1.3.2 Identificazione negli alimenti e attività biologica di composti ciclici solforati di interesse nutrizionale

M. Nardini

Obiettivi

a) Identificazione delle chetimine e di loro derivati, in particolare dell'AECK-DD, in prodotti alimentari di origine vegetale.

b) Caratterizzazione dell'attività delle chetimine e loro derivati in modelli cellulari, con particolare riferimento alla capacità di modulare la risposta cellulare al danno ossidativo.

Descrizione dell' attività

E' stata recentemente identificata una nuova classe di composti ciclici solforati denominati chetimine, derivati dagli aminoacidi cistationina, aminoetilcisteina, chetimina e lantionina. Le chetimine e i loro prodotti di riduzione e dimerizzazione sono stati identificati nelle urine e nel plasma umano e nel cervello di mammifero. Sebbene siano stati identificati alcuni enzimi coinvolti nel metabolismo di questi composti, la loro origine e il loro ruolo fisiologico sono tuttora poco chiari. Le chetimine e alcuni loro derivati possiedono una forte attività antiossidante, dovuta alla presenza nella struttura ciclica di un atomo di zolfo. Questo elemento, potendo esistere in numerosi stati di ossidazione, renderebbe le molecole che lo contengono particolarmente adatte ad un ruolo di "scavenger" di radicali liberi e specie ossidanti. Tra i derivati delle chetimine, il dimero decarbossilato dell'aminoetilcisteina chetimina (AECK-DD) possiede un'attività antiossidante paragonabile a quella della vitamina E e superiore a quella dell'acido ascorbico e del glutatione. L'AECK-DD è in grado di interagire in vitro con le specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto e di inibire l'ossidazione in vitro delle lipoproteine a bassa densità (LDL) e la nitrosilazione della tirosina indotta da perossinitrito. L'effetto protettivo dell'AECK-DD sul danno ossidativo alle LDL è stato osservato per concentrazioni $\geq$25 nM, mentre nell'uomo è riportata una concentrazione plasmatica di AECK-DD di 3-4 μM. Studi precedenti da noi effettuati hanno dimostrato la presenza di alcuni di questi composti solforati, in particolare dell'AECK-DD, in alimenti di origine vegetale, quali aglio, cipolla, pomodoro, spinaci, zucchine, cavolfiore.

E' stato messo a punto un metodo molto sensibile per la determinazione dell'AECK-DD mediante cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) con rivelatore elettrochimico. Il metodo sviluppato ha mostrato un'eccellente precisione e accuratezza e si è riveltato 100 volte più sensibile del metodo gas-cromatografico e 2000 volte più sensibile rispetto alla cromatografia liquida con rivelatore spettrofotometrico. Il potenziale del rivelatore utilizzato (+400 mV) per la determinazione dell'AECK-DD ha mostrato un'alta selettività e specificità. Inoltre l'alta sensibilità ottenuta ha consentito lo studio dell'uptake dell'AECK-DD da parte di cellule monocitiche in coltura. Tale metodo è stato inoltre applicato alla determinazione delle concentrazioni plasmatiche dell'AECK-DD nel plasma umano. Il metodo sviluppato, per la sua alta sensibilità e specificità, consentirà lo studio dell'assorbimento, del trasporto e della localizzazione intracellulare dell'AECK-DD. Lo studio effettuato su una linea cellulare monocitoide umana (U937) ha mostrato che l'AECK-DD è in grado di modulare lo stress ossidativo indotto da t-butil idroperossido. L'incorporazione di AECK-DD nelle cellule è stata dimostrata con tecniche di HPLC e gas-massa. Le cellule supplementate per 24 h con AECK-DD in un intervallo di concentrazioni da 4 a 100 μM hanno mostrato percentuali di sopravvivenza allo stress ossidativo indotto da tBOOH significativamente più alte rispetto alle cellule di controllo. L'effetto protettivo dell'AECK-DD è risultato superiore, a parità di concentrazioni, rispetto a quello di altri antiossidanti noti, come il trolox e la N-acetil cisteina e addirittura superiore a quello della vitamina E. Inoltre le cellule supplementate con AECK-DD mantengono livelli di glutatione più alti rispetto alle cellule di controllo durante il trattamento con tBOOH.

Poiché l'effetto protettivo dell'AECK-DD nei riguardi di un severo stress ossidativo indotto da alte concentrazioni di perossido (500 μM) è risultato significativo anche per concentrazioni di AECK-DD quali quelle misurate nel plasma di soggetti sani (2-4 μM), in condizioni di digiuno, si può ipotizzare che l'AECK-DD possa realmente svolgere un ruolo significativo nella modulazione dei processi ossidativi *in vivo*.

Parole chiave
Aminoacidi solforati ciclici, AECK-DD, stress ossidativo, antiossidanti.

Partecipanti alla ricerca	**Mesi/persona**	**Qualifica**
M. Nardini	3	TEC
C. Scaccini	1	P.RIC
V. Gentili	2	CTER

Collaborazioni esterne

Universita' di Roma "La Sapienza"	R.M. Matarese	ASS
" " "	A. Macone	SPE
Istituto Superiore di Sanità	A. Maggio	RIC
Consiglio Nazionale delle Ricerche	A. Antonucci	RIC

La ricerca e'stata finanziata a tutt'oggi dal MURST (Prof. R.M. Matarese, Università di Roma "La Sapienza"). E' stato richiesto cofinanziamento interno.

1.3.3 - Ruolo di componenti della dieta nella prevenzione delle malattie cronico-degenerative.

