibizione percentuale dei fitocomposti è stato possibile definire un ordine di potenza antiossidante: magnololo \geq oleuropeina \geq miricetina $>$ baicaleina $>$ galangina.

Una volta constatate le potenzialità antiossidanti dei fitocostituenti nei confronti delle LDL, si è valutata l'attività a livello cellulare ricorrendo all'uso di cellule endoteliali umane isolate dalla vena ombelicale (HUVEC), estratte secondo metodica enzimatica descritta nella sezione "Materiali e metodi" (Jaffe et al., 1973).

Per studiare un'eventuale influenza dei fitocostituenti sulla proliferazione cellulare e determinare l'intervallo di concentrazioni adeguato per poter valutare il profilo antiossidante senza provocare inibizioni nella crescita cellulare, si è scelto di eseguire uno studio preliminare mediante MTT test. I grafici riportati di seguito illustrano il comportamento cellulare a seguito di un'incubazione di 24 ore con i fitocostituenti a concentrazioni comprese tra 0.1 e 10 μM (Fig. 29).

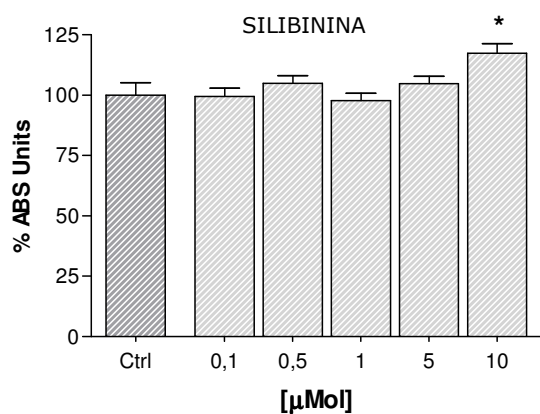
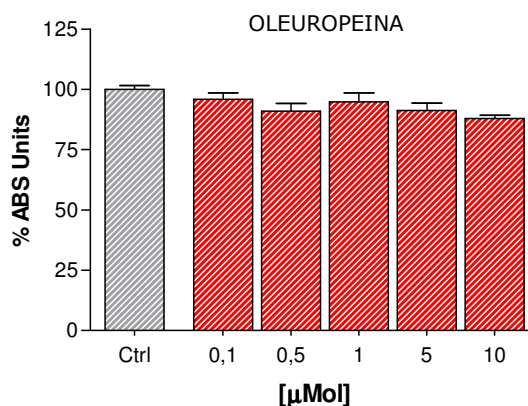
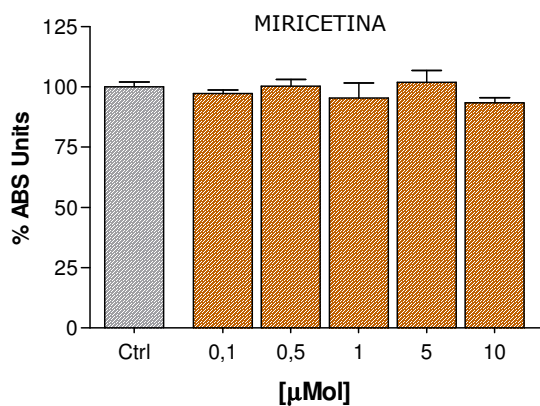
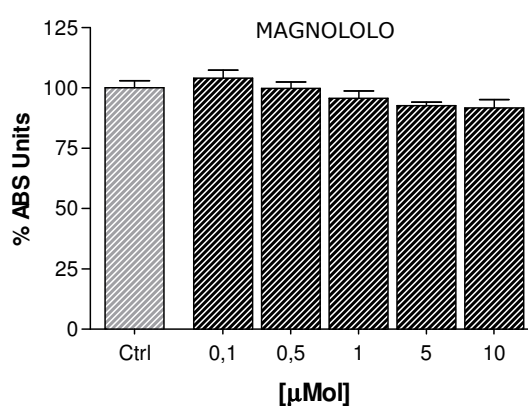
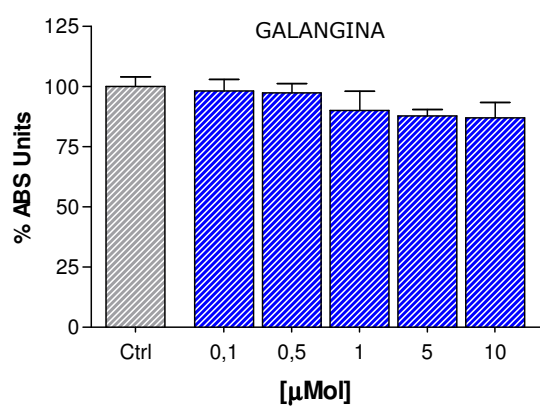
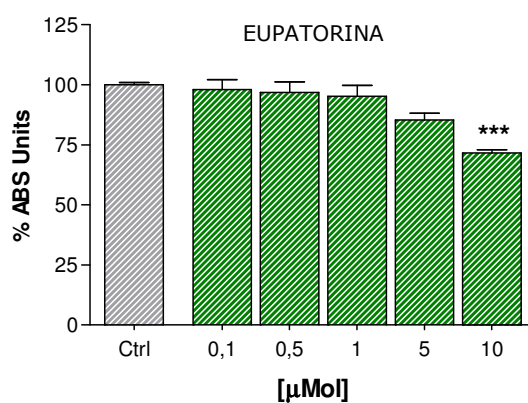
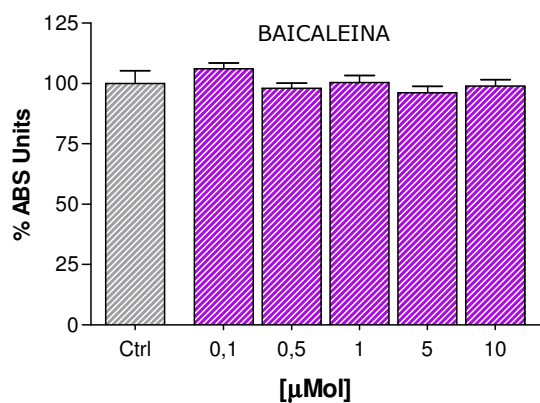


Figura 29. Studio dell'attività dei fitocomposti sulla proliferazione cellulare mediante MTT test, a concentrazioni comprese tra 0,1 μMol e 10 μMol. *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$ trattamento verso ctrl.

Come si può evincere dai grafici, l'intervallo di concentrazioni adottato non ha dimostrato significative variazioni di vitalità cellulare, ad eccezione di eupatorina e silibina, che alla concentrazione di 10 μM hanno mostrato due comportamenti opposti: una diminuzione di crescita cellulare del $28.2 \pm 1.3\%$ con l'eupatorina ed un effetto proliferativo del $17.4 \pm 4.0\%$ per la silibina. Per questa ragione si è scelto di non utilizzare la concentrazione di 10 μM nelle successive sperimentazioni, al fine di escludere possibili influenze sulla vitalità cellulare che potessero pregiudicare gli esiti degli *screening* sullo stress ossidativo intracellulare.

L'attività degli antiossidanti verso lo stress cellulare è stata determinata ricorrendo all'impiego della 2'-7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA), una molecola che in presenza di specie reattive dell'ossigeno (ROS) è ossidata a DCF altamente fluorescente, rivelabile e quantificabile mediante lettore di piastre. La capacità di inibire la produzione di ROS è stata misurata sia in condizioni basali (ovvero senza stress ossidativi indotti dall'esterno), sia inducendo uno stress ossidativo sulle HUVEC mediante esposizione a perossido d'idrogeno (H_2O_2), in opportune condizioni di concentrazione e di tempo.

I grafici di seguito riportati illustrano il comportamento delle cellule endoteliali in coltura a seguito della pre-incubazione dei fitocostituenti per un'ora, entro l'intervallo di concentrazione 0.01 – 5 μM .

La baicaleina (Fig. 30) ha evidenziato in condizioni basali un profilo antiossidante solo alla concentrazione di 0.01 μM , con valori di fluorescenza relativa pari a $83.8 \pm 2.0\%$ rispetto al controllo (100%); tali valori risultano di poco inferiori anche al trattamento con N-acetilcisteina (NAC) 2 mM, adottato come standard antiossidante ($91.6 \pm 3.3\%$).

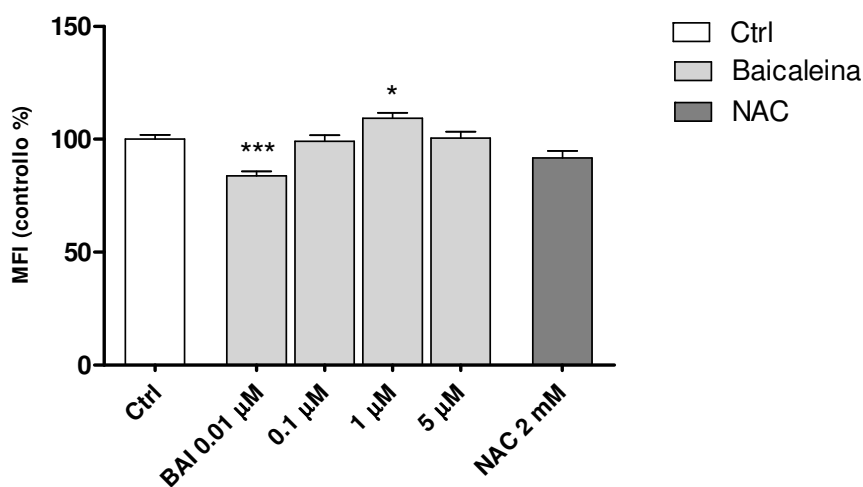


Figura 30. Effetti di baicaleina sulla produzione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno in condizioni basali. Ogni dato rappresenta la media \pm SEM di 5 esperimenti. *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$ trattamento verso controllo. BAI: baicaleina. NAC: N-acetilcisteina.

L'eupatorina (Fig. 31) ha mostrato una significativa capacità antiossidante in condizioni basali solo alla concentrazione di 0.01 μM , con una diminuzione dello stress ossidativo intracellulare pari a $-8.6 \pm 2.2\%$ rispetto al controllo; i trattamenti a 1 μM e 5 μM hanno invece manifestato un'influenza pro-ossidante, con valori superiori al controllo di $9.6 \pm 1.6\%$ e $12.5 \pm 2.7\%$, rispettivamente.

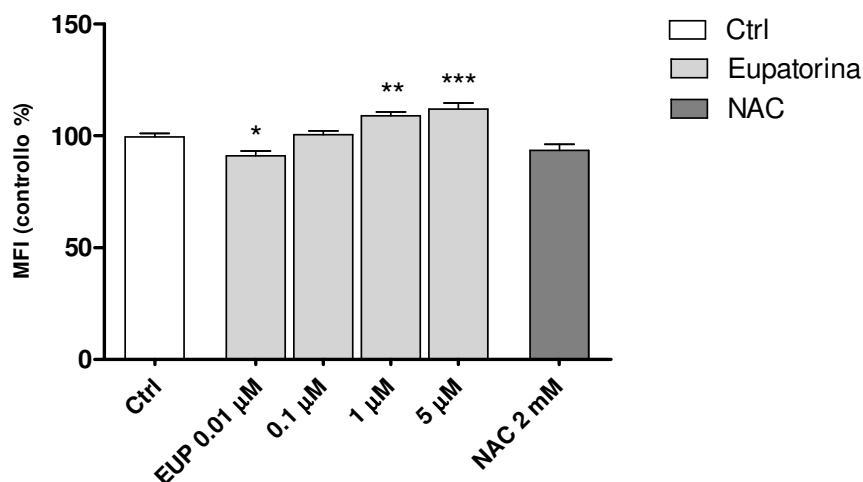


Figura 31. Effetti di eupatorina sulla produzione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno in condizioni basali. Ogni dato rappresenta la media \pm SEM di 5 esperimenti. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ trattamento verso controllo. EUP: eupatorina. NAC: N-acetilcisteina.

In Fig. 32 è riportato il grafico relativo al trattamento con galangina. Pressochè tutte le concentrazioni hanno evocato una diminuzione dello stress ossidativo, maggiore alla concentrazione di 5 μM , che ha registrato valori di fluorescenza pari a $77.2 \pm 1.7\%$ rispetto al controllo, con una riduzione di circa il 20%.

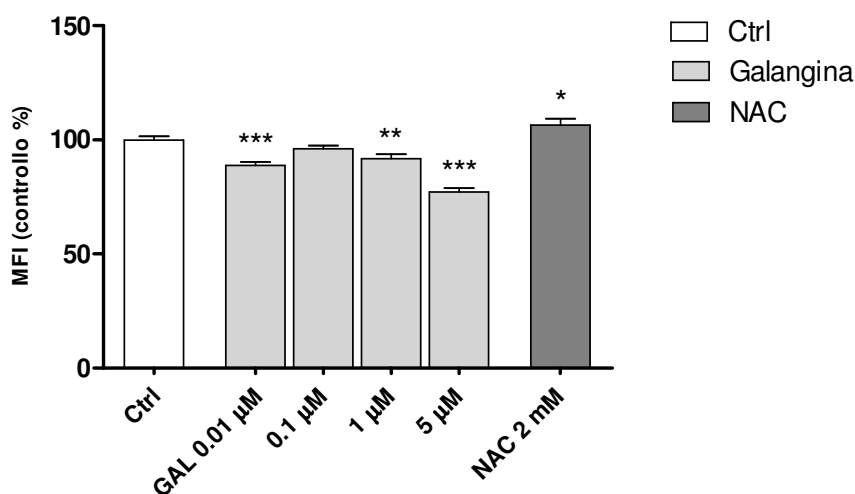


Figura 32. Effetti di galangina sulla produzione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno in condizioni basali. Ogni dato rappresenta la media \pm SEM di 5 esperimenti. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ trattamento verso controllo. GAL: galangina. NAC: N-acetilcisteina.

