

**Graduate School in Biochemical, Nutritional
and Metabolic Sciences**



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Facoltà di Agraria

**MESSA A PUNTO E VALIDAZIONE DI UN METODO PER LA
DETERMINAZIONE DELL'ACIDO SALICILICO E DELL'ACIDO
FERULICO NELL'UOMO, E STUDIO DELL'INFLUENZA DEL
PATTERN DI MEDITERRANEITÀ DELLA DIETA SULLE
CONCENTRAZIONI EMATICHE DI QUESTE DUE MOLECOLE.**

Dott. Samuele Rinelli

2010/2011

1	INTRODUZIONE	4
1.1	LE MALATTIE CRONICO-DEGENERATIVE.....	8
1.2	SINDROME METABOLICA E OBESITÀ.....	12
1.2.1	FISIOPATOLOGIA	17
1.2.2	INFIAMMAZIONE E SINDROME METABOLICA	21
1.3	IL CONSUMO DI FRUTTA E VERDURA NELLA PREVENZIONE DELLE MALATTIE CRONICO-DEGENERATIVE.....	26
1.4	I COMPOSTI FENOLICI	32
1.5	L'ACIDO FERULICO.....	34
1.6	L'ACIDO SALICILICO	36
1.6.1	IL RUOLO DELL'ACIDO SALICILICO NELLE PIANTE.....	37
1.6.1.1	EFFETTO DELL'ACIDO SALICILICO SULLA PRODUTTIVITÀ.....	40
1.6.1.2	ACIDO SALICILICO E RESISTENZA LOCALE AI PATOGENI.	41
1.6.2	L'ACIDO SALICILICO NEGLI ALIMENTI.....	42
1.6.3	L'ACIDO SALICILICO NELL'UOMO	46
1.6.3.1	EFFETTO ANTINFIAMMATORIO DELL'ASPIRINA	48
1.6.3.2	EFFETTO ANTITROMBOTICO	49
1.7	BIBLIOGRAFIA	51
2	OBIETTIVO DELLA TESI	59
3	MATERIALI E METODI	61
3.1	MESSA A PUNTO E VALIDAZIONE DELLA METODICA ANALITICA	61
3.1.1	PREPARAZIONE DELLE ALIQUOTE DI SIERO	62
3.1.2	PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI STANDARD.....	62
3.1.3	PREPARAZIONE DEI CAMPIONI E INIEZIONE DELL'ESTRATTO IN GC- MS	63
3.2	EFFETTO DI UN PASTO A BASE DI FRUTTA SULLE CONCENTRAZIONI EMATICHE DEGLI ACIDI SALICILICO E FERULICO E SULLE RISPOSTE METABOLICHE E INFIAMMATORIE IN SOGGETTI SANI.....	66
3.2.1	SOGGETTI.....	66
3.2.2	DISEGNO SPERIMENTALE.....	67

3.2.3	VALUTAZIONE DELLO STATO DI NUTRIZIONE.....	68
3.2.3.1	VALUTAZIONE DELLA COMPOSIZIONE CORPOREA.....	68
3.2.4	ANALISI DEL FRUTTO.....	72
3.2.4.1	UMIDITÀ	72
3.2.4.2	CENERI	72
3.2.4.3	PROTEINE TOTALI	73
3.2.4.4	DETERMINAZIONE DEGLI ZUCCHERI SOLUBILI.....	73
3.2.4.5	FIBRA TOTALE, SOLUBILE ED INSOLUBILE.....	74
3.2.4.6	POLIFENOLI TOTALI	76
3.2.4.7	CATECHINE TOTALI	79
3.2.4.8	QUANTIFICAZIONE DELL'ACIDO SALICILICO	80
3.2.5	ESAMI EMATOCHIMICI.....	83
3.2.5.1	ACIDI GRASSI NON ESTERIFICATI.....	84
3.2.5.2	DETERMINAZIONE DELLA LEPTINA.....	86
3.2.5.3	DOSAGGIO DELL'ACIDO SALICILICO E DELL'ACIDO FERULICO .	89
3.2.5.4	DOSAGGIO DELL'INTERLEUCHINA 6.....	89
3.2.5.5	DOSAGGIO DELLA PROTEINA C REATTIVA.....	89
3.3	RELAZIONE TRA LIVELLO DI MEDITERRANEITÀ DELLA DIETA E CONCENTRAZIONI DI ACIDO SALICILICO E FERULICO CIRCOLANTI IN SOGGETTI SOVRAPPESO E OBESI	90
3.3.1	SOGGETTI E DISEGNO SPERIMENTALE	90
3.3.2	VALUTAZIONE DELLA COMPOSIZIONE CORPOREA	91
3.3.3	ESAMI EMATOCHIMICI.....	92
3.3.3.1	DOSAGGIO DELL'ACIDO SALICILICO E DELL'ACIDO FERULICO .	92
3.3.3.2	DOSAGGIO DELLA VITAMINA C PLASMATICA	92
3.3.4	VALUTAZIONE DELLA MEDITERRANEITÀ DELLA DIETA	93
3.4	ANALISI STATISTICA.....	95
3.5	BIBLIOGRAFIA	96
4	RISULTATI.....	97
4.1	MESSA A PUNTO E VALIDAZIONE DELLA METODICA ANALITICA	97
4.1.1	ANALISI IN GC-MS: CONDIZIONI SPERIMENTALI	97