A. Ghiselli, M. Nardini, C. Scaccini,F. Virgili

Obiettivi

- Approfondimento delle conoscenze dei meccanismi alla base del rapporto tra nutrizione e rischio di malattie cronico-degenerative.
- Identificazione di meccanismi e markers di esposizione a rischio ossidativi

Descrizione dell'attività

1. Attività biologica di polifenoli di interesse nutrizionale

Il consumo di flavonoidi è considerato tra i fattori più importanti alla base dell'effetto protettivo di una dieta ricca in alimenti di origine vegetale nel rischio di malattie cronico degenerative. Il loro contributo a tale protezione è stato attribuito fondamentalmente alla loro capacità antiossidante. Più recentemente, è stato evidenziata l'esistenza attività biologiche non associate a tale capacità, ed in particolare dovute all'interazione con diversi percorsi di risposta cellulare. In questo anno sono stati studiati alcuni meccanismi alla base della protezione da parte di flavonoidi, dal rischio di patologie associate alla disfunzione del segnale mediato dai recettori degli estrogeni (ER), già evidenziata a livello epidemiologico.

Abbiamo valutato l'attività di quercetina e naringenina, flavonoidi particolarmente comuni nella nostra dieta, come ligandi del recettore α (ERα) sia per quanto riguarda la risposta genomica, ovvero dovuta al legame diretto del recettore attivato sul gene a livello di sequenze ERE, che non genomica ovvero dovuta all'attivazione di percorsi di segnalazione intracellulare, quali quelli mediati da ERK e PKC, e di fattori trascrizionali, quali AP-1 e NF-κB, che controllano diversi aspetti della risposta cellulare. Lo studio è stato effettuato su di una linea cellulare epiteliode priva del recettore e transfettata temporaneamente con un plasmide codificante per l'ERα e utilizzando concentrazioni di flavonoidi raggiungibili a livello plasmatici per mezzo di un'alimentazione ricca di fonti di queste sostanze. I nostri dati suggeriscono un possibile meccanismo alla base dell'azione preventiva proposta per alcuni flavonoidi nelle patologie cardiovascolari e anche in neoplasie associate alla disfunzione dell'attività dei ER.

Tale attività non è necessariamente legata alle proprietà antiossidanti delle molecole in studio, anche se va tenuto conto della loro partecipazione al "network" antiossidante cellulare. Pertanto la loro disponibilità nell'ambiente è strettamente legata all'equilibrio ossido-riduttivo cellulare, e più in generale dell'organismo

2. Destino metabolico di polifenoli nell'uomo

Nel 2003 è stato studiato l'assorbimento nell'uomo degli acidi fenolici presenti nella birra. La birra utilizzata contiene acido 4-OH-fenilacetico, vanillico, caffeico, p-cumarico, ferulico e sinapico, come acidi fenolici presenti in forma libera. Dopo idrolisi alcalina sono state rilevate elevate quantità di acido vanillico, caffeico, ferulico e sinapico e, in misura minore, di acido 4-OH-fenilacetico e p-cumarico. Nello studio in vivo, sono stati somministrati 500 ml di birra (con 27 g di crackers) a soggetti sani a digiuno. Il sangue è stato prelevato al tempo 0 (prima della somministrazione di birra e crackers) e dopo 30 min e 60 min dalla somministrazione. Il plasma ottenuto, dopo opportuni trattamenti, è stato analizzato in EC-HPLC per il contenuto in acidi fenolici liberi e totali (liberi + legati). Il contenuto in acidi fenolici totali è stato valutato dopo idrolisi enzimatica in presenza di beta-glucuronidasi, solfatasi, beta-glucuronidasi + solfatasi. Inoltre, per la presenza di composti che interferiscono con l'analisi di cromatografia in fase liquida, è stato necessario mettere a punto una procedura di purificazione dei campioni mediante estrazione in fase solida su resine a scambio anionico. I risultati preliminari mostrano un aumento notevole dei livelli plasmatici di acido 4-OH-fenilacetico e acido vanillico, presenti prevalentemente in forma libera e, in misura minore, anche in forma legata come glucuronati e

solfati, dopo 30 e 60 minuti dalla somministrazione di birra. E' stato anche osservato un aumento significativo dei livelli plasmatici di acido caffeico e ferulico, presenti prevalentemente in forma legata, sia come glucuronati che come solfati. Per tutti gli acidi fenolici analizzati, si è osservato un picco massimo di assorbimento plasmatico a 30 min dalla somministrazione. Per quanto riguarda l'acido 4-OH-fenilacetico, si sono osservati aumenti di circa 4 volte della concentrazione plasmatica misurata a 30 min dalla somministrazione rispetto ai valori ottenuti al tempo 0, e si sono raggiunte concentrazioni nel range 1.3-1.5 μM a 30 min dalla somministrazione. Per gli acidi vanillico, caffeico e ferulico si sono osservati aumenti di 2-3 volte della concentrazione plasmatica misurata a 30 min dalla somministrazione rispetto ai valori ottenuti al tempo 0, e le concentrazioni plasmatiche misurate a 30 min sono nel range 0.03-0.13 μM.