In maniera del tutto inaspettata, il magnololo ha mostrato una spiccata capacità pro-ossidante alle concentrazioni di 1 μM e 5 μM (Fig. 33); in condizioni basali, l'incremento dello stress ossidativo intracellulare si è attestato a valori pari a $141.4 \pm 2.2\%$ e $202.2 \pm 3.7\%$, rispettivamente.

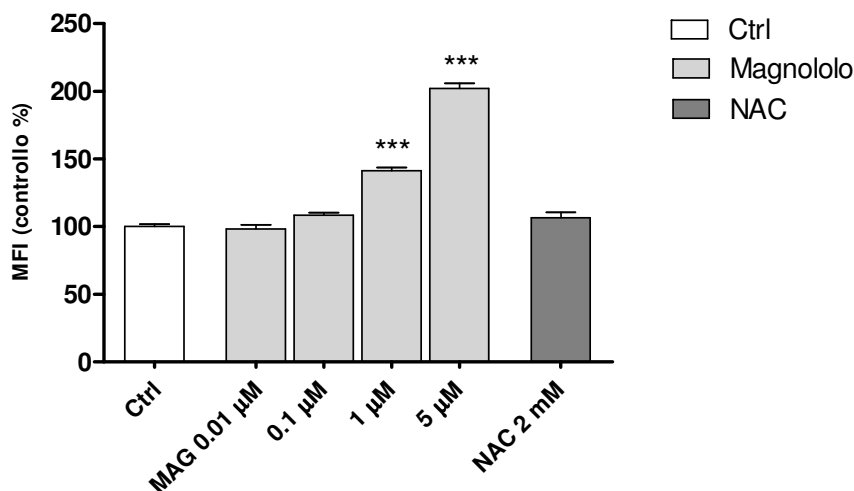


Figura 33. Effetti del magnololo sulla produzione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno in condizioni basali. Ogni dato rappresenta la media \pm SEM di 5 esperimenti. ***: $p < 0,001$ trattamento verso controllo. MAG: magnololo. NAC: N-acetilcisteina.

La miricetina, invece, ha evidenziato un comportamento ambiguo (Fig. 34): i trattamenti a 0.01 μM e 5 μM hanno mostrato un blando carattere protettivo, registrando una diminuzione della fluorescenza intracellulare pari a $14.6 \pm 1.5\%$ e $12.5 \pm 2.0\%$, rispettivamente. I trattamenti a 1 μM e 5 μM non hanno invece mostrato alcuna significativa influenza nei confronti dello stress ossidativo.

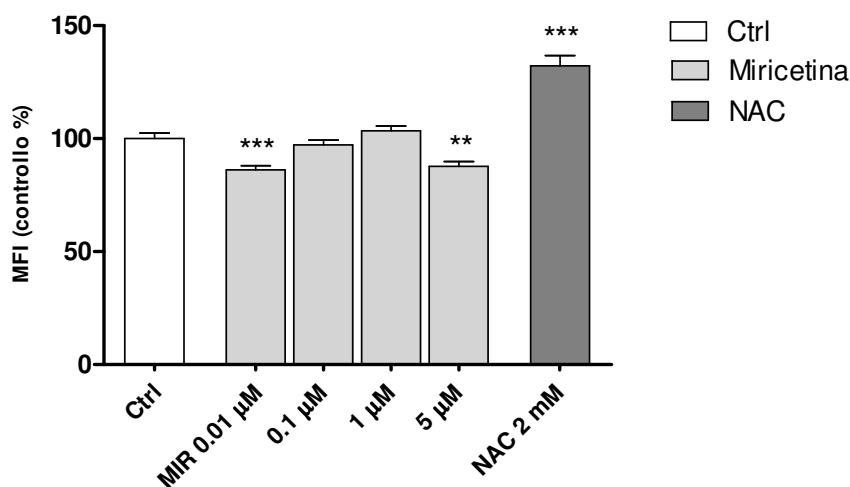


Figura 34. Effetti di miricetina sulla produzione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno in condizioni basali. Ogni dato rappresenta la media \pm SEM di 5 esperimenti. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ trattamento verso controllo. MIR: miricetina. NAC: N-acetilcisteina.

L'oleuropeina (Fig. 35) ha evidenziato un significativo carattere antiossidante soltanto alla concentrazione più elevata in studio, con un'intensità relativa di fluorescenza pari a $79.4 \pm 2.2\%$ rispetto al controllo.

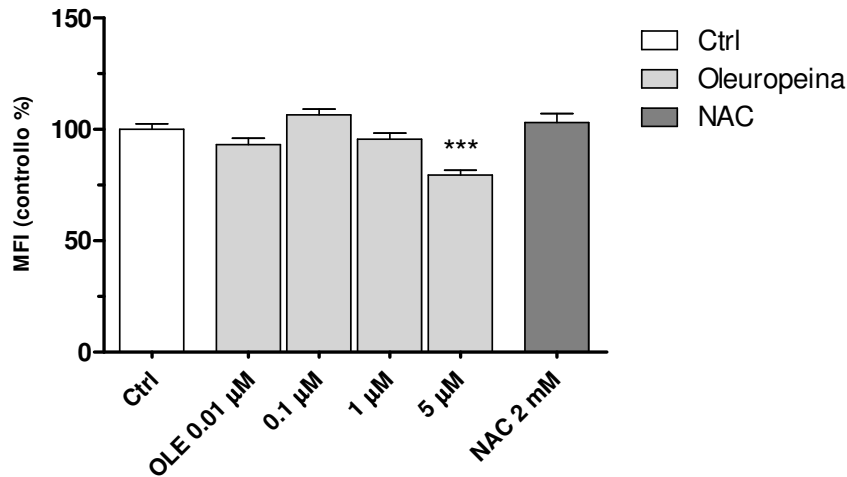


Figura 35. Effetti di oleuropeina sulla produzione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno in condizioni basali. Ogni dato rappresenta la media \pm SEM di 5 esperimenti. ***: $p < 0,001$ trattamento verso controllo. OLE: oleuropeina. NAC: N-acetilcisteina.

Infine, la silibinina ha indotto una diminuzione della fluorescenza intracellulare del $16.5 \pm 1.4\%$ alla concentrazione di $0.01 \mu\text{M}$, ma allo stesso tempo ha esercitato un effetto blandamente pro-ossidante nei confronti delle HUVEC alle concentrazioni più elevate, con valori di fluorescenza pari a $109.5 \pm 2.3\%$ per il trattamento a $1 \mu\text{M}$ e di $107.0 \pm 2.4\%$ per quello a concentrazione $5 \mu\text{M}$ (Fig. 36).

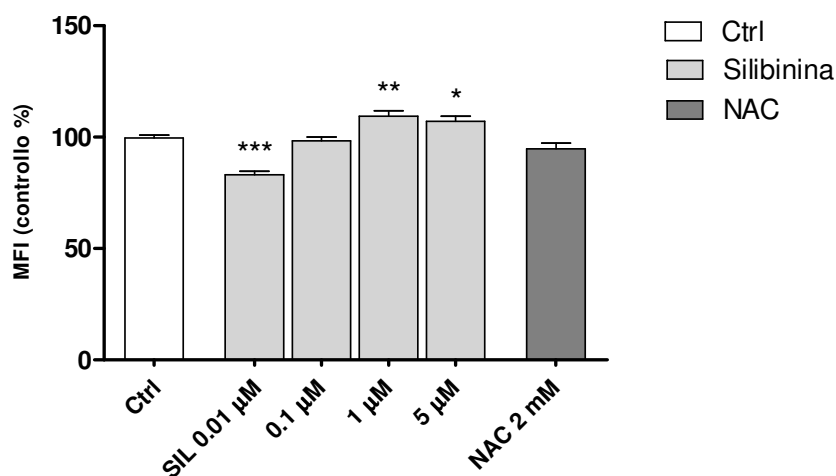


Figura 36. Effetti di silibinina sulla produzione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno in condizioni basali. Ogni dato rappresenta la media \pm SEM di 5 esperimenti. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ trattamento verso controllo. SIL: silibinina. NAC: N-acetilcisteina.

Gli esperimenti sono proseguiti simulando una condizione di stress ossidativo aggravato a carico delle cellule endoteliali; tale condizione è stata ottenuta mediante l'aggiunta nei pozzetti di una soluzione di perossido di idrogeno (H_2O_2), alla concentrazione finale di 500 μM incubando per due ore. Trascorso tale intervallo di tempo, è stata eseguita la lettura spettrofotometrica.

Come per i grafici precedentemente illustrati, anche in questo caso ciascuna piastra è stata pretrattata con soluzioni dei fitocostituenti per un'ora, nell'intervallo di concentrazione 0.01 – 5 μM .

In condizioni di aumentato stress ossidativo la baicaleina non ha evidenziato variazioni significative di intensità di fluorescenza, suggerendo un profilo protettivo trascurabile nei confronti delle cellule endoteliali in coltura (Fig. 37).

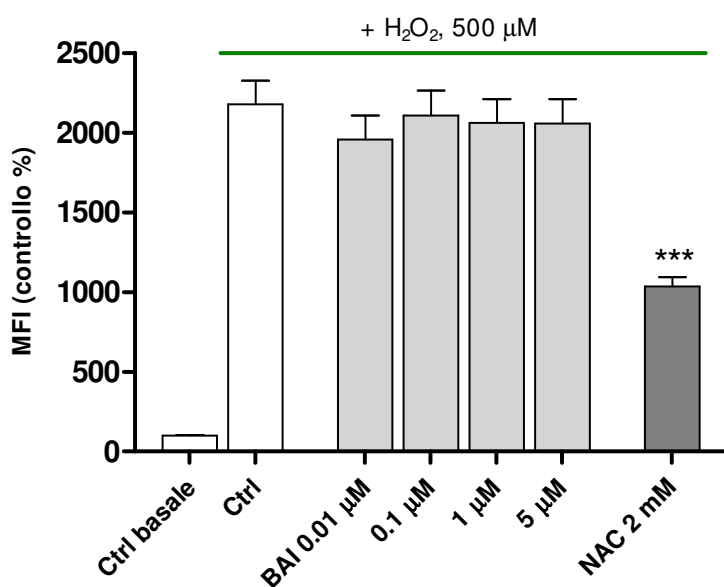


Figura 37. Effetti di baicaleina sulla produzione intracellulare di ROS in condizioni di stress ossidativo indotto. Ogni dato rappresenta la media \pm SEM di 5 esperimenti. ***: $p < 0,001$ trattamento verso controllo.

Similmente, anche l'eupatorina non ha mostrato significative variazioni nell'intensità di fluorescenza rispetto al controllo trattato con H_2O_2 ; anche in questo caso, solo il trattamento con NAC 2 mM ha permesso di apprezzare un valore di fluorescenza relativa pari a $66.8 \pm 2.5\%$ rispetto al controllo (Fig. 38).

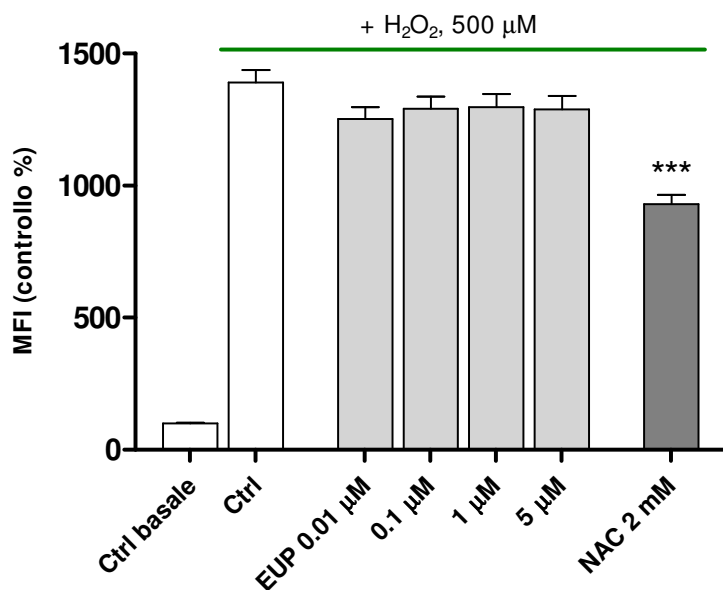


Figura 38. Effetti di eupatorina sulla produzione intracellulare di ROS in condizioni di stress ossidativo indotto. Ogni dato rappresenta la media \pm SEM di 5 esperimenti. ***: $p < 0,001$ trattamento verso controllo.

La galangina, invece, ha manifestato alla più elevata concentrazione un notevole carattere protettivo nei confronti dello stress ossidativo indotto, evidenziando un valore di fluorescenza relativa pari a $73.9 \pm 2.3\%$ rispetto al controllo trattato con H₂O₂ - azione simile a quella indotta da NAC 2 mM (Fig. 39).