4.1.2	LIMITI DI RIVELABILITÀ E DI QUANTIFICAZIONE	101
4.1.3	RANGE DINAMICO LINEARE	102
4.1.4	ACCURATEZZA E PRECISIONE	104
4.2	EFFETTO DI UN PASTO A BASE DI FRUTTA SULLE CONCENTRAZIONI EMATICHE DEGLI ACIDI SALICILICO E FERULICO E SULLE RISPOSTE METABOLICHE E INFIAMMATORIE IN SOGGETTI SANI.....	107
4.2.1	CARATTERIZZAZIONE NUTRIZIONALE DELLE PESCHE	107
4.2.2	STATO DI NUTRIZIONE E COMPOSIZIONE CORPOREA.....	109
4.2.3	RISPOSTA METABOLICA E INFIAMMATORIA POST-PRANDIALE.....	110
4.2.4	VARIAZIONI DELLA CONCENTRAZIONE DI ACIDO SALICILICO E ACIDO FERULICO	112
4.2.5	RELAZIONE TRA LIVELLO DI MEDITERRANEITÀ DELLA DIETA E CONCENTRAZIONI DI ACIDO SALICILICO E FERULICO CIRCOLANTI IN SOGGETTI SOVRAPPESO E OBESI	116
4.2.6	ANALISI DEL MEDITERRANEAN SCORE	116
4.2.7	STATO NUTRIZIONALE E DI SALUTE DEI SOGGETTI	117
4.2.8	RELAZIONE TRA MEDITERRANEITÀ DELLA DIETA, STATO NUTRIZIONALE E CONCENTRAZIONI PLASMATICHE DI SA, FA E VITC	122
4.2.9	RELAZIONI TRA CONCENTRAZIONI PLASMATICHE DI SA, FA, VIT C E STATO NUTRIZIONALE.....	129
5	CONCLUSIONI	135
5.1	BIBLIOGRAFIA	142
6	ALLEGATI.....	144
6.1	ALLEGATO 1: QUESTIONARIO DI MEDITERRANEITÀ DELLA DIETA	144
6.2	ALLEGATO 2	147
6.3	ALLEGATO 3: ABSTRACTS OF A RESEARCH ARTICLE SUBMITTED TO PLANT FOODS FOR HUMAN NUTRITION.....	152
6.4	ALLEGATO 4: ABSTRACTS OF A RESEARCH ARTICLE SUBMITTED TO BRITISH JOURNAL OF NUTRITION.....	154

1 INTRODUZIONE

Nell'ultimo secolo, una radicale trasformazione ha modificato la dieta e la salute di milioni di persone in tutto il mondo. La maggior disponibilità di alimenti e i progressi nelle scienze alimentari, oltre ad opportunità di miglioramento e benessere, si sono rivelati anche cause di abitudini alimentari squilibrate.

L'industrializzazione e l'inurbamento hanno portato a un cambiamento dell'attività lavorativa, che da agricola è divenuta più sedentaria, e con la globalizzazione è nata anche la dieta occidentale. Queste trasformazioni sociali hanno fatto sì, che per la prima volta nella storia dell'uomo, l'attività fisica fosse limitata e che l'assunzione di alimenti andasse oltre il semplice sostentamento [1]. Questo cambiamento, noto come “transizione nutrizionale”, è caratterizzato da un modello di dieta ad alto contenuto di grassi, di zuccheri, di cibi raffinati e ed è accompagnato da scarso consumo di fibre e da inattività fisica (Figura 1.1).

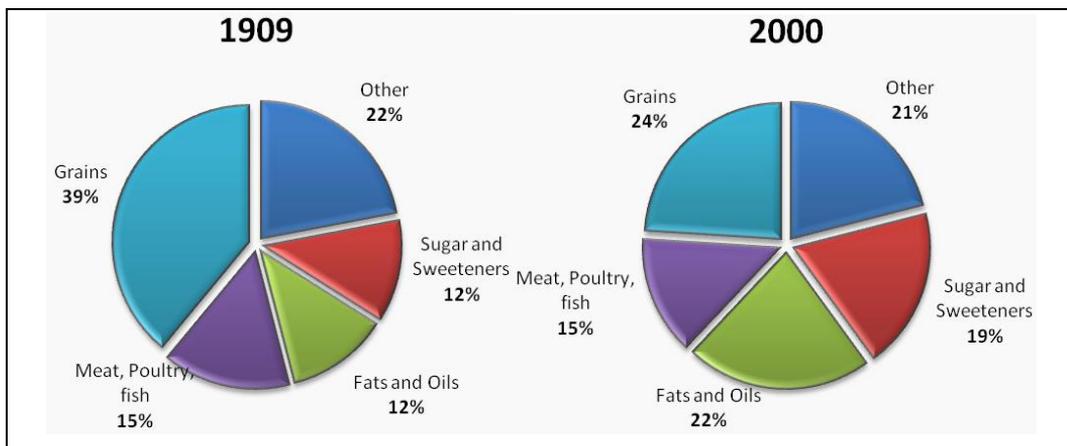


Figura 1.1 Confronto della composizione della dieta negli USA nel 1909 e nel 2000 (USDA Centre for Nutrition Policy and Promotion, 2004).