Parole chiave

Antiossidanti, radicali liberi, stress ossidativo, risposta cellulare, espressione genica, fattori trascrizionali, biodisponibilità, capacità antiossidante

Partecipanti alla ricerca

A. Ghiselli	P.RIC
C. Scaccini	P.RIC
M. Nardini	TEC
F. Virgili	RIC
R. Ambra	RIC-C
F. Natella	RIC-C
M. Di Felice	CTER
V. Gentili	CTER
R. Canali	AR
F. Muratori	DOT
F. Belelli	TES
A. Rinna	TES
M. Fidale	TES

Collaborazioni esterne

Università di Roma	F. Violi	ORD
Università di Padova	F. Ursini	ORD
Università di Modena	A. Tomasi	ORD
Università di Reading (U.K.)	G. Rimbach	ASS
CNR – Roma	T. Parasassi	RIC

1.3.4 - Effetto di una dieta arricchita con carotenoidi e tocotrienoli da olio di palma, sulla progressione e metastasi tumorale

F. Virgili

Obiettivi

Studio delle basi molecolari dell'effetto di componenti dell'olio di palma (carotenoidi, tocoferoli e tocotrienoli) sullo sviluppo di neoplasie

Descrizione dell'attività

In collaborazione con il Malaysian Palm Oil Board (MPOB) abbiamo precedentemente messo a punto un protocollo che permette la purificazione di una frazione ricca di carotenoidi e tocotrienoli (CTRF, carotenoid/tocotrienol rich fraction) dall'olio di palma, al fine di valutarne le proprietà anti-proliferative e anti-tumorali. Durante il periodo gennaio 2003-gennaio 2004 oggetto del presente consuntivo, abbiamo saggiato le proprietà del CTRF su due modelli sperimentali: *in vitro*, su una linea cellulare (MCF-7) ottenuta da un tumore mammario umano e *in vivo*, utilizzando un modello di cancerogenesi animale costituito da topi transgenici *nudi*, ovvero privati della risposta immunitaria responsabile dei fenomeni di rigetto. L'inoculo dei topi viene effettuato mediante iniezione con un ago all'interno di una tasca toracica di un volume di 50 microlitri di soluzione salina contenente $1x10^6$ cellule MCF-7. La capacità del CTRF di modulare la crescita tumorale è stata osservata alimentando i topi iniettati con una dieta commerciale arricchita con CTRF per 20 settimane. I topi vengono pesati e il sito di inoculo palpato ad intervalli settimanali per valutare la crescita tumorale. Alla fine degli esperimenti i topi sono stati sacrificati e valutate le masse tumorali. I nostri risultati indicano che la somministrazione del CTRF è in grado di rallentare significativamente la proliferazione delle cellule di tumore mammario sia *in vitro* che *in vivo*. In particolare la dieta ricca in CTRF era associata ad una diminuzione della percentuale di topi con masse tumorale palpabili.

Al fine di comprendere i meccanismi molecolari associati alla riduzione della proliferazione tumorale nei topi, abbiamo utilizzato un approccio genomico consistente nell'analisi globale dell'espressione genica mediante macroarrays, membrane di nylon contenenti migliaia di geni dei quali è possibile valutare i livelli di espressione. I risultati di tali esperimenti sono stati confermati mediante la metodica del Northern blot che permette una valutazione quantitativa dell'espressione genica. I risultati ci hanno permesso di identificare markers genetici specificamente associati con l'effetto antitumorale del CTRF. In particolare, dall'analisi dei pattern di espressione genica, emerge la possibilità che gli effetti anti-tumorali del CTRF si esplicano attraverso la modulazione delle risposte immunitarie. Questo fenomeno potrebbe avvenire attraverso l'osservata induzione dell'espressione di proteine coinvolte nell'inibizione della crescita cellulare quali l'interferon-induced protein-1. Attualmente stiamo valutando la possibilità che i tocotrienoli siano in grado di indurre la produzione di interferoni nell'ospite. In alternativa i tocotrienoli potrebbero esercitare i loro effetti antitumorali inibendo la capacità delle cellule tumorali di sfuggire alla risposta immunitaria: il trattamento con tocotrienoli era infatti associato alla riduzione dell'espressione di proteine di membrana che normalmente consentono alle cellule tumorali di eludere l'attacco da parte dei linfociti T attivati.

Per meglio comprendere i meccanismi molecolari coinvolti nella modulazione delle risposte immunitarie, stiamo attualmente studiando gli effetti genici nella milza dei topi nudi alimentati con CTRF. A tale scopo, mediante macro array contenenti 5000 geni murini, stiamo valutando l'espressione genica globale nella milza di animali alimentati con CTRF nei quali non si sono sviluppati fenomeni tumorali in seguito all'iniezione delle cellule MCF-7.

Tali ricerche consentiranno l'approfondimento dei meccanismi molecolari alla base degli effetti anti-tumorali di carotenoidi e tocoferoli assunti con la dieta.

Parole chiave
Progressione tumorale e metastasizzazione, olio di palma, tocotrienoli, carotenoidi, geno-typing

Partecipanti alla ricerca	**Mesi/uomo**	**Qualifica**
F. Virgili	2	RIC
R. Ambra	3	RIC-C
A. Rinna	11	TES

Collaborazioni esterne

MPOB Selangor-Malaysia	K. Nesaretnam	DIR

1.3.5 - Studio della modifica della carica elettrica delle LDL in alcune patologie croniche