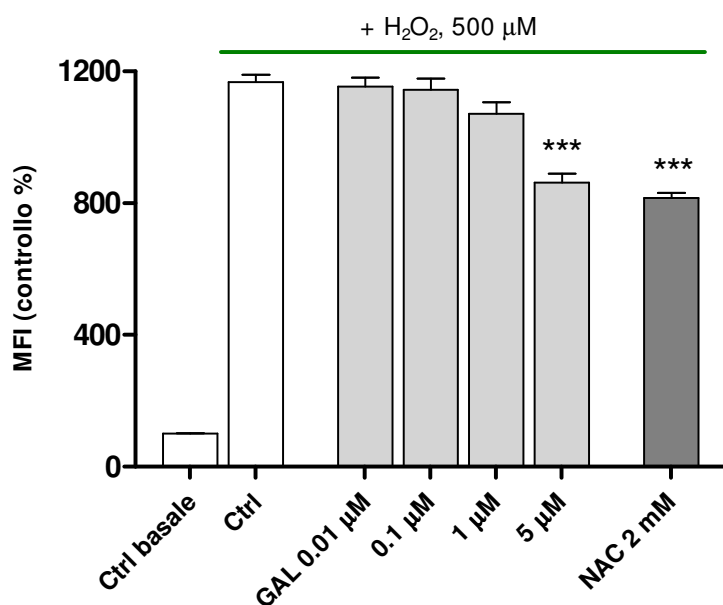


Figura 39. Effetti di galangina sulla produzione intracellulare di ROS in condizioni di stress ossidativo indotto. Ogni dato rappresenta la media \pm SEM di 5 esperimenti. ***: $p < 0,001$ trattamento verso controllo.

Come preannunciato dallo studio in condizioni basali, il magnololo ha confermato l'attitudine ad incrementare lo stress ossidativo intracellulare soprattutto alle concentrazioni più elevate – sia pure in modo non statisticamente significativo rispetto al controllo (Fig. 40).

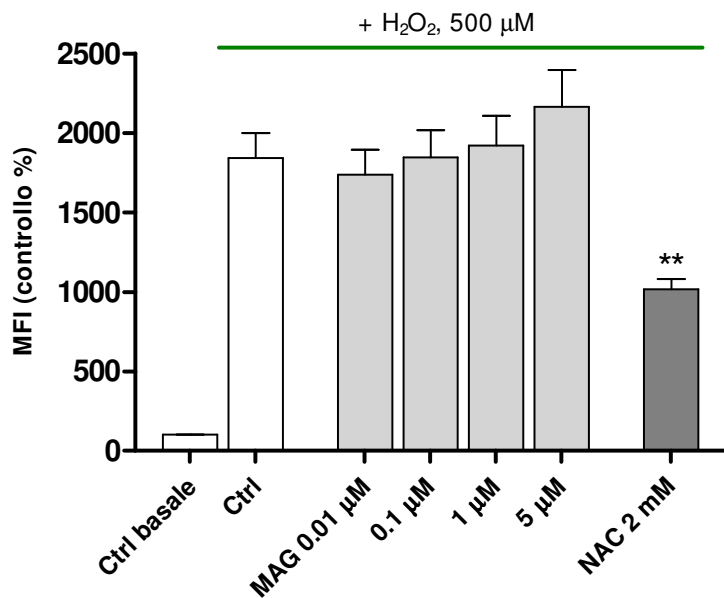


Figura 40. Effetti di magnololo sulla produzione intracellulare di ROS in condizioni di stress ossidativo indotto. Ogni dato rappresenta la media \pm SEM di 5 esperimenti. **: $p < 0,01$ trattamento verso controllo.

In Fig. 41 è riportato il grafico relativo ai trattamenti con miricetina:

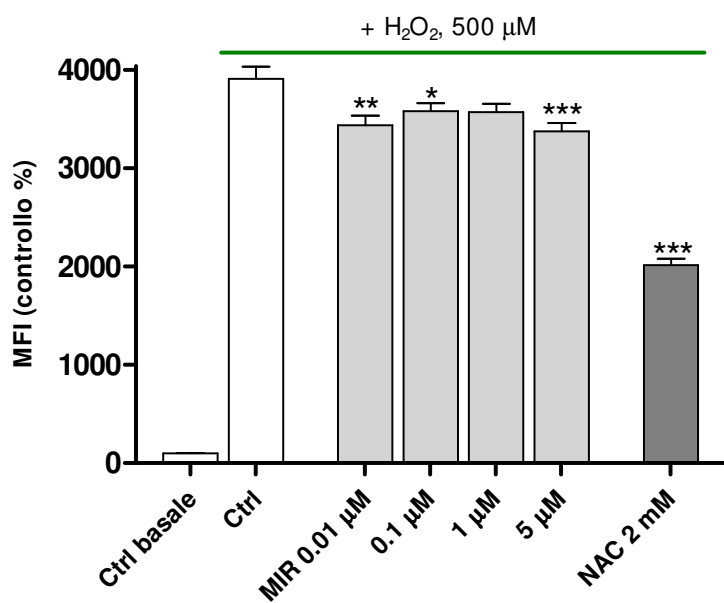


Figura 41. Effetti di miricetina sulla produzione intracellulare di ROS in condizioni di stress ossidativo indotto. Ogni dato rappresenta la media \pm SEM di 5 esperimenti. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ trattamento verso controllo.

In questo caso il trattamento a 0.01 μM ha evidenziato una diminuzione del $12.0 \pm 2.5\%$ rispetto al controllo addizionato con H_2O_2 ; il trattamento a 0.1 μM ha mostrato una diminuzione dell' $8.3 \pm 2.1\%$ e il trattamento a 5 μM una diminuzione del $13.6 \pm 2.2\%$.

Per quanto riguarda gli effetti di oleuropeina (Fig. 42) e silibinina (Fig. 43) sul modello cellulare di stress ossidativo indotto, non è emersa alcuna significativa variazione dell'intensità relativa di fluorescenza – e, dunque, dell'attività ossidativa intracellulare.

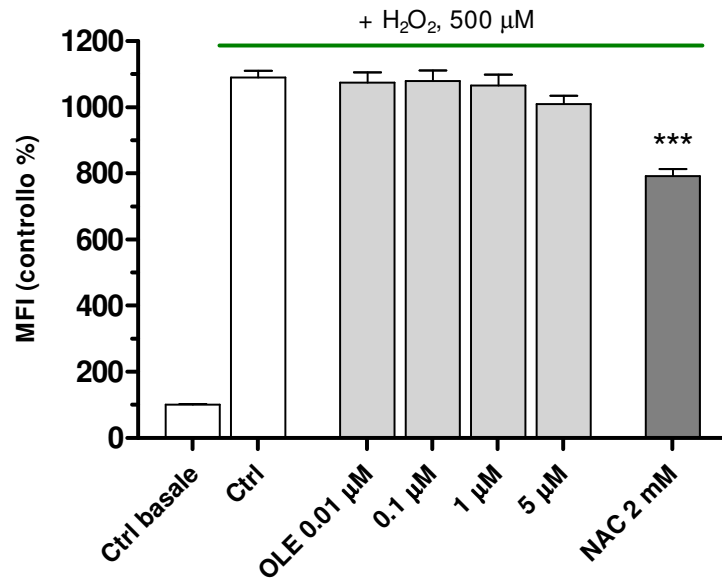


Figura 42. Effetti di oleuropeina sulla produzione intracellulare di ROS in condizioni di stress ossidativo indotto. Ogni dato rappresenta la media \pm SEM di 5 esperimenti. ***: $p < 0,001$ trattamento verso controllo.

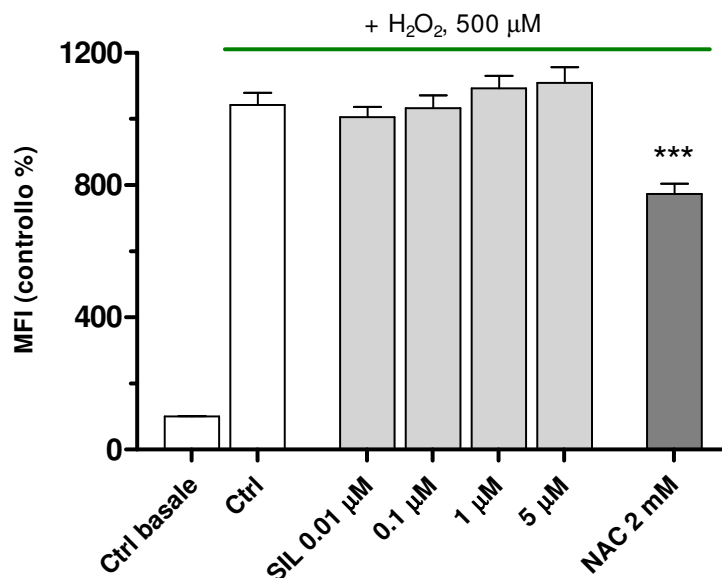


Figura 43. Effetti di silibinina sulla produzione intracellulare di ROS in condizioni di stress ossidativo indotto. Ogni dato rappresenta la media \pm SEM di 5 esperimenti. ***: $p < 0,001$ trattamento verso controllo.

Per poter definire un quadro riassuntivo il più possibile completo ed organico circa la funzionalità antiossidante, si è scelto di attribuire uno *score* di tipo qualitativo a ciascun fitocostituente in base alle risposte ottenute nei diversi *screening* (Tab. 44). Tale valutazione è da considerarsi indicativa.

Tabella 44. Valutazione complessiva degli esiti relativi ai diversi *screening in vitro* ed *ex vivo*; a ciascun fitocomposto in studio è stata attribuita una valutazione sulla base del carattere antiossidante (o pro-ossidante) dimostrato in ciascuna sperimentazione. I simboli "+", "++" e "+++" indicano l'efficacia antiossidante evidenziata; il simbolo "-" è indice di una risposta pro-ossidante; il simbolo "+/-" è indice di una risposta ambigua; il simbolo "/" indica che la prova non è stata eseguita o non è stata ritenuta idonea per ricavare informazioni sufficientemente attendibili.

Composti	DPPH	ORAC	TBARS	Cinetica di ox.	DCFH-DA basale	DCFH-DA stress
Miricetina	+++	+++	+++	+++	++	++
Oleuropeina	+++	+++	+++	+++	+	+/-
Galangina	+++	++	+/-	+	++	+++
Baicaleina	+++	+	++	++	+/-	+/-
Magnololo	++	++	++	+++	-	+/-
Eupatorina	++	++	+	/	+/-	+/-
Silibinina	++	++	+/-	/	+/-	+/-
Bilobalide	-	-	/	/	/	/

6. DISCUSSIONE

I dati ottenuti nel presente progetto di ricerca evidenziano come la maggior parte dei fitocomposti è dotata di efficacia antiossidante; fra i più potenti la miricetina e l'oleuropeina, mentre la bilobalide ha dimostrato di possedere un'attività *scavenger* del tutto trascurabile. Si deve inoltre rilevare che l'attività antiossidante determinata per i composti studiati è spesso quantitativamente diversa a seconda del saggio sperimentale utilizzato. Questo non deve sorprendere, in quanto sono stati utilizzati protocolli differenti che si basano su diversi meccanismi biochimici, allo scopo di effettuare una valutazione più completa del profilo antiossidante dei singoli fitocostituenti.

Tali evidenze sono in parte confermate dai dati di letteratura: in uno studio comparativo finalizzato a valutare le caratteristiche elettrochimiche di vari flavonoidi, la miricetina ha dimostrato di possedere un basso potenziale ossidoriduttivo, con valori di DPPH[•] ed ORAC simili a quelli riscontrati nella nostra ricerca (Carrasco-Pancorbo et al., 2005). Un altro studio, condotto sulla frazione polifenolica dell'olio di oliva, ha evidenziato le proprietà antiossidanti dell'oleuropeina associandole principalmente al residuo *o*-diidrossilico; tale gruppo funzionale permette infatti la formazione di ponti idrogeno intramolecolari durante la reazione con i radicali liberi, anche se va sottolineata l'influenza elettronica e sterica dei sostituenti vicinali agli ossidrilici fenolici, oltre alla presenza del gruppo -COOCH₃ non elettron-donatore, che peggiora l'efficienza antiradicalica rispetto all'analogo deacetossilato (Aaby et al., 2004).

La valutazione con i saggi *ex vivo* ha evidenziato per i diversi fitocomposti comportamenti eterogenei – e talvolta contraddittori – rispetto ai dati *in vitro*, permettendo comunque di discriminare sia qualitativamente che quantitativamente le caratteristiche antiossidanti dei composti esaminati. Tra gli esempi di eterogeneità di risposta possiamo trovare la galangina, che ha evidenziato un efficace profilo antiossidante a livello cellulare, ma un effetto inconsistente nei confronti dell'ossidazione delle LDL; altri composti, come la baicaleina ed il magnololo, hanno evidenziato un comportamento opposto, dimostrando maggiore efficienza nell'inibire la degradazione perossidativa delle LDL. Il magnololo ha addirittura evidenziato un comportamento pro-ossidante a livello cellulare, nonostante l'elevato grado di efficienza antiradicalica dimostrato nei saggi *in vitro* ed *ex vivo* sulle LDL. Uno studio presente in letteratura ha evidenziato la capacità protettiva del magnololo nei confronti di cellule HUVEC esposte a concentrazioni tossiche (200 µg/mL) di ox-LDL, attenuando la produzione di ROS indotta dalle LDL ossidate ed inibendo la conseguente attivazione del fattore di trascrizione nucleare NF-κB implicato nei processi di morte cellulare (Ou et al., 2007).