C. Scaccini, F. Natella

Obiettivi
Identificazione di markers precoci di rischio ossidativi

Descrizione dell'attività
Nel corso degli anni sono andate accumulandosi evidenze sul ruolo che lo 'stato postprandiale' può avere nello sviluppo dell'aterosclerosi. Studi epidemiologici dimostrano che i livelli postprandiali di trigliceridi rappresentano un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di malattie cardiovascolari. In studi condotti in vivo sull'uomo, è stato osservato che il consumo di un pasto ricco in grassi determina: un transiente stato di stress ossidativo, una transiente risposta infiammatoria ed una transiente disfunzione endoteliale. Alcuni autori ritengono che prodotti di perossidazione lipidica presenti negli alimenti possano essere causa di questi eventi, e, quindi, rappresentare un fattore contributivo allo sviluppo della malattia. E' stato, infatti, dimostrato che una dieta ricca in prodotti di perossidazione lipidica accelera lo sviluppo dell'aterosclerosi in animali da esperimento. In studi condotti in vivo su modelli animali e sull'uomo, è stato dimostrato che idroperossidi dei lipidi e ossidi del colesterolo di origine alimentare possono sfuggire ai sistemi di riduzione e detossificazione presenti sulla barriera intestinale, venire incorporati nei chilomicroni, e da questi scambiati con le altre classi di lipoproteine, contribuendo alla formazione di forme ossidate di lipoproteine. A seguito del consumo di un pasto ricco in grassi abbiamo, infatti, dimostrato un aumento nel contenuto plasmatico di una forma modificata di lipoproteine a bassa densità, le LDL(-), e da un maggior contenuto in idroperossidi dei lipidi.
Poiché il processo di riduzione dei perossidi di origine alimentare, che ha luogo nel tratto gastrointestinale, è catalizzato da glutatione perossidasi selenio dipendenti, abbiamo voluto valutare l'effetto della supplementazione di selenio sulla formazione postprandiale di LDL(-).
Quattordici soggetti sani hanno consumato un pasto composto da due cheeseburgers, prima e dopo un periodo di supplementazione con selenio (10 giorni di supplementazione con 110 μg/die di selenio); il profilo lipemico, la concentrazione plasmatica dei principali antiossidanti, un indicatore di perossidazione lipidica (MDA), la concentrazione di LDL-meno, e la resistenza delle LDL all'ossidazione in vitro sono stati misurati a tempo 0 e 3 ore dopo il pasto.
I risultati ottenuti hanno dimostrato (i) che un pasto ricco in grassi induce uno stato di stress ossidativo, come evidenziato dall'incremento nella concentrazione plasmatica di MDA (da 0.96±0.17μM del tempo 0 a 1.08±0.27μM tre ore dopo il pasto, $p<0.05$), di LDL-meno (da 4.5±2.2% del tempo 0 a 6.5±3.9% tre ore dopo il pasto, $p<0.05$) e della suscettibilità delle LDL all'ossidazione in vitro (la durata della fase di latenza tre ore dopo il pasto era pari al 92±7% del tempo 0, $p<0.005$), e (ii) che la supplementazione con selenio inibisce lo stress ossidativo indotto dal pasto. Infatti, dopo il periodo di supplementazione, non è stato osservato nessun incremento nella concentrazione plasmatica di MDA (da 0.87±0.16μM del tempo 0 a 0.90±0.20μM tre ore dopo il pasto), di LDL(-) (da 5.4±1.7% del tempo 0 a 5.4±1.8% tre ore dopo il pasto) e nella suscettibilità delle LDL all'ossidazione in vitro (la durata della fase di latenza tre ore dopo il pasto era pari al 100±12% del tempo 0). Sebbene non disponiamo delle informazioni necessarie per comprendere il meccanismo biomolecolare che sta alla base di questi eventi, l'ipotesi è che il selenio abbia agito sull'attività delle glutatione perossidasi presenti nel tratto gastro-intestinale.
Il lavoro condotto potrebbe contribuire a spiegare le osservazioni epidemiologiche, che dimostrano un'associazione negativa tra introito di selenio ed incidenza delle malattie cardiovascolari.

Parole chiave: LDL-, diabete mellito, vasculopatie periferiche.

Partecipanti alla ricerca	**Mesi/persona**	**Qualifica**
F. Natella	5	RIC-C
C. Scaccini	6	P-RIC
A. Ghiselli	6	P-RIC
M. Di Felice	2	CTER
V. Gentili	2	CTER
F. Belelli	3	TES
M. Fidale	11	TES

Collaborazioni esterne

Università di Padova	F. Ursini	ORD
CNR – Roma	T. Parasassi	RIC

1.3.6 - Ruolo dei componenti della dieta nella progressione delle cardiomiopatie degenerative

F. Virgili

Obiettivi

Studio degli meccanismi molecolari attraverso cui i componenti di una dieta a base di vegetali e semi di lino o girasole sono in grado di prevenire e modulare i processi che conducono allo sviluppo della cardiomiopatia.

Descrizione dell'attività

Lo studio è stato effettuato in collaborazione con il Dipartimento di Medicina Interna dell'Università di Tor Vergata durante il periodo gennaio-dicembre 2004. L'obbiettivo della ricerca è stato quello di valutare gli effetti di una dieta ricca in acidi grassi polinsaturi della serie ω-6 o ω-3, nello sviluppo e nella progressione delle cardiomiopatie. A tale scopo è stato utilizzato l'hamster cardiomiopatico le cui caratteristiche fisiopatologiche sono sovrapponibili ad alcuni tipi di cardiomiopatia umana.

Le diete, composte da vegetali e semi di lino o girasole, sono state somministrate agli animali sia per lungo tempo dallo svezzamento fino alla morte, oppure per un breve periodo di 24 ore.

I risultati mostrano che le diete erano in grado di prevenire lo sviluppo delle alterazioni cellulari che si manifestano a livello dei miociti striati negli animali nutriti con dieta standard.