La diversa attività dei fitocostituenti valutata con vari approcci sperimentali richiederà ulteriori approfondimenti, anche con l'uso di altri modelli sperimentali per definire in modo più completo il profilo antiossidante di ciascun fitocostituente. E' infatti di grande attualità il dibattito sulla reale efficacia degli antiossidanti introdotti con la dieta alimentare e sul loro ruolo protettivo nei confronti di numerose patologie a componente radicalica; nel settore della nutrizione "preventiva", una delle frontiere attualmente più accattivanti e non ancora adeguatamente esplorate riguarda proprio l'impatto di prodotti alimentari contenenti antiossidanti nella prevenzione delle patologie cardiovascolari, ed in particolare nei confronti dell'aterosclerosi. A tale proposito, una delle ipotesi più recenti sullo sviluppo dell'aterosclerosi, definita come "ipotesi delle alterazioni ossidative" (*oxidative modification hypothesis of atherosclerosis*), attribuisce un ruolo essenziale ai fenomeni degenerativi innescati dai radicali liberi, ovvero da molecole o frammenti molecolari dotati di un elettrone spaiato e caratterizzati da una spiccata reattività chimica e biologica. Tale ipotesi suggerisce che le LDL accumulate nello spazio sub-endoteliale ed esposte all'ossidazione da parte di enzimi e metaboliti ossidanti prodotti dalle cellule della parete arteriosa, vengano convertite a LDL minimamente modificate (*mm-LDL*), in grado di indurre la secrezione di chemochine e citochine pro-infiammatorie e promuovere l'espressione di molecole di adesione per monociti e linfociti circolanti, aggravando i processi di perossidazione lipidica a carico delle LDL intimali. Queste reazioni provocherebbero la completa ossidazione delle mm-LDL a LDL ossidate (*ox-LDL*). E' anche noto che il riconoscimento e la successiva rimozione delle ox-LDL non coinvolge più i convenzionali sistemi recettoriali ma richiede la presenza di specifici *scavenger receptors* (SR) espressi sulla superficie dei macrofagi. Diversamente dai recettori per le LDL native (e per le mm-LDL), gli SR non sono sotto-regolati dai livelli di colesterolo fagocitato e continuano a veicolare l'entrata di lipoproteine ossidate nei macrofagi in maniera incontrollata, anche quando i livelli intracellulari di colesterolo sono già elevati; il processo di endocitosi SR-mediata porta alla trasformazione dei macrofagi nelle cosiddette *foam cells* ("cellule schiumose"). Inoltre, le ox-LDL sono in grado di attivare alcuni fattori di trascrizione (es. NF-κB) a livello di cellule endoteliali, macrofagi e cellule muscolari lisce ed indurre così l'espressione di geni che codificano per molecole di adesione, citochine e fattori di crescita, amplificando la risposta infiammatoria mediante l'azione citotossica diretta a livello endoteliale, l'azione mitogena sulle cellule muscolari lisce, sui macrofagi, sui fibroblasti e sulle cellule endoteliali, la promozione dell'aggregazione piastrinica, la produzione di endotelina e l'inibizione del rilascio di NO, con conseguente vasocostrizione. Per tali ragioni, si è ritenuto che i principi antiossidanti contenuti nei prodotti alimentari

potessero influire significativamente sul rischio di insorgenza della patologia, ed è oramai noto come un regime dietetico ricco in vegetali (frutta e verdura) eserciti una funzione preventiva non trascurabile nell'esordio delle patologie cardiovascolari (Badimon et al., 2010). Numerosi principi nutritivi e fitocostituenti presenti in prodotti alimentari di origine vegetale come fibre, vitamine, minerali ed antiossidanti possono essere indipendentemente o congiuntamente responsabili di una riduzione del rischio cardiovascolare. Un numero crescente di *trials* clinici ha riscontrato l'esistenza di effetti benefici sul sistema cardiovascolare a seguito dell'assunzione di fibre alimentari, di agenti naturali per ridurre i livelli di colesterolo, olio di oliva, acidi grassi polinsaturi ω -3, antiossidanti e polifenoli. L'apporto di acidi grassi monoinsaturi ha mostrato la capacità di modulare l'espressione di geni correlati ai processi iniziali di aterogenesi; tuttavia, nel caso degli antiossidanti, alcuni studi clinici approfonditi non hanno confermato alcun significativo effetto protettivo (Badimon et al., 2010).

L'ambiguità dei risultati ottenuti con le sperimentazioni di efficacia biologica degli antiossidanti alimentari è in parte attribuibile alla loro limitata biodisponibilità. I polifenoli costituiscono una delle principali classi di antiossidanti nella dieta; la loro assunzione totale è stimata a circa 900 mg/die (Ovaskainen et al., 2008), quantità circa 10 volte superiore all'assunzione giornaliera di acido ascorbico e 100 volte superiore a quella dell' α -tocoferolo o del β -carotene (Scalbert et al., 2000). In una *review* pubblicata in letteratura è stata confrontata la biodisponibilità di un'ampia gamma di polifenoli, in forma di composti puri, come estratti vegetali o come alimento/bevanda, in relazione all'assunzione di una singola dose standard di 50 mg di aglicone (Manach et al., 2005). Le concentrazioni plasmatiche dei metaboliti totali variano tra 0 e 4 μ Mol/L per l'assunzione di 50 mg di aglicone, con un'escrezione urinaria relativa compresa tra lo 0,3% ed il 43% della dose ingerita, a seconda del tipo di polifenolo. Le concentrazioni plasmatiche massime vengono raggiunte in tempi variabili tra 1,5 ore e 5,5 ore circa (Manach et al., 2005).

Gli effetti benefici associati ai polifenoli sembrano essere mediati da un'ampia varietà di vie biochimiche e meccanismi di modulazione, che agiscono in maniera indipendente o sinergica; studi *in vivo* hanno evidenziato effetti antiaterosclerotici nei primi stadi di sviluppo della malattia (es. riduzione delle ox-LDL), mediante il miglioramento della funzionalità endoteliale e l'aumento del rilascio di NO (potente vasodilatatore), la modulazione dell'infiammazione e del metabolismo lipidico (effetto ipolipemizzante), il miglioramento dello stato antiossidante e la protezione nei confronti di episodi aterotrombotici, tra cui il

danno ischemico e l'aggregazione piastrinica (Badimon et al., 2010). Lo schema riportato in Fig. 45 riassume le principali ipotesi relative ai meccanismi attraverso i quali i polifenoli possono esercitare un effetto protettivo a livello cardiaco e vascolare, con particolare riferimento ai meccanismi protettivi comuni mediante i quali i polifenoli esercitano una supposta funzione antiaterosclerotica.

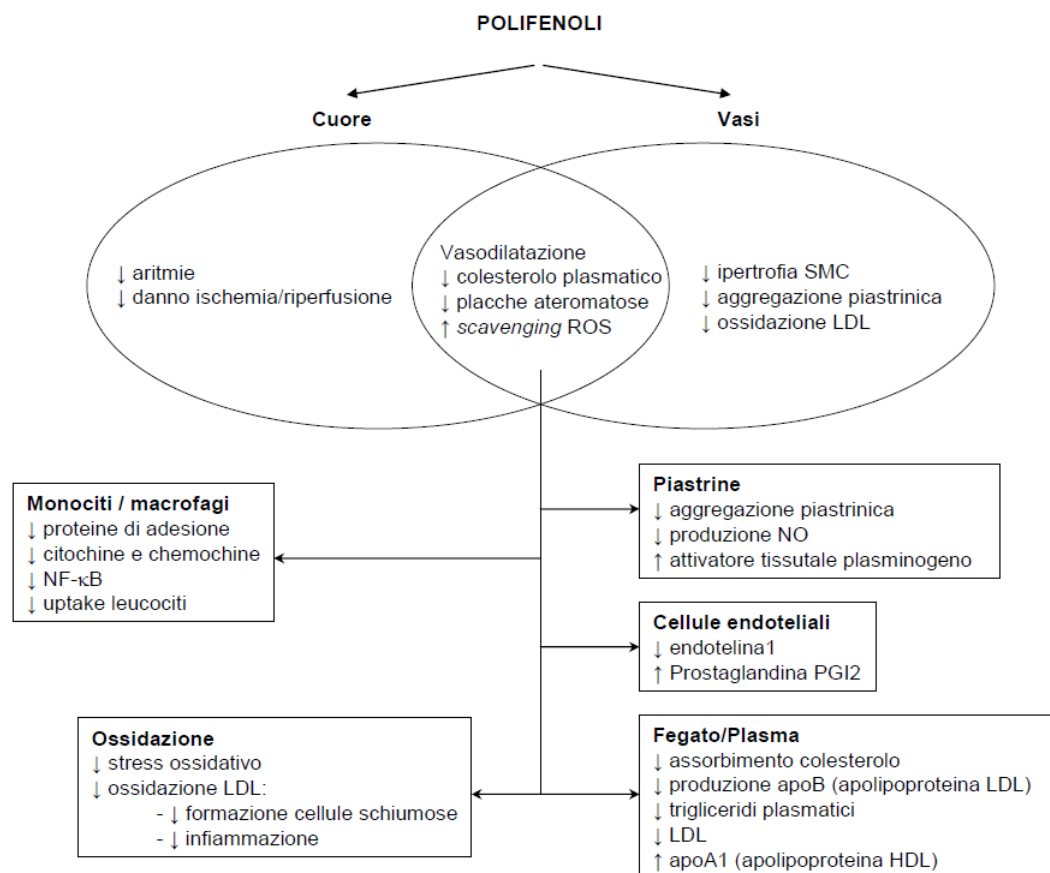


Figura 45. Effetti protettivi dei polifenoli nei confronti di cuore e vasi sanguigni; la parte inferiore dello schema evidenzia i probabili effetti benefici nel prevenire l'esordio dell'aterosclerosi (adattata da Badimon et al., 2010).

E' pertanto crescente l'interesse scientifico nei confronti dei potenziali effetti cardioprotettivi di prodotti naturali ed integratori alimentari; si pensa infatti che l'identificazione degli effetti benefici di estratti naturali potrebbe avere importanti implicazioni nello sviluppo di strategie terapeutiche per il trattamento delle patologie cardiovascolari.

L'interesse verso queste sostanze è iniziato con l'osservazione di una valida associazione tra il loro consumo ed una ridotta incidenza di eventi cardiovascolari (Rimm et al., 1993; Stampfer et al., 1993), mediati da effetti a livello endoteliale, la cui alterazione è indicata come

responsabile dello sviluppo e della progressione dell'aterosclerosi. Gli studi clinici servono anche a definire quali sostanze abbiano effetti protettivi, pertanto numerosi *trials* sono stati condotti per validare l'impiego di vitamine, acidi grassi e altri micronutrienti nella prevenzione e nel trattamento di patologie cardiovascolari (*Evidence Based Medicine*, EBM).

In Italia il settore dei prodotti salutistici, basato sull'uso di estratti vegetali, animali e minerali per la prevenzione ed il trattamento di malattie, ha evidenziato nel 2012 una crescita pari a +5,1%, con un mercato di due miliardi di euro tra prodotti commercializzati in farmacia, parafarmacia e nella distribuzione di massa. Solo nel 2012 sono stati presentati sul mercato 1192 nuovi prodotti, evidenziando tra i segmenti di vendita più dinamici e promettenti quelli relativi all'apparato circolatorio, urinario, al sistema riproduttivo ed agli analgesici (3° Congresso Nazionale SiNut, 2012).