Nostri studi molecolari, volti all'analisi dell'espressione di proteine coinvolte nei processi proliferativi dei cardiomiociti, dimostrano che gli acidi grassi polinsaturi sono associati alla regolazione dello sviluppo e differenziamento dei miociti. In particolare le diete erano associate all'inibizione delle vie di segnalazione intracellulari associate all'apoptosi e alla regolazione dell'espressione dei fattori di crescita e di proteine strutturali.

Gli effetti della dieta studiati non sono riconducibili esclusivamente agli acidi grassi polinsaturi ma ad una combinazione delle varie componenti della dieta che include anche antiossidanti. Gli antiossidanti, infatti, modulano l'espressione genica direttamente attraverso gli antioxidant responsive element (ARE) localizzati in diversi promotori altrimenti indirettamente attraverso il legame con fattori di trascrizione NF-□B, AP-1.

Al momento stiamo mettendo a punto un protocollo per l'isolamento di cardiomiociti primari dal cuore di hamster cardiomiopatici. Studi effettuati su queste cellule permetteranno la migliore comprensione dei meccanismi della progressione della malattia.

Inoltre, la ricerca nel prossimo anno sarà rivolta allo studio del coinvolgimento dei fattori di trascrizione, NF-□B e AP-1, nei meccanismi associati alla dieta nel prevenire lo sviluppo della cardiomiopatia nell'hamster.

Parole chiave

cardiomiopatia, stress ossidativo, acidi grassi polinsaturi, antiossidanti

Partecipanti alla ricerca

F. Virgili	3	RIC
R. Canali	11	ASS
M. Nardini	1	RIC
F.Natella	2	RIC-C
C. Scaccini	1	P-RIC
M. Di Felice	2	CTER
V. Gentili	1	CTER

Collaborazioni esterne Laboratorio di Cardiologia Molecolare e Cellulare Università di Tor Vergata	P. Di Nardo	RIC

1.3.7 - Vino, Ocratossina A, antiossidanti

G Santaroni

Obiettivi

L'obiettivo principale è d'incrementare le attuali conoscenze sugli effetti sulla salute dell'uomo dell'ocratossina A (OTA) ingerita con il vino al fine di fornire un valido supporto scientifico alla eventuale definizione del limite di concentrazione accettabile della tossina nel vino. Il protocollo di ricerca approntato prevede il raggiungimento dell'obiettivo mediante

A) ottimizzazione di metodologie analitiche per la determinazione dell'ocratossina A e di sostanze con capacità antiossidante in matrici diverse,

B) individuazione di meccanismi di trasporto a livello intestinale umano, possibili interazioni tra alcune sostanze con capacità antiossidante e detta tossina,

C) definizione di meccanismi d'azione e composti che provocano e/o ostacolano a livello vegetale la formazione dell'ocratossina A individuando cultivar resistenti all'OTA,

D) valutazione dei consumi delle principali tipologie di vino in Italia per sesso, classi d'età, aree geografiche al fine di fornire i dati necessari ad un'adeguata valutazione del rischio da ingestione da OTA per consumo di vino e rilevazione degli effetti su una popolazione "critica" dell'ingestione attraverso il vino di detta sostanza.

Descrizione dell'attività

Le attività sperimentali svolte durante questo primo anno riguardano 4 settori di intervento, il primo chimico analitico; il secondo biochimico; il terzo di fisiopatologia vegetale, ed infine quello di statistica ed epidemiologia. Sono stati quindi avviati altrettanti sottoprogetti dei quali vengono sintetizzati i risultati

Sottoprogetto A: sono stati definiti i protocolli analitici sulla base di prove sperimentali effettuate, per matrici alimentari e biologiche, per quanto riguarda la determinazione della capacità antiossidante totale, delle concentrazione di alcuni flavonoli (quercetina, miricetina, apigenina, kaempferolo), di alcune antocianine (malvidina, peonidina, petunidina, cianidina, delfinidina), di alcuni acidi fenolici (gallico, caffeico, caffeiltartarico, p-coumarico, 2.5 d S-glutationil-caftarico) e trans-resveratrolo. Per ciascuna metodica e per ciascun analista sono stati determinati i livelli di sensibilità, precisione ed accuratezza ottenuti Infine è quasi ultimata la definizione del protocollo relativo alla determinazione dell'OTA ed è in fase di sperimentazione in collaborazione con l'Università di Roma "Tor Vergata" e con l'Enea la messa a punto di un sensore per la determinazione dell'Ota nel vino.

Sottoprogetto B: è stato definito il protocollo sperimentale per individuare i meccanismi di trasporto a livello intestinale umano e le possibili interazioni tra alcune sostanze con capacità antiossidante e l'Ocratossina A prevedendo l'utilizzo della linea cellulare CaCo2. E' stato individuato il trattamento idoneo ad eliminare effetti tossici collaterali, aggiungendo una concentrazione 10 mM di soluzione tampone per mantenere il pH fisiologico e quello necessario ad evitare variazioni della capacità antiossidante dovute alla conservazione del vino per successivi esperimenti, liofilizzandolo e ricostituendo ciascuna aliquota in soluzione tampone al momento dell'esperimento. Infine per valutare l'integrità del monostrato di cellule intestinali Caco-2, e quindi la capacità di riprodurre funzionalmente la mucosa intestinale, è stata selezionata la misura della resistenza elettrica transepiteliale (TEER). Tali accorgimenti garantiscono l'assenza di tossicità dovuta alle condizioni operative. Sono in corso esperimenti per valutare l'effetto sulle cellule di vino con concentrazioni crescenti di OTA.