Dai dati presenti in letteratura emerge un quadro particolarmente complesso ed apparentemente contraddittorio sull'efficienza degli antiossidanti introdotti con la dieta nella prevenzione delle malattie cardiovascolari. In particolare, alcuni studi di metanalisi evidenziano una discrepanza tra i risultati sperimentali ottenuti in modelli animali *in vivo* o *in vitro* e i *trials* randomizzati controllati nell'uomo per quanto riguarda l'associazione tra patologie cardiovascolari e l'assunzione di vitamine o antiossidanti (sia presenti in forma naturale, sia in forma sintetica). Ci sono diverse teorie che possono spiegare tali discrepanze: in primo luogo, studi preclinici condotti su animali o su modelli *in vitro* non possono avere la pretesa di riprodurre con sufficiente fedeltà la complessità dei processi biologici dell'organismo (Farbstein et al., 2010); perciò, anche se vitamine e sostanze antiossidanti dimostrano di possedere proprietà biologiche benefiche in studi preclinici, potrebbero non mostrare alcun significativo effetto – o essere addirittura nocive - in condizioni cliniche. In secondo luogo, gli effetti benefici di vitamine o integratori antiossidanti potrebbero essere correlati ai tempi di somministrazione; ad esempio, gli effetti benefici dell'acido ascorbico si possono riscontrare nelle fasi iniziali del processo aterogenico, ma perdono di efficacia una volta che si è sviluppata la placca aterosclerotica (Aguirre et al., 2008; Farbstein et al., 2010). I risultati contrastanti tra gli effetti apparentemente protettivi dei nutrienti come parte della dieta e la scarsa efficacia protettiva dei singoli principi nutritivi ha spostato l'attenzione verso i cibi *in toto*; tra questi, si sono riscontrate evidenze più consistenti per la frutta e gli ortaggi (Bhupathiraju et al., 2011). La mortalità totale attribuita ad un insufficiente consumo di prodotti vegetali è stata stimata nel mondo ad oltre 2,5 milioni di decessi ogni anno. Si ritiene che aumentando il consumo giornaliero di frutta e verdura a 600 g, l'incidenza globale di cardiopatia ischemica ed ictus potrebbe ridursi rispettivamente del 31% e del 19% (Lock et

al., 2005). Gli studi epidemiologici hanno dimostrato in maniera consistente che maggiori assunzioni di frutta e verdura sono associate ad un minore rischio di eventi cardiovascolari: una metanalisi di nove studi riferita a 91,379 uomini, 129,701 donne e 5007 casi di malattia coronarica ha evidenziato una diminuzione del rischio di patologia coronarica del 4% per ciascuna ulteriore porzione di frutta o di verdura consumata e del 7% per il solo consumo di frutta (Dauchet et al., 2006). Un'altra metanalisi di 12 studi, rappresentativa di 278,459 individui e 9413 casi di patologia coronarica ha evidenziato come, rispetto ad un consumo di frutta e verdura inferiore alle tre portate giornaliere, i soggetti ai quali venivano servite 3-5 portate o più di 5 portate al giorno presentassero un'incidenza di eventi cardiovascolari ridotta rispettivamente del 7% e del 17% (He et al., 2007).

I benefici del consumo di alimenti di origine vegetale sembrano, inoltre, essere dose-dipendenti; uno studio caso-controllo ha dimostrato che gli effetti derivanti dal consumo di tali prodotti alimentari aumentano proporzionalmente con il numero di porzioni consumate (Nikolic et al., 2008).

In questo contesto si pone la presente ricerca, che trae forza dal proposito di supportare l'impiego di metaboliti secondari di origine vegetale come possibile strategia per ridurre l'incidenza dello stress ossidativo endogeno e contribuire in maniera significativa alla profilassi e al trattamento dell'aterosclerosi e delle patologie a componente radicalica, anche nella prospettiva futura di sviluppare possibili nuovi agenti ad azione preventiva o a migliore attività terapeutica.

Dai risultati ricavati mediante DPPH *scavenging assay* ed ORAC *assay* è emerso come l'oleuropeina e la miricetina siano i composti dotati di maggiore capacità antiossidante, mentre la bilobalide ha dimostrato un profilo antiradicalico del tutto trascurabile. Per quanto riguarda gli altri metaboliti secondari, invece, la capacità antiossidante è risultata diversa a seconda del tipo di saggio utilizzato.

Gli antiossidanti di tipo *chain breaker* sono molecole facilmente ossidabili che intrappolano i radicali presenti nel sistema, interrompendo così la propagazione della reazione a catena. A loro volta, gli antiossidanti appartenenti a questa categoria possono disattivare le specie radicaliche tramite due meccanismi fondamentali: per trasferimento di un atomo di idrogeno (*Hydrogen Atom Transfer*, HAT) o per trasferimento di un singolo elettrone (*Single Electron Transfer*, SET).

Con un'analisi più attenta dei risultati possiamo desumere che il magnololo e la silibinina esplicano l'azione antiossidante agendo preferenzialmente con meccanismo HAT, cioè

trasferendo un atomo di idrogeno alla struttura radicalica da neutralizzare; baicaleina e galangina sembrano invece agire da donatori elettronici, secondo meccanismi di tipo SET. Questa deduzione è supportata anche dai risultati ottenuti con la cromatografia su strato sottile, che evidenzia come la miricetina e l'oleuropeina (ma anche la baicaleina e la galangina) siano le sostanze che decolorano più intensamente lo sfondo viola; questo metodo, infatti, basandosi sull'utilizzo del DPPH come promotore radicalico, discrimina maggiormente l'attività degli antiossidanti che agiscono con reazioni SET.

La scelta degli otto fitocomposti è stata motivata dallo studio della letteratura scientifica e dalle proprietà delle droghe vegetali da cui ciascun metabolita è stato estratto; tuttavia particolare importanza va attribuita alla struttura chimica, caratterizzata da un assetto che presuppone *per sé* interessanti potenzialità antiossidanti.

Infatti, come dimostrato da diversi studi, è necessario un preciso rapporto struttura/attività per garantire l'effetto antiossidante. Se si considera la struttura dei flavonoidi (Fig. 46), affinché si evidenzi una significativa attività antiossidante è necessaria la presenza del doppio legame in 2-3 coniugato alla funzione carbonilica in 4 nell'eterociclo (anello C), che favorisce la delocalizzazione dell'elettrone spaiato; è necessaria inoltre la presenza nell'anello aromatico (anello B) di due funzioni ossidriliche vicinali in 3' e 4', come "intrappolatori" di radicali liberi e con un'intrinseca capacità di formare legami idrogeno con i gruppi chetonici (Pietta, 2000; Capasso et al., 2006).

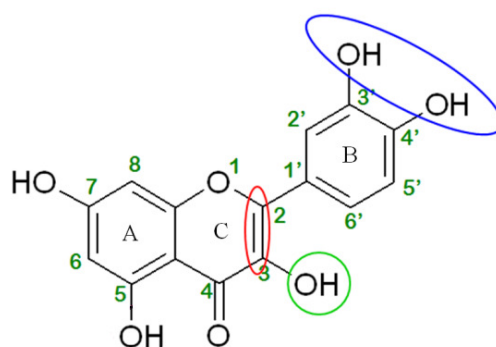


Figura 46. Struttura chimica di un flavonoide. In rosso è evidenziato il doppio legame in 2-3 coniugato alla funzione carbonilica in 4 dell'eterociclo (anello C), in verde la presenza di un gruppo ossidrilico in posizione 3 e in blu la presenza di due funzioni ossidriliche vicinali in 3' e 4' nell'anello B.

Anche la presenza di un gruppo ossidrilico in posizione 3 dell'anello C è fondamentale per l'efficienza antiradicalica; è da sottolineare, inoltre, che la presenza di ulteriori gruppi ossidrilici in posizione 5 e 7 dell'anello aromatico condensato con l'eterociclo (anello A)

portano ad un aumento della capacità antiossidante (Pietta, 2000) e che, in linea generale, maggiore è il numero di sostituenti ossidrilici nell'anello B, maggiore è l'attività antiossidante della molecola. Tutti i flavonoidi posseggono un'elevata capacità di donare un atomo di idrogeno (meccanismo d'azione HAT) ai radicali perossidici interrompendo, quindi, le reazioni radicaliche a catena (Capasso et al., 2006). Alle considerazioni relative alla struttura esemplificativa riportata in Fig. 46 fanno riferimento baicaleina, eupatorina, galangina, miricetina (flavoni) e parzialmente anche la silibinina (flavolignano).

I saggi *ex vivo*, condotti su LDL umane isolate da frazioni plasmatiche e su colture primarie di cellule endoteliali estratte da funicolo ombelicale, hanno permesso di definire un quadro più completo – ma estremamente eterogeneo – delle proprietà antiossidanti dei metaboliti secondari, richiamando in causa anche altre proprietà oltre al potenziale riducente, tra le quali il diverso carattere idro/lipofilo e l'ingombro sterico molecolare. Le concentrazioni dei fitocostituenti impiegate per la misurazione intracellulare di ROS con DCFH-DA sono state scelte sulla base dei risultati di vitalità cellulare mediante MTT test, in maniera tale da escludere un'eventuale citotossicità da parte dei fitocostituenti; la potenziale citotossicità avrebbe infatti potuto pregiudicare i risultati, soprattutto in relazione ad una minore intensità di fluorescenza riferita al ridotto numero di cellule vive piuttosto che al reale carattere protettivo dei composti.

La baicaleina è un flavone isolato dalle radici di *Scutellaria baicalensis*; a predire l'attività antiossidante si può constatare la presenza del doppio legame in 2-3 coniugato alla funzione carbonilica in 4 nell'anello dell'eterociclo e la presenza di tre gruppi ossidrilici nell'anello aromatico, in posizione 5, 6 e 7.

Dai nostri dati la baicaleina risulta avere una potenza antiossidante, espressa in pD_2 , pari a 4.88 (saggio DPPH) e una capacità antiossidante espressa in TEAC pari a 1.77 (saggio ORAC); in base all'ordine di attività antiradicalica registrato nei due saggi *in vitro* si può dedurre che prediliga un meccanismo di tipo SET (*Single Electron Transfer*).

L'analisi TBARS, eseguita su LDL umane estratte mediante ultracentrifugazione e sottoposte ad ossidazione con $CuSO_4$, ha rivelato un profilo antiossidante particolarmente efficace alla concentrazione di 5 μM , dimostrando la migliore capacità protettiva tra i fitocostituenti in studio con un valore di 0.078 nMol di malondialdeide (MDA) per mg di LDL. Il riscontro cinetico, finalizzato a valutare la formazione di dieni coniugati, ha invece evidenziato un profilo antiossidante di media entità rispetto agli altri fitocomposti, con un tasso di inibizione

percentuale pari a 16.4% per il trattamento 1 μM e 42.6% per il trattamento alla concentrazione di 1,5 μM . Nel complesso, questi risultati permettono di attribuire alla baicaleina una buona capacità inibitoria dei processi di degradazione perossidativa a carico delle LDL.

Gli studi condotti a livello cellulare hanno evidenziato un carattere protettivo della baicaleina in condizioni basali di stress ossidativo, unicamente alla minore concentrazione sperimentale di 0.01 μM , con una fluorescenza relativa dell'83.8% rispetto al controllo. Il segnale di fluorescenza riferito alle altre concentrazioni ha invece assunto un andamento anomalo, concentrazione-indipendente e addirittura pro-ossidante alla concentrazione di 1 μM . Inoltre lo studio condotto sul modello cellulare di stress ossidativo con H_2O_2 non ha evidenziato alcuna significativa attività antiossidante rispetto al controllo.

La bilobalide è un lattone sesquiterpenico isolato dalle foglie di *Ginkgo biloba*, di cui è considerato il composto terpenoide più abbondante. La bilobalide è responsabile di numerosi effetti biologici propri dell'estratto di *Ginkgo*, ed in particolare dell'attività neuroprotettiva (Krieglstein et al., 1995). I dati ottenuti riportano una scarsa attività antiossidante, connotando la bilobalide come il composto meno attivo tra quelli studiati, sia per quanto riguarda la valutazione mediante test DPPH (per il quale non è stato possibile definire valori attendibili di EC_{50}), sia per il test ORAC ($\text{TEAC} = -0.019$). La bilobalide, in effetti, presenta solo due ossidrili liberi e, pur possedendo una struttura composta da quattro pentacicli condensati (di cui tre eterocicli), non possiede doppi legami coniugati in grado di delocalizzare la carica elettronica. Per questa ragione non sono stati condotti i successivi saggi *ex vivo* su LDL e cellule endoteliali umane.

L'eupatorina è uno dei flavonoidi contenuti nel "tè di Giava" (*Ortosifon stamineus*), ed è estratta da *Eupatorium semiserratum*. A sostegno della sua attività antiossidante si nota la presenza del doppio legame in 2-3, coniugato alla funzione carbonilica in posizione 4 dell'eterociclo, e la presenza di due gruppi ossidrilici liberi, uno in 3' dell'anello C in posizione vicinale ad un gruppo metossilico e uno in posizione 5 dell'anello B, potenziante l'attività antiradicalica.

Dai dati ottenuti, l'eupatorina risulta avere una pD_2 pari a 3.52 e un valore TEAC pari a 3.98, suggerendo un possibile meccanismo d'azione misto, sia di tipo SEM che HAT.

I dati relativi alla sperimentazione sulle LDL hanno dimostrato un profilo protettivo piuttosto

blando: l'analisi TBARS ha evidenziato una significativa diminuzione nella produzione di MDA soltanto alla concentrazione di 5 μM , attestandosi a 0.372 nMol MDA/mg LDL. Il monitoraggio cinetico della produzione di dieni coniugati non ha consentito di calcolarne i valori di *lag time* (e il relativo tasso di inibizione percentuale), dal momento che le curve ottenute dall'analisi spettrofotometrica hanno assunto un andamento privo di alcun flesso apprezzabile.

Lo studio condotto sulle cellule HUVEC ha evidenziato un blando carattere protettivo soltanto alla concentrazione inferiore (0.01 μM), con valori di fluorescenza relativa pari a 91.4% rispetto al controllo; il trattamento a 0.1 μM ha mostrato valori paragonabili al controllo, mentre i trattamenti a 1 μM e 5 μM hanno mostrato un'influenza pro-ossidante. Inoltre l'eupatorina non ha modificato la fluorescenza delle HUVEC incubate con perossido di idrogeno.

La galangina è uno dei principi attivi contenuti nella propoli e nel rizoma di *Alpinia officinarum* ed *Alpinia galanga* (Fam. *Zingiberaceae*). La relazione struttura/attività lascia presupporre interessanti potenzialità antiossidanti, data la presenza del doppio legame in 2-3 coniugato alla funzione carbonilica in posizione 4 dell'eterociclo e la presenza di tre gruppi ossidrilici, particolarmente importanti per l'attività antiossidante.

Negli *screening in vitro* la galangina evidenzia una pD_2 pari a 4.49 e un valore TEAC pari a 3.97, agendo preferenzialmente con meccanismo di tipo SET.

Nei saggi *ex vivo* condotti su LDL umane, la galangina ha rivelato un profilo antiossidante particolarmente blando (e non statisticamente significativo) nei confronti della degradazione perossidativa. Il test TBARS ha mostrato per entrambi i trattamenti di studio un profilo pressochè paragonabile al controllo, rappresentato dalle sole LDL ossidate con rame, registrando i valori di 0.626 nMol MDA/mg LDL alla concentrazione di 2.5 μM e 0.576 nMol MDA/mg LDL alla concentrazione di 5 μM . Nell'analisi cinetica condotta sulla formazione di dieni coniugati, la visualizzazione del flesso relativo alla fase di propagazione ha richiesto le concentrazioni più alte in studio – 2 μM e 3 μM – per le quali i tassi di inibizione percentuale si sono attestati al 15.5% e al 58%, rispettivamente. I dati più interessanti sono relativi alla sperimentazione sulle HUVEC: la diminuzione del segnale di fluorescenza in condizioni basali è stata pari ad oltre il 20% per il trattamento a 5 μM , accompagnata dalla riduzione del 10-15% per i trattamenti a 0.01 e 1 μM . L'aggiunta di H_2O_2 come stress ossidativo indotto dall'esterno ha permesso di apprezzare un'intensità di fluorescenza relativa del 73.9% per il

trattamento a 5 μM , evidenziando un'azione del tutto simile a quella evocata da NAC 2 mM, adottato come standard di riferimento. Tali risultati promuovono la galangina a composto antiossidante maggiormente attivo a livello cellulare, in contrapposizione alla limitata attività sulle LDL.

Per quanto riguarda il magnololo, le proprietà antiossidanti potrebbero essere giustificate dalla presenza di due gruppi idrossilici liberi legati a due molecole fenilpropileniche che, grazie alla presenza di numerosi doppi legami, garantiscono una buona delocalizzazione della carica elettronica. I dati ottenuti nelle sperimentazioni *in vitro* hanno permesso di definire un valore di pD_2 pari a 3.84 e un valore TEAC pari a 6.31; sembra quindi prediligere un meccanismo antiradicalico di tipo HAT.

Nei saggi *ex vivo* condotti sulle LDL estratte da plasma umano, il magnololo ha rivelato un efficace profilo antiossidante nei confronti della degradazione perossidativa. Il test TBARS ha definito un carattere antiossidante paragonabile in entrambi i trattamenti, con i valori di 0.332 nMol MDA/mg LDL alla concentrazione di 2.5 μM e di 0.301 nMol MDA/mg LDL alla concentrazione di 5 μM . Nell'analisi condotta mediante monitoraggio spettrofotometrico dei dieni coniugati, il magnololo è il composto che, più di ogni altro fitocostituente in studio, ha dimostrato la capacità di ritardare la degradazione ossidativa delle LDL: i due trattamenti a 0.5 μM e 1 μM hanno contato tassi di inibizione percentuale di 39.2% e 49.5%, rispettivamente.

In maniera del tutto inaspettata, i risultati relativi alla sperimentazione sul modello cellulare hanno smentito le considerazioni relative alle LDL dimostrando un netto carattere pro-ossidante, con un comportamento dose-dipendente che ha raggiunto valori di fluorescenza relativa di 202.2% nel trattamento 5 μM in condizioni basali. L'analisi in condizioni di stress ossidativo indotto con H_2O_2 ha suggerito un'azione pro-ossidante non significativa rispetto al controllo.

La miricetina è isolata da *Myrica rubra*, ma si può ritrovare anche nel vino rosso e in diversi tipi di frutta, verdura, bacche ed erbe aromatiche. Analizzando la struttura chimica si può riscontrare la presenza di un doppio legame in 2-3 coniugato alla funzione carbonilica in 4 dell'eterociclo e di diversi gruppi ossidrilici (sei, variamente localizzati sui tre anelli). Tre di questi sono fondamentali per garantire l'attività antiossidante, quelli in posizione 3 dell'anello C e in posizione 3' e 4' dell'anello B; gli altri tre, rispettivamente in posizione 5' dell'anello B e

in posizione 5 e 7 dell'anello A, favoriscono il potenziamento dell'attività antiradicalica. La presenza di questi gruppi idrofilici legati ad una struttura in grado di delocalizzare efficacemente una carica elettronica presuppone una forte attività antiradicalica della molecola. In effetti, è stata confermata una spiccata attività della miricetina anche dai dati sperimentali ottenuti *in vitro*; si è dimostrata la molecola dotata di maggiore attività antiossidante nel saggio DPPH \cdot ($pD_2 = 5.23$) e al secondo posto in ordine di potenza antiossidante nel saggio ORAC (TEAC = 6.76).

Gli *screening* condotti sulle LDL ossidate in presenza di rame hanno delineato un buon profilo antiossidante della miricetina, definendo valori ridotti di MDA conseguenti alla degradazione perossidativa delle LDL (pari a 0.222 nMol MDA/mg LDL per il trattamento a 2.5 μ M e 0.183 nMol MDA/mg LDL per il trattamento a 5 μ M). Anche le analisi condotte sulla cinetica di ossidazione delle LDL hanno permesso di evidenziare un buon carattere protettivo, ritardando la formazione di dieni coniugati secondo i tassi di inibizione percentuale di 13.6% per il trattamento a 0,5 μ M e 98.9% per quello 1 μ M.

Il comportamento antiossidante nei confronti delle cellule HUVEC ha invece evidenziato delle discrepanze; nella sperimentazione effettuata in condizioni basali, la miricetina ha manifestato una significativa diminuzione del segnale di fluorescenza soltanto alla concentrazione minore (0.01 μ M) e a quella più elevata (5 μ M), pari a 85.4% e 87.5%, rispettivamente. La valutazione del carattere protettivo in condizioni di stress ossidativo indotto ha confermato la medesima tendenza, con valori di diminuzione percentuale del segnale di fluorescenza compresi tra l'8.3% (0.1 μ M) e il 13.6% (5 μ M).

L'oleuropeina è un glucoside secoiridoide presente nelle foglie e nei frutti di *Olea europaea*, il comune olivo. L'oleuropeina e il suo metabolita, l'idrossitirosolo, sono responsabili del sapore amaro e pungente dell'olio extra-vergine di oliva appena estratto e presentano una significativa attività antiossidante sia *in vivo* che *in vitro*, probabilmente dovuta alla presenza di sei ossidrili liberi. L'analisi con metodo ORAC la propone come composto a maggiore attività antiossidante (TEAC = 8.25) e al secondo posto in ordine di potenza antiossidante nel saggio DPPH \cdot ($pD_2 = 5.04$).

Nei saggi *ex vivo* condotti sulle LDL, l'oleuropeina ha dimostrato nel complesso un buon profilo antiossidante: l'analisi TBARS ne ha evidenziato il migliore carattere protettivo alla concentrazione di 2.5 μ M (0.091 nMol MDA/mg LDL), mentre a 5 μ M la produzione di MDA si è attestata a valori maggiori (0.238 mMol MDA/mg LDL), ma in ogni caso tali da

confermare una propensione protettiva nei confronti della degradazione perossidativa delle LDL. L'analisi cinetica ha confermato tali evidenze, facendo registrare un tasso di inibizione percentuale del 104.4% per il trattamento a 1 μM ; questo valore indica che la curva riferita al trattamento con oleuropeina ha manifestato un *lag time* superiore al doppio del valore di *lag time* del relativo controllo.

La sperimentazione condotta sul modello cellulare ha evidenziato un carattere protettivo soltanto al trattamento 5 μM (79.4%), registrato in condizioni basali; l'aggiunta di H_2O_2 non ha evidenziato valori di fluorescenza relativa statisticamente diversi dal controllo.

La silibinina è il principale costituente attivo della silimarina ed è ricavata dal *Silybum marianum*.

Dall'analisi della struttura chimica è riconoscibile lo scheletro a quindici atomi di carbonio caratteristico dei flavonoidi, al quale si aggiungono un ulteriore eterociclo condensato ed un anello aromatico. Manca il doppio legame coniugato alla funzione carbonilica in posizione 4, essenziale per l'attività antiossidante. Sono però presenti gli ossidrili in posizione 5 e 7 dell'anello A e quello in posizione 3 dell'eterociclo. Gli ossigeni dei gruppi idrossilici in 3' e 4' nell'anello B non sono liberi ma impegnati nella formazione del secondo eterociclo. Dagli studi condotti *in vitro* la silibina ha una pD_2 pari a 3.66 e un valore TEAC pari a 4.74; sembra prediligere, come il magnololo, un meccanismo antiradicalico di tipo HAT.

La sperimentazione *ex vivo* condotta sulle LDL mediante il test TBARS ha evidenziato un carattere protettivo di media entità rispetto agli altri fitocostituenti, con valori di 0.437 nMol MDA/mg LDL per il trattamento a 2.5 μM e 0.395 nMol MDA/mg LDL per il trattamento 5 μM . Gli esperimenti condotti su cellule HUVEC in condizioni basali hanno evidenziato un carattere antiossidante esclusivamente alla concentrazione più bassa (0.01 μM), registrando un valore di fluorescenza relativa pari a 83.5%. La sperimentazione condotta in condizioni di stress ossidativo evocato dall'esterno con perossido di idrogeno non ha evidenziato alcuna attività di rilievo.

Molti dati sperimentali ed epidemiologici evidenziano il ruolo centrale dell'ossidazione delle LDL nello sviluppo dell'aterosclerosi e delle manifestazioni cliniche della cardiopatia ischemica. Studi *in vitro* presenti in letteratura indicano che l'ossidazione delle LDL può essere inibita da sostanze antiossidanti sia endogene sia esogene, alcune delle quali introdotte con la dieta (vitamina E, vitamina C, beta-carotene e selenio); inoltre, la maggior parte dei

dati epidemiologici suggerisce che l'aumento dei livelli plasmatici di antiossidanti può ridurre il rischio di eventi cardiovascolari. Le evidenze fin qui raccolte rafforzano l'ipotesi del danno ossidativo, ma l'eterogeneità dei dati presenti in letteratura e la difficoltà di stimare l'effettivo ruolo degli antiossidanti nella progressione della malattia richiedono ulteriori studi volti a valutare gli effetti degli antiossidanti sulla progressione dell'aterosclerosi e sugli eventi cardiovascolari nell'uomo. Lo studio condotto in questa ricerca ha evidenziato fitocostituenti dotati di spiccata attività antiossidante in diverse condizioni sperimentali, che si candidano ad una possibile valutazione di tipo clinico utile a individuare nuovi interventi per la prevenzione e il trattamento delle patologie in cui interviene il danno ossidativo.

7. BIBLIOGRAFIA

Aaby K, Hvattum E, Skrede G (2004). Analysis of flavonoids and other phenolic compounds using High-performance liquid chromatography with coulometric array detection: relationship to antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 52, 4595-4603.

Aguirre R, May JM (2008). Inflammation in the vascular bed: importance of vitamin C. *Pharmacol Ther* 119, 96-103.

Ahlemeyer B, Möwes A, Krieglstein J (1999). Inhibition of serum deprivation- and staurosporine-induced neuronal apoptosis by *Ginkgo biloba* extract and some of its constituents. *Eur J of Pharmacology* 367, 423-430.

Ai J, Wang X, Nielsen M (2001). Honokiol and magnolol selectively interact with GABA_A receptor subtypes in vitro. *Pharmacology (Basel)* 63(1), 34-41.

Badimon L, Vilahur G, Padro T (2010). Nutraceuticals and atherosclerosis: human trials. *Cardiovasc Ther* 28, 202-215.

Bang KH, Kim YK, Min BS, Na MK, Rhee YH, Lee JP, Bae KH (2000). Antifungal activity of magnolol and honokiol. *Arch Pharm Res (Seoul)* 23(1), 46-49.

Bank G, Schauss A (2004). Antioxidant testing: an ORAC update. *Nutraceuticals World*, <http://www.nutraceuticalsworld.com/March042.htm>.

Bannwart CF, Peraçoli JC, Nakaira-Takahagi E, Peraçoli MT (2010). Inhibitory effect of silibinin on tumour necrosis factor- α and hydrogen peroxide production by human monocytes. *Nat Prod Res* 24(18), 1747-1757.

Bao J, Cai Y, Sun M, Wang G, Corke H (2005). Anthocyanins, flavonols, and free radical scavenging activity of Chinese bayberry (*Myrica rubra*) extracts and their color properties and stability. *J Agric Food Chem* 53(6), 2327-2332.

Beauchamp GK, Keast RS, Morel D, Lin J, Pika J, Han Q, Lee CH, Smith AB, Breslin PA (2005). Phytochemistry: ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature* 437, 45-46.

Bersot TP (2011). Drug Therapy for Hypercholesterolemia and Dyslipidemia. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 12th edition, chapter 31, 877-908.