Sottoprogetto C: al fine di definire gli aspetti relativi ai meccanismi d'azione dei composti che possono provocare e/o ostacolare, a livello vegetativo, la formazione dell'ocratossina è stato allestito un esperimento per saggiare il comportamento di alcune sostanze, scelte in base a dati di letteratura, in presenza di un ceppo di *A. ochraceus* produttore di ocratossina A. Come substrato

è stato scelto grano proveniente da agricoltura biologica reso sterile e quindi privo di microrganismi potenziali ed altre sostanze competitori dell'*A. ochraceus* e gelatinizzato per renderlo più attaccabile da parte del fungo. La sperimentazione è stata condotta utilizzando concentrazioni di 3 composti crescenti dell'ordine di p.p.m. e frazioni (catechina, l'epicatechina e l'epicatechina gallato). Tali concentrazioni non influiscono sulla rilevazione dell'andamento sia della crescita fungina, che è rilevata mediante determinazione del contenuto di ergosterolo, sia della produzione dell'ocratossina A. I risultati finora ottenuti relativi alla valutazione della crescita fungina indicano un'efficacia diversa per le 3 sostanze sulla crescita fungina.

Sottoprogetto D: in collaborazione con l'Ospedale di Barletta è stato avviato uno studio pilota per acquisire indicazioni su possibili correlazioni tra consumi di vino contaminato da OTA ed eventuali effetti indesiderati dovuti alla presenza di questa tossina nel vino. E' stato approntato un questionario per la valutazione dei consumi alimentari di bevande ed altri alimenti potenzialmente contaminati da Ota. E' stato definito il protocollo per il prelievo e l'analisi di campioni alimentari (diete complete, vino e singoli alimenti) e biologici (sangue ed urine). I risultati preliminari indicano una presenza piuttosto diffusa nell'area indagata di autoconsumo di vino, e considerato che i dati di letteratura disponibili sono riferiti a campionature di vini imbottigliati e prelevati dal commercio, va verificato se tale fenomeno modifica le ipotesi derivate dai dati di letteratura.

Parole chiave
OTA, Antiossidanti, Salute

Partecipanti alla ricerca	**Mesi/persona**	**Qualifica**
G.P. Santaroni	4	TEC
L. Gambelli	8	CTER
A. Bertone	4	CTER
V. Vivanti	4	OT
A. Ghiselli	3	P.RIC
G. Perozzi	4	P.RIC
C. Murgia	2	RIC
G. Ranaldi	6	RIC-C
C. Devirgiliis	2	RIC-C
E. Finotti	3	RIC-C
L. D'Addezio	2	RIC-C
A. Turrini	3	P.RIC
G. Di Lena	4	P.TEC
A. De Amicis	2	CTER

Collaborazioni esterne	**Nominativo**	**Qualifica**
Università di Roma "Tor Vergata"	Palleschi Giuseppe	ORD
Università di Roma "Tor Vergata	Micheli Laura	RIC
Enea C.R. Casaccia	Cremisini Carlo	RIC
Enea C.R. Casaccia	Pillotton Roberto	RIC
Enea C.R. Casaccia	Ubaldi Carla	RIC

1.3.8 - Antiossidanti in alimenti dell'area mediterranea. Valutazioni chimico-nutrizionali, livelli di ingestione e riflessi sulla salute del consumatore.

L. Pizzoferrato, M. Carcea, G. Maiani, C. Leclercq

Obiettivi

Obiettivo generale del progetto, di cui sono coordinatori L. Pizzoferrato ed E. Quattrucci, è la valutazione di alcuni antiossidanti presenti in alimenti tipici del modello mediterraneo attraverso un approccio metodologico multidisciplinare che consenta lo studio dei diversi aspetti della problematica.

Descrizione dell'attività

Il progetto di ricerca pluriennale, finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, si è articolato in quattro sottoprogetti di cui si riporta, a cura dei relativi Responsabili, una sintesi dei risultati conseguiti.

Sottoprogetto 1. Antiossidanti naturali nella frazione lipidica di alimenti tipici dell'area mediterranea. (Resp. L.Pizzoferrato)

Obiettivi

Questo programma si propone un approfondimento dello studio di alcuni costituenti degli alimenti che, oltre a costituire elementi di particolare interesse nutrizionale per peculiari caratteristiche chimiche e/o attività biochimiche, si ritiene possano garantire una efficace azione protettiva nei confronti dei fenomeni ossidativi.
Con questo obiettivo si studieranno alimenti tipici del modello alimentare mediterraneo considerando sia prodotti di origine vegetale (olio extravergine d'oliva) che prodotti di origine animale (latte e derivati).

Descrizione dell'attività

Gli alimenti contengono nel loro corredo biologico dei composti con funzione antiossidante che, soprattutto se non allontanati dal contesto naturale, sono in grado di svolgere la loro azione con grande efficacia. La ricerca realizzata aveva la finalità di individuare alcuni di questi composti in prodotti tipici dell'area mediterranea ed era caratterizzata dall'approccio innovativo di non proporre l'isolamento di queste sostanze dalla matrice alimentare, ma piuttosto di valorizzarne la presenza naturale nella dieta.
Le tipologie alimentari selezionate per lo studio sono state latte e latti fermentati, formaggi ed olio extra vergine d'oliva. Nello studio sono stati approfonditi sia gli aspetti propriamente merceologici in prodotti disponibili sul mercato italiano, sia i meccanismi di azione antiossidante di composti quali tocoferoli, caroteni e squalene, in campioni sperimentali. Come ricaduta indiretta, riteniamo che la ricerca possa aver portato anche ad una valorizzazione di prodotti tradizionali italiani in termini di presenza di composti naturali antiossidanti, che andrà a completare il profilo merceologico, già ben noto, di questi alimenti.
Più nel dettaglio, l'attività di ricerca ha riguardato: i) lo studio del sistema antiossidante naturale costituito da alfa-tocoferolo, beta carotene e squalene in campioni di olio extravergine d'oliva, di provenienza e tecnica di lavorazione note, conservati utilizzando diverse combinazioni dei parametri luce/ossigeno/calore/tempo, ii) la valutazione del potere antiossidante attraverso l'applicazione del parametro "grado di protezione antiossidante", rapporto molare tra composti antiossidanti e bersaglio dell'ossidazione, iii) la verifica della stabilità all'ossidazione di olio extravergine d'oliva e latte.
Lo studio ha consentito di evidenziare che alimenti consumati normalmente nella dieta italiana oltre ad apportare, come già approfonditamente studiato, nutrienti importanti in una

alimentazione equilibrata, possano fornire anche altre sostanze benefiche per lo stato nutrizionale e per la salute del consumatore nonché per la conservabilità dell'alimento stesso.

Sottoprogetto 2. Potere antiossidante dei cereali e di piatti tipici mediterranei. (Resp. M.Carcea)

Obiettivi

Valutazione del potere antiossidante della materia prima tramite la purificazione e caratterizzazione chimica delle molecole con attività antiossidante presenti nei cereali (tocoferoli, tocotrienoli, squalene, acidi fenolici) in funzione delle diverse caratteristiche genetiche, delle condizioni ambientali e di tecnica colturale.
Valutazione del possibile utilizzo delle predette come integratori alimentari o principi terapeutici.
Studio dell'influenza delle tecnologie di prima e seconda trasformazione sul suddetto potere antiossidante e dei metodi di stabilizzazione chimica dei principi attivi durante le fasi di processo.
Valutazione dell'influenza della preparazione casalinga di prodotti tipici della dieta mediterranea sul potere antiossidante dei prodotti di seconda trasformazione.

Descrizione dell'attività

I cereali costituiscono, come è noto, la base dell'alimentazione di buona parte della popolazione mondiale e di quella italiana in particolare fornendo prodotti come pane, pasta, riso, etc. In considerazione dell'importanza alimentare dei cereali e della scarsità di informazioni nello specifico settore, si è pensato di intraprendere uno studio sui composti antiossidanti presenti nei cereali più importanti per l'economia agro-alimentare italiana, quali frumento e riso, in un'ottica di filiera o meglio cercando di capire che cosa succede dal "campo alla tavola".
Dopo una fase iniziale in cui si è proceduto allo studio su granelle sia di alcuni antiossidanti lipofili che di acidi fenolici, nei prodotti di prima e seconda trasformazione e sui piatti pronti l'attenzione è stata focalizzata sullo studio del gruppo di composti presenti in maggiore quantità e cioè sugli acidi fenolici che sono stati separati nelle 3 frazioni (insolubili legati, solubili liberi ed esterificati) e quantificati tramite metodo HPLC, sia come quantità totali che come pattern.
Granelle selezionate sono state molite in impianto pilota per ottenere sfarinati a diverso grado di abburattamento e semole con le quali sono stati prodotti rispettivamente pani diversi e pasta. Nel caso della panificazione sono stati posti a confronto pani ottenuti con fermentazione con lievito di birra e pani a pasta acida. I campioni sperimentali sono stati posti a confronto con prodotti industriali derivati dal commercio. Le paste sono state anche analizzate dopo cottura e dopo condimento con sugo di pomodoro per simulare la fase finale della preparazione casalinga.
Per la filiera riso campioni di origine industriale di risone e del corrispondente riso brillato sono stati studiati insieme a risone e riso brillato sottoposti al processo di parboilizzazione. Sono stati quindi preparati e analizzati i prodotti cotti e conditi similmente alla pasta di frumento duro.

Sottoprogetto 3. Biodisponibilità nell'uomo degli antiossidanti naturali di alimenti vegetali e capacità antiossidante in vivo. (Resp. G. Maiani)

Obiettivi

Il presente progetto si articola in tre fasi e si propone di studiare il profilo antiossidante dell'alimento, la biodisponibilità della componente antiossidante presente in esso e il suo impatto sulla salute del consumatore.

Gli obiettivi della ricerca che si intendono perseguire nel corso del terzo anno sono: 1) valutare la biodisponibilità nell'uomo di singole molecole antiossidanti naturali; 2) valutare la capacità antiossidante totale plasmatica dopo ingestione dell'alimento. Entrambi gli obiettivi sono da perseguire dopo ingestione acuta di selezionati vegetali freschi e dopo ingestione acuta degli stessi alimenti sottoposti a conservazione domestica.

Descrizione dell'attività

Il progetto di ricerca ha valutato: 1) il potenziale antiossidante totale dei vegetali selezionati utilizzando modelli in vitro ed ex–vivo;2) il contenuto di sostanze nutrienti e non nutrienti ad azione antiossidante (carotenoidi e polifenoli) negli alimenti selezionati e l'effetto della conservazione domestica sul contenuto di molecole bioattive; 3) la biodisponibilità nell'uomo di componenti naturali ad azione antiossidante e il potenziale antiossidante totale dopo ingestione di vegetali freschi e dopo conservazione domestica per tre giorni a + 5°C.