Bestwick CS, Milne L (2006). Influence of galangin on HL-60 cell proliferation and survival. *Cancer Lett* 243, 80-89.

- Bhupathiraju** SN, Tucker KL (2011). Coronary heart disease prevention: nutrients, foods and dietary patterns. *Clin Chim Acta* 412, 1493-1514.
- Blois** MS (1958). Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 4617(181), 1199-1200.
- Bondet** V, Brand-Williams W, Berset C (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensm Wiss u Technol* 30, 609-615.
- Brown** MS, Basu SK, Falck JR, Ho YK, Goldstein JL (1980). The scavenger cell pathway for lipoprotein degradation: specificity of the binding site that mediates the uptake of negatively-charged LDL by macrophages. *J Supramol Struct* 13, 67-81.
- Buege** JA, Aust SD (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302-310.
- Buettner** GR (1993). The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, [alpha]-Tocopherol, and Ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 300(2), 535-543.
- Cao** G, Alessio HM, Cutler RG (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biol Med* 14, 303-311.
- Capasso** F, De Pasquale R, Grandolini G, Mascolo N (2006). Farmacognosia. Farmaci naturali, loro preparazioni ed impiego terapeutico. *Springer*.
- Capasso** F, Grandolini G, Izzo AA (2009). Fitoterapia. Impiego razionale delle droghe vegetali. *Springer*.
- Carluccio** MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E, Storelli C, Visioli F, Distanto A, De Caterina R (2003). Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(4), 622–629.
- Carrasco-Pancorbo** A, Cerretani L, Bendini A, Segura-Carretero A, Del Carlo M, Gallina-Toschi T, Lercker G, Compagnone D, Fernandez-Gutierrez A (2005). Evaluation of the antioxidant capacity of individual phenolic compounds in virgin olive oil. *J Agric Food Chem* 53, 8918-8925.
- Caruana** M, Neuner J, Högen T, Schmidt F, Kamp F, Scerri C, Giese A, Vassallo N (2012). Polyphenolic compounds are novel protective agents against lipid membrane damage by α -synuclein aggregates *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* 1818(11), 2502-2510.
- Chen** SC, Chang YL, Wang DL, Cheng JJ (2006) Herbal remedy magnolol suppresses IL-6 induced STAT3 activation and gene expression in endothelial cells. *Br J Pharmacol* 148, 226–232.

- Chen YH**, Lin SJ, Chen JW, Ku HH, Chen YL (2002). Magnolol attenuates VCAM-1 expression in vitro in TNF- α -treated human aortic endothelial cells and in vivo in the aorta of cholesterol-fed rabbits. *Br J Pharmacol* 135, 37–47.
- Chen YS**, Lin FY, Liu PL, Huang YT, Chiu JH, Chang YC, Man KM, Hong CY, Ho YY, Lai MT (2009). Antioxidative and Hepatoprotective Effects of Magnolol on Acetaminophen-induced Liver Damage in Rats. *Arch Pharm Res* 32(2), 221-228.
- Chen Z**, Bertin R, Froidi G (2013). EC₅₀ estimation of antioxidant activity in DPPH[•] assay using several statistical programs. *Food Chem* 138, 414-420.
- Cheng HY**, Lin TC, Ishimaru K, Yang CM, Wang KC, Lin CC (2003). *In vitro* antiviral activity of prodelphinidin B-2 3,3'-di-O-gallate from *Myrica rubra*. *Planta Med* 69(10), 953–956.
- Chiu YW**, Lin TH, Huang WS, Teng CY, Liou YS, Kuo WH, Lin WL, Huang HI, Tung JN, Huang CY, Liu JY, Wang WH, Hwang JM, Kuo HC (2011). Baicalein inhibits the migration and invasive properties of human hepatoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 255, 316–326.
- Cicero AF**, De Sando V, Izzo R, Vasta A, Trimarco A, Borghi C (2012). Effect of a combined nutraceutical containing *Orthosiphon stamineus* effect on blood pressure and metabolic syndrome components in hypertensive dyslipidaemic patients: a randomized clinical trial. *Complement Ther Clin Pract* 18(3), 190-194.
- Crepaldi G**, Manzato E, Baggio G (1993). Le dislipidemie, seconda edizione. *Pragma Editrice*.
- Cuvelier E** (1997). Molécules antioxydantes relations structure-activité. *Publié lors des 16èmes Journées Internationales Huiles Essentielles de DIGNE les BAINS, 201-211*.
- D'Archivio M**, Filesi C, Di Benetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* 43(4), 348-361.
- Dauchet L**, Amouyel P, Hercberg S, Dallongeville J (2006). Fruit and vegetable consumption and risk of coronary heart disease: a meta-analysis of cohort studies. *J Nutr* 136, 2588–2593.
- Deep G**, Agarwal R (2010). Antimetastatic efficacy of silibinin: molecular mechanisms and therapeutic potential against cancer. *Cancer Metastasis Rev* 29, 447-463.
- Defeudis FV** (2002). Bilobalide and Neuroprotection. *Pharmacological Research* 46(6), 565-568. *Phytomedicine* 16(2-3), 138-45.

- Deng Y, Bi HC, Zhao LZ, He F, Liu YQ, Yu JJ, Ou ZM, Ding L, Chen X, Huang ZY, Huang M, Zhou SF** (2008). Induction of cytochrome P450s by terpene trilactones and flavonoids of the *Ginkgo biloba* extract EGb 761 in rats. *Xenobiotica* 38(5), 465–481.
- Dolečková I, Rárová L, Grúz J, Vondrusová M, Strnad M, Kryštof V** (2012). Antiproliferative and antiangiogenic effects of flavone eupatorin, an active constituent of chloroform extract of *Orthosiphon stamineus* leaves. *Fitoterapia* 83(6), 1000-1007.
- Donald G, Hertzner K, Eibl G** (2012). Baicalein – an intriguing therapeutic phytochemical in pancreatic cancer. *Curr Drug Targets* 13(14), 1772-1776.
- Drugs in R & D** (2003) EGb 761: *Ginkgo biloba* extract, Ginkor. *Drugs in R&D* 4(3), 188-193.
- Esterbauer H, Gebicki J, Phul H, Jurgens G** (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 13, 341-390.
- Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M** (1989). Continuous monitoring of *in vitro* oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun* 6, 67-75.
- Fang Z, Zhang M, Ta G, Sun Y, Sun J** (2006). Chemical composition of clarified bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) juice sediment. *J Agric Food Chem* 54 (20), 7710–7716.
- Farbstein D, Kozak-Blickstein A, Levy AP** (2010). Antioxidant vitamins and their use in preventing cardiovascular disease. *Molecules* 15, 8098-8110.
- Gerrity RG** (1981). The role of monocytes in atherogenesis. *Am J Pathol* 103, 181-190.
- Gillespie KM, Chae JM, Ainsworth EA** (2007). Rapid measurement of total antioxidant capacity in plants. *Nature Protocols* 2(4), 867-870.
- Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E, Pelicci PG** (2007). Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(9), 722-728.
- Gonzalez-Correa JA, Munoz-Marin J, Arrebola MM, Guerrero A, Narbona F, Lopez-Villodres JA, De La Cruz JP** (2007). Dietary virgin olive oil reduces oxidative stress and cellular damage in rat brain slices subjected to hypoxia-reoxygenation. *Lipids* 42, 921-929.
- Gregoris E** (2010). Misura delle proprietà antiossidanti di prodotti tipici dell'agroalimentare; progettazione e messa a punto di biosensori. *Tesi di Dottorato*, A.A. 2010.

Halliwell B, Gutteridge JMC (1999). Free radicals in Biology and Medicine, third edition. *Oxford Science Publications*.

Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH (1955). The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 34, 1345-1353.

Havsteen B (1983). Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol* 32(7), 1141-1148.

He FJ, Nowson CA, Lucas M, MacGregor GA (2007). Increased consumption of fruit and vegetables is related to a reduced risk of coronary heart disease: meta-analysis of cohort studies. *J Hum Hypertens* 21, 717-728.

Heo MY, Jae LH, Jung SS, Au WW (1996). Anticlastogenic effects of galangin against mitomycin C-induced micronuclei in reticulocytes of mice. *Mutat Res* 360, 37-41.

Heo MY, Sohn SJ, Au WW (2001). Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate. *Mutat Res* 488, 135-150.

Himeji M, Ohtsuki T, Fukazawa H, Tanaka M, Yazaki S, Ui S, Nishio K, Yamamoto H, Tasaka K, Mimura A (2007). Difference of growth-inhibitory effect of *Scutellaria baicalensis*-producing flavonoid wogonin among human cancer cells and normal diploid cell. *Cancer Lett* 245, 269-274.

Ho JH, Hong CY (2012). Cardiovascular protection of magnolol: cell-type specificity and dose-related effects. *J Biomed Sci* 19(1), 70.

Huang D, Ou B, Prior RL (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 53, 1841-1856

Huang HL, Wang YJ, Zhang QY, Liu B, Wang FY, Li JJ, Zhu RZ (2012). Hepatoprotective effects of baicalein against CCl₄-induced acute liver injury in mice. *World J Gastroenterol* 18(45), 6605-6613.

Huang WS, Kuo YH, Chin CC, Wang JY, Yu HR, Sheen JM, Tung SY, Shen CH, Chen TC, Sung ML, Liang HF, Kuo HC (2012). Proteomic analysis of the effects of baicalein on colorectal cancer cells. *Proteomics* 12, 810-819.

Hunt D (1998). Magnolias and their allies. *International Dendrology Society and Magnolia Society*.

Ishige K, Schubert D, Sagara Y (2001). Flavonoids protect neural cells from oxidant stress by three distinct mechanisms. *Free Radical Biol Med* 30, 433-446.

Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52, 2745-2756.

Jemai H, El Feki A, Sayadi S (2009). Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *J Agric Food Chem* 57(19), 8798–8804.

Jovanovic SV, Steenken S, Simic MG (1996). Reduction potential of flavonoid and model phenoxyl radicals. *J Chem Soc Perkins Tran 2*, 2497-2503.

Khayyal MT, el-Ghazaly MA, Abdallah DM, Nassar NN, Okpanyi SN, Kreuter MH (2002). Blood pressure lowering effect of an olive leaf extract (*Olea europaea*) in L-NAME induced hypertension in rats. *Arzneimittelforschung* 52(11), 797–802.

Kim KC, Lee IK, Kang KA, Kim HS, Kang SS, Hyun JW (2012). Baicalein (5,6,7-trihydroxyflavone) reduces oxidative stress-induced DNA damage by upregulating the DNA repair system. *Cell Biol Toxicol* 28(6), 421-433.

Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R. (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr* 76(3), 560–568.

Kriegelstein J, Ausmeier F, El-Abhar H, Lippert K, Welsch M, Rupalla K, Henrich-Noack P (1995). Neuroprotective effects of *Ginkgo biloba* constituents. *Eur J of Pharm Sciences* 3, 39–48.

Laavola M, Nieminen R, Yam MF, Sadikun A, Asmawi MZ, Basir R, Welling J, Vapaatalo H, Korhonen R, Moilanen E (2012). Flavonoids eupatorin and sinensetin present in *Orthosiphon stamineus* leaves inhibit inflammatory gene expression and STAT1 activation. *Planta Med* 78(8), 779-786.

Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Progr Lip Res* 46 (5), 244-282.

Lass A, Belkner J, Esterbauer H, Kuhn H (1996). Lipoxygenase treatment renders low-density lipoprotein susceptible to Cu²⁺-catalysed oxidation. *Biochem J* 314, 577-585.

Li HL, Zhang S, Wang Y, Liang RR, Li J, An P, Wang ZM, Yang J, Li ZF (2012). Baicalein induces apoptosis via a mitochondrial-dependent caspase activation pathway in T24 bladder cancer cells. *Mol Med Report*, 266-270.

Liang RR, Zhang S, Qi JA, Wang ZD, Li J, Liu PJ, Huang C, Le XF, Yang J, Li ZF (2012). Preferential inhibition of hepatocellular carcinoma by the flavonoid Baicalein through blocking MEK-ERK signaling. *Int J Oncol* 41, 969–978.

Libby P (2005). The pathogenesis of atherosclerosis. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 16th edition, section 4, 1425-30.

Lim S, Yoon JW, Kang SM, Choi SH, Cho BJ, Kim M, Park HS, Cho HJ, Shin H, Kim YB, Kim HS, Jang HC, Park KS (2011). Egb 761, a *Ginkgo biloba* extract, is effective against atherosclerosis *in vitro*, and in a rat model of type 2 diabetes. *PLoS One* 6(6), 1-10.

Lin CC, Shieh DE, (1996). The anti-inflammatory activity of *Scutellaria rivularis* extracts and its active components, baicalin, baicalein and wogonin. *Am J Chin Med* 24(1), 31-36.

Liu HJ, Wang XL, Zhang L, Qiu Y, Li TJ, Li R, Wu MC, Wei LX, Rui YC (2009). Inhibitions of vascular endothelial growth factor expression and foam cell formation by EGb 761, a special extract of *Ginkgo biloba*, in oxidatively modified low-density lipoprotein-induced human THP-1 monocytes cells. *Phytomedicine* 16(2-3), 138-145.

Li-Weber M (2009). New therapeutic aspects of flavones: the anticancer properties of *Scutellaria* and its main active constituents wogonin, baicalein and baicalin. *Cancer Treat Rev* 35, 57–68.