Nella prima fase di attività è stata valutata la proprietà antiossidanti di pomodoro, lattuga, cipolla e cavolo riccio, definendo una scala di potere antiossidante degli alimenti presi in esame. Nella seconda fase, è stato considerato l'effetto della conservazione domestica. dimostrando che la perdita in molecole bioattive è diversa in funzione del tipo di alimento e della maggiore superficie di scambio con l'ossigeno.

L'effetto protettivo dei flavonoidi maggiormente rappresentativi è stato studiato su colture di cellule umane (Caco2) nella complessità della matrice alimentare ed è stato esaminato l'effetto dei componenti lipo ed idro solubili degli alimenti sul ciclo cellulare. I risultati mostrano che gli estratti di alimento non sono tossici per le cellule Caco2 dopo sette giorni di conservazione mentre gli estratti di lattuga e cipolla inducono un ritardo nel ciclo cellulare conseguente ad un accumulo e quindi ad un blocco di cellule in fase S.

L'ultima fase d'attività prevedeva la valutazione della biodisponibilità nell'uomo dopo ingestione acuta dei vegetali studiati e il loro effetto, in vivo, sullo stato antiossidante. La lattuga e stata scelta come modello sperimentale. I risultati mostrano che la concentrazione di singole molecole antiossidanti plasmatiche e la capacità antiossidante plasmatica totale (TRAP) aumentano significativamente dopo 3 ore dall'ingestione della lattuga fresca. La lattuga conservata in condizioni domestiche aumenta leggermente il TRAP plasmatico senza però raggiungere la significatività statistica.

Sottoprogetto 4. Stima dei livelli di assunzione di antiossidanti aggiunti tecnologicamente e presenti naturalmente nella dieta italiana. Riflessi per la salute del consumatore. (Resp. C.Leclercq)

Obiettivi

Pianificazione di un sistema di banche dati per la sorveglianza dei livelli di assunzione di antiossidanti aggiunti tecnologicamente e presenti naturalmente nella dieta italiana.

Descrizione dell'attività

Lo studio dell'esposizione al rischio alimentare è un'attività di ricerca volta ad evidenziare se, nonostante le limitazioni imposte dalla legge, sia possibile, attraverso la dieta, l'assunzione di sostanze chimiche in dosi che possono comportare un rischio per la salute del consumatore.

A seguito di un'attenta analisi della legislazione italiana e della letteratura riguardante l'assunzione di antiossidanti è stata evidenziata la necessità di approfondimenti circa il rischio di superamento della Dose Giornaliera Ammissibile (DGA) per gli antiossidanti primari (gallati, BHA, BHT e acido eritorbico) ed i solfiti. Nel complesso le elaborazioni effettuate utilizzando metodologie di tipo «worst case analysis» hanno dimostrato una sostanziale sicurezza intrinseca della legge attualmente in vigore in Italia per quel che riguarda l'assunzione di gallati, BHA ed

acido eritorbico. I limiti d'uso imposti dalla normativa sono infatti tali da evitare il superamento della DGA anche per i consumatori con abitudini alimentari più a rischio. Non è stato possibile invece escludere il superamento delle corrispondenti DGA in fasce non trascurabili della popolazione per quel che riguarda il BHT ed i solfiti. Per questi ultimi sono state quindi identificate le principali fonti di assunzioni, sono stati considerati anche gli eventuali residui negli alimenti di BHT derivanti dal packaging o dai mangimi animali, ma queste non sono risultate importanti fonti di assunzioni.
Gli antiossidanti naturalmente presenti negli alimenti sono numerosi ma scarsa è la disponibilità di dati riguardanti il loro contenuto negli alimenti e la loro biodisponibilità. Particolarmente complessa risulta quindi la stima dei loro livelli di assunzione nella popolazione. Nell'ambito di questa attività di ricerca è stata condotta un'analisi delle banche dati disponibili in Italia, in Europa e nei paesi non europei riguardanti i livelli di concentrazione di quelle sostanze antiossidanti naturalmente presenti negli alimenti d'interesse degli altri tre sotto-progetti MIPAF. Nell'ambito di una indagine alimentare condotta nel 2000-01 su un campione di adolescenti residenti nella provincia di Roma (INRAN-RM-2001) sono state raccolte tutte le informazioni necessarie per una codifica ad hoc degli alimenti fortificati e dei supplementi. Sono stati quindi effettuati tentativi di stima della loro assunzione e delle loro principali fonti tra gli adolescenti.

Parole chiave:
Antiossidanti, dieta mediterranea, vegetali, cereali, latte e derivati, olio d'oliva, biodisponibilità, efficacia antiossidante, effetto tempo conservazione, additivi, sorveglianza, livelli di assunzione, salute.

Partecipanti alla ricerca	**mesi/persona**	**Qualifica**
L.Pizzoferrato	2	P.RIC
P.Manzi	2	RIC
V.Vivanti	2	OT
S.Marconi	4	RIC-C
M. Carcea	2	TEC
L. Bruschi	1	RIC-C
R. Francisci	1	RIC-C
E.Schiavoni	9	AR
G. Bassotti	1	CTER
L. Bartoli	0,5	OP
G. Maiani	1	P.RIC
A. Schirinzi	2	CO
E. Azzini	2	CTER
G. Catasta	1	CTER
A. Raguzzini	1	CTER
L. Palomba	1	CO
C. Leclercq	1	RIC
D. Arcella	1	RIC-C
R. Piccinelli	4	CTER-C
C. Boccali	2	CO
C. Le Donne	2	CO

Collaborazioni esterne

Istituzioni	*Nomi*	*Qualifica*
Università del Molise, CB	G.Panfili	ASS
Università del Molise, CB	E.Marconi	ASS