Lock K, Pomerleau J, Causer L, Altmann DR, McKee M (2005). The global burden of disease attributable to low consumption of fruit and vegetables: implications for the global strategy on diet. *Bull World Health Organ* 83, 100-108.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.

Lu YH, Lin T, Wang ZT, Wei DZ, Xiang HB (2007). Mechanism and inhibitory effect of galangin and its flavonoid mixture from *Alpinia officinarum* on mushroom tyrosinase and B16 murine melanoma cells. *J Enzyme Inhib Med Chem* 22, 433–438.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79, 727-47.

Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 81, 230–242.

Manna SK, Mukhopadhyay A, Van NT, Aggarwal BB (1999). Silymarin suppresses TNF-induced activation of NF-kappa B, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis. *J Immunol* 163(2), 6800-6809.

Matsuda H, Kageura T, Oda M, Morikawa T, Sakamoto Y, Yoshikawa M (2001). Effects of constituents from the bark of *Magnolia obovata* on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 49(6), 716-720.

- Matsuda** H, Nakashima S, Oda Y, Nakamura S, Yoshikawa M (2009). Melanogenesis inhibitors from the rhizomes of *Alpinia officinarum* in B16 melanoma cells. *Bioorg Med Chem* 17, 6048–6053.
- Messerli** FH (2002). Terapia farmacologica cardiovascolare. Volume 1 e 2, ed. italiana a cura di G. Mancina, *Centro Scientifico Editore*.
- Micol** V, Caturla N, Pérez-Fons L, Màs V, Pérez L, Estepa A (2005). The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antiviral Res* 66(2-3), 129–136.
- Mohagheghi** F, Bigdeli MR, Rasouljan B, Zeinanloo AA, Khoshbaten A (2010). Dietary virgin olive oil reduces blood brain barrier permeability, brain edema, and brain injury in rats subjected to ischemia reperfusion. *ScientificWorldJournal* 10, 1180-91.
- Müller** WE, Heiser J, Leuner K (2012). Effects of the standardized *Ginkgo biloba* extract Egb761[®] on neuroplasticity. *Int Psychogeriatr* 24(1), S21-S24.
- Murray** TJ, Yang X, Sherr DH (2006). Growth of a human mammary tumor cell line is blocked by galangin, a naturally occurring bioflavonoid, and is accompanied by down-regulation of cyclins D3, E, and A. *Breast Cancer Res* 8, R17.
- Nakazawa** T, Yasuda T, Ohsawa K (2003). Metabolites of orally administered *Magnolia officinalis* extract in rats and man and its antidepressant-like effects in mice. *J Pharm Pharmacol* 55(11), 1583-1591.
- Ndhlala** AR, Moyo M, Van Staden J (2010). Natural Antioxidants: Fascinating or Mythical Biomolecules? *Molecules* 15, 6905-6930.
- Nikolic** M, Nikic D, Petrovic B (2008). Fruit and vegetable intake and the risk for developing coronary heart disease. *Cent Eur J Public Health* 16, 17–20.
- Nöthlings** U, Murphy SP, Wilkens LR, Henderson BE, Kolonel LN (2007). Flavonols and pancreatic cancer risk: the multiethnic cohort study. *Am J Epidemiol* 166(8), 924–931.
- Ong** KC, Khoo HE (1997). Biological effects of myricetin. *Gen Pharmacol* 29(2), 121-126.
- Osterud** B, Bjorklid E (2003). Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol Rev* 83, 1069-1112.
- Otsuyama** KI, Ma Z, Abroun S, Amin J, Shamsasenjan K, Asaoku H, Kawano MM (2007). PPARbeta-mediated growth suppression of baicalein and dexamethasone in human myeloma cells. *Leukemia* 21, 187–190.
- Ou** B, Hampsch-Woodill M, Prior RL (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 49, 4619-4626.

Ou HC, Chou FP, Sheu WH, Hsu SL, Lee WJ (2007). Protective effects of magnolol against oxidized LDL-induced apoptosis in endothelial cells. *Arch Toxicol* 81(6), 421-432.

Ovaskainen ML, Torronen R, Koponen JM, Sinkko H, Hellstrom J, Reinivuo H, Mattila P (2008). Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults. *J Nutr* 138, 562–566.

Ozcelik B, Lee JH, Min DB (2003). Effects of light, oxygen, and pH on the absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *J Food Sci* 68(2), 487-490.

Park J, Lee J, Jung E, Park Y, Kim K, Park B, Jung K, Park E, Kim J, Park D (2004). *In vitro* antibacterial and anti-inflammatory effects of honokiol and magnolol against *Propionibacterium* sp. *Eur J Pharmacol* 496(1-3), 189-195.

Park JB, Lee MS, Cha EY, Lee JS, Sul JY, Song IS, Kim JY (2012) Magnolol-induced apoptosis in HCT-116 colon cancer cells is associated with the AMP-activated protein kinase signaling pathway. *Biol Pharm Bull* 35(9), 1614-1620.

Peng CY, Pan SL, Huang YW, Guh JH, Chang YL, Teng CM (2008). Baicalein attenuates intimal hyperplasia after rat carotid balloon injury through arresting cell-cycle progression and inhibiting ERK, Akt, and NF-kappa B activity in vascular smooth-muscle cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 378, 579–588.

Pietta PG (2000). Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 63, 1035-1042.

Pitozzi V, Jacomelli M, Zaid M, Luceri C, Bigagli E, Lodovici M, Ghelardini C, Vivoli E, Norcini M, Gianfriddo M, Esposito S, Servili M, Morozzi G, Baldi E, Bucherelli C, Dolara P, Giovannelli L (2010). Effects of dietary extra-virgin olive oil on behaviour and brain biochemical parameters in ageing rats. *Br J Nutr* 103, 1674-83.

Prior LR, Wu X, Schaichi K (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53(10), 4290-4302.

Prior RL, Guohua C (1999). *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Rad Biol Med* 27, 1173-1181.

Rapporti ISTISAN 05/40 (2005). Radicali liberi, stress ossidativo e salute. *Istituto Superiore di Sanità*.

Ratty AK, Das NP (1988). Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. *Biochem Med Metab Biol* 39, 69-79.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med* 20, 933-956.

- Rimm EB**, Stampfer MJ, Asherio A, Giovannucci E, Colditz GA, Willett WC (1993). Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 328, 1450-1456.
- Roschlau P**, Bernt E, Gruber W (1974). Enzymatic determination of total cholesterol in serum. *Z Klin Chem Klin Biochem* 12, 226.
- Ross R** (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362, 801-809.
- Saija A**, Uccella N (2000). Olive biophenols: functional effects on human wellbeing. *Trends Food Sci Technol* 11(9-10), 357-363.
- Sánchez-Moreno C**, Larrauri JA, Saura-Calixto F (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agric* 76, 270-276.
- Scalbert A**, Williamson G (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130, 2073-2085.
- Schumaker VN**, Puppione DL (1986). *Methods in enzymology* 128, 155-170.
- Shahidi F**, Naczki M (1995). Phenolic Compounds in Fruits and Vegetables: Food Phenolics, Sources, Chemistry. *Technomic Publishing*, 75-107.
- Shaw PX**, Horkko S, Chang MK, Curtiss LK, Palinski W, Silverman GJ, Witztum JL (2000). Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance and protective immunity. *J Clin Invest* 105, 1731-40.
- Shen YC**, Chiou WF, Chou YC, Chen CF (2003). Mechanisms in mediating the anti-inflammatory effects of baicalin and baicalein in human leukocytes. *European J of Pharm* 465, 171-181.
- Shu-Jing Wu**, Lean-Teik Ng (2008). Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) in Taiwan. *Food and Science Technology*, 41, 323-330.
- Sohn SJ**, Huh IH, Au WW, Heo MY (1998). Antigenotoxicity of galangin against N-methyl-N-nitrosourea. *Mutat Res* 402, 231-236.
- Stampfer MJ**, Hennekens CH, Manson JE, Colditz GA, Rosner B, Willett WC (1993). Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* 328, 1444-1449.
- Steinberg D** (1997). Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 272, 20963-20966.

Suzuki E, Sato M, Takezawa R, Usuki T, Okada T (2011). The facilitative effects of bilobalide, a unique constituent of *Ginkgo biloba* on synaptic transmission and plasticity in hippocampal subfields. *J of Phys Sciences* 61, 421–427.

Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Sakaguchi H, Kruijt JK, Higashi T, Suzuki T, van Berkel TJ, Horiuchi S, Takahashi K, Yazaki Y, Kodama T (1997). The multiple roles of macrophage scavenger receptors (MSR) *in vivo*: resistance to atherosclerosis and susceptibility to infection in MSR knockout mice. *J Atheroscler Thromb* 4, 1-11.

Sylvestre M, Legault J, Dufour D, Pichette A (2005). Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L. *Phytomedicine* 12(4), 299–304.

Szliszka E, Czuba ZP, Bronikowska J, Mertas A, Paradysz A, Krol W (2011). Ethanol extract of propolis augments TRAIL-induced apoptotic death in prostate cancer cells. *Evid Based Complement Alternat Med*, 1-11.

Taniguchi H, Yoshida T, Horinaka M, Yasuda T, Goda AE, Konishi M, Wakada M, Kataoka K, Yoshikawa T, Sakai T (2008). Baicalein overcomes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance via two different cell-specific pathways in cancer cells but not in normal cells. *Cancer Res* 68, 8918–8927.

Tepe B, Daferera D, Sokmen A, Sokmen M, Polissiou M (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chem* 90, 333-340.

Tsai JY, Su KH, Shyue SK, Kou YR, Yu YB, Hsiao SH, Chiang AN, Wu YL, Ching LC, Lee TS (2010). EGb761 ameliorates the formation of foam cells by regulating the expression of SR-A and ABCA1: role of haem oxygenase-1. *Cardiovasc Res* 88(3), 415-423.

Tsai SK, Huang CH, Huang SS, Hung LM, Hong CY (1999). Antiarrhythmic effect of magnolol and honokiol during acute phase of coronary occlusion in anesthetized rats: influence of L-NAME and aspirin. *Pharmacology (Basel)* 59(5), 227-233.

Wang AM, Ku HH, Liang YC, Chen YC, Hwu YM, Yeh TS (2009). The autonomous notch signal pathway is activated by baicalin and baicalein but is suppressed by niclosamide in K562 cells. *J Cell Biochem* 106, 682–692.

Wang H, Joseph JA (1999). Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Rad Biol Med* 27, 612-616.

Wang L, Ling Y, Chen Y, Li CL, Feng F, You QD, Lu N, Guo QL (2010). Flavonoid baicalein suppresses adhesion, migration and invasion of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Cancer Lett* 297, 42–48.

Wang SJ, Tong Y, Lu S, Yang R, Liao X, Xu YF, Li X (2010). Anti-inflammatory activity of *Myricetin* isolated from *Myrica rubra* Sieb. et Zucc. leaves. *Planta med* 76(14), 1492-1496.

Wang Y, Wang L, Liu Z, Zhang D, Zhang Q (2012). *In vivo* evaluation of silybin nanosuspensions targeting liver. *J Biomed Nanotechnol* 8(5), 760-769.

Wang ZJ, Zhang Q, Zhao XH (2009). Suppressive effect of galangin on human esophageal squamous cell carcinoma cell line KYSE-510. *Chin J Biochem Mol Biol* 25, 563–569.

Watanabe K, Watanabe H, Goto Y, Yamaguchi M, Yamamoto N, Hagino K (1983). Pharmacological properties of Magnolol and Honokiol extract from *Magnolia officinalis*: central depressant effects. *Planta Med* 49(10), 103-108.

WHO – World Health Organization (2012). Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control. *World Heart Federation and World Stroke Organization*.

Yla-Herttuala S, Palinski W, Butler SW, Picard S, Steinberg D, Witztum JL (1994). Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL. *Arterioscler Thromb* 14, 32-34.

Yoshida H, Kisugi R (2010). Mechanisms of LDL oxidation. *Clin Chim Acta* 411, 1875-1882.

Yu X, He G, Du G (2012). Neuroprotective effect of baicalein in patients with Parkinson's disease. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 37(4), 421-425.

Zhang HT, Luo H, Wu J, Lan LB, Fan DH, Zhu KD, Chen XY, Wen M, Liu HM (2010). Galangin induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells via the mitochondrial pathway. *World J Gastroenterol* 16, 3377–3384.

Zhang Y, Song L, Cai L, Wei R, Huc H, Jin W (2013). Effects of baicalein on apoptosis, cell cycle arrest, migration and invasion of osteosarcoma cells. *Food Chem Tox* 53, 325-333.

Zhou LJ, Song W, Zhu XZ, Chen ZL, Yin ML, Cheng XF (2000). Protective effects of bilobalide on amyloid beta-peptide 25–35-induced PC12 cell cytotoxicity. *Acta Pharmacologica Sinica* 21, 75–79.

Zhou QM, Wang S, Zhang H, Lu YY, Wang XF, Motoo Y, Su SB (2009). The combination of baicalin and baicalein enhances apoptosis via the ERK/p38 MAPK pathway in human breast cancer cells. *Acta Pharmacol Sin* 30, 1648–1658.

<http://www.iss.it/esps/> (**Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute, ISS**);
<http://www.sinut.it/> (**3° Congresso Nazionale SiNut 2012**).