Nel frattempo, si è assistito a una rivoluzione demografica caratterizzata da un aumento della popolazione mondiale, ma soprattutto dall'allungamento della vita media e dalla riduzione della mortalità prenatale, conseguenze dell'aumento del reddito e del miglioramento delle condizioni socio-sanitarie.

Se da un lato quest'evoluzione ha permesso di ridurre l'incidenza di malattie infettive o di carenze nutrizionali, dall'altro, l'inadeguatezza della dieta e il ridotto dispendio energetico hanno avuto risvolti negativi sullo stato di salute. Infatti, il cambiamento demografico che ha interessato il XX secolo, è associato, nei Paesi più sviluppati, alla cosiddetta "transizione epidemiologica", cambiamento che ha determinato passaggio da un modello ad alta prevalenza di malattie infettive, associate alla malnutrizione e alle misure sanitarie inadeguate, a uno scenario in cui le cause principali di morte sono le malattie cronic-degenerative, risultato degli stili di vita urbano-industriali (Figura 1.2). Con caratteristiche simili, il processo si sta ripetendo in tutti quei Paesi che stanno, più o meno lentamente, incrementando il proprio sviluppo socio-economico [2]. Tuttavia, vi sono ancora alcune regioni, come ad esempio l'Africa subsahariana, dove le malattie infettive rimangono la prima causa di morte.

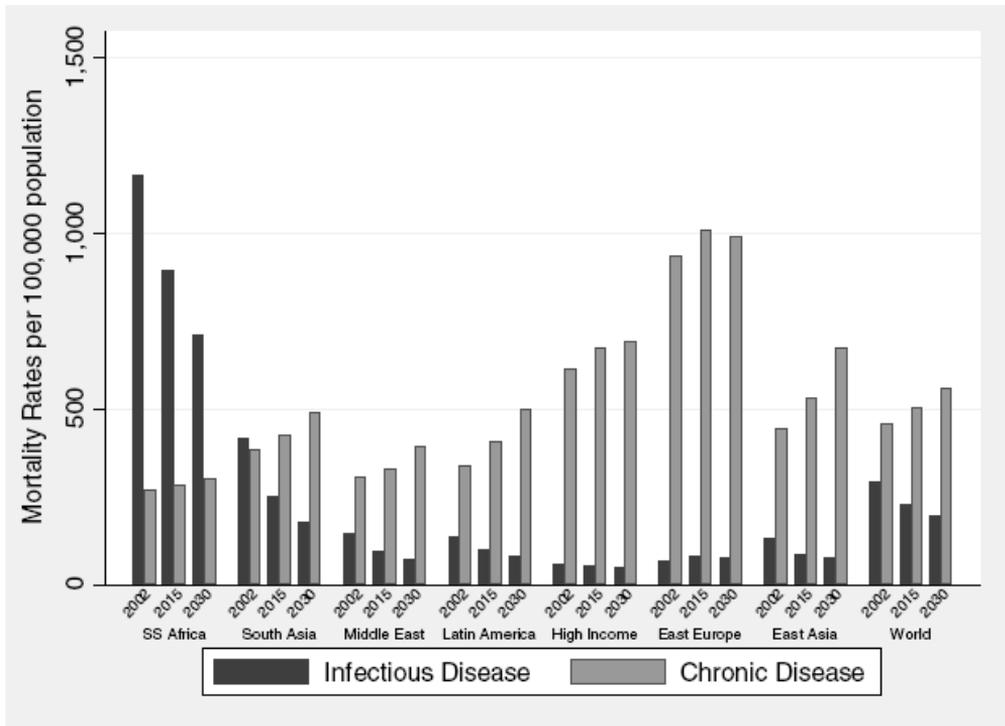


Figura 1.2 Evoluzione dei tassi di mortalità dal 2002 al 2030 (WHO, 2005)[3].

Gran parte della permanenza dell'uomo sulla terra è stata caratterizzata dalla scarsità di cibo, così durante l'evoluzione sono stati selezionati quei geni che permettono di sopravvivere in condizioni di scarso apporto alimentare, piuttosto che quelli che consentono di "gestire il sovra consumo di cibo". Per questo, il rapido cambiamento che è avvenuto nelle società industrializzate, caratterizzato da uno squilibrio tra intake calorico e dispendio energetico, ha portato a un aumento dei depositi di energia sotto forma di grasso corporeo, causa principale dell'epidemia di obesità che oggi colpisce trasversalmente bambini, giovani e adulti in tutto il mondo (Figura 1.3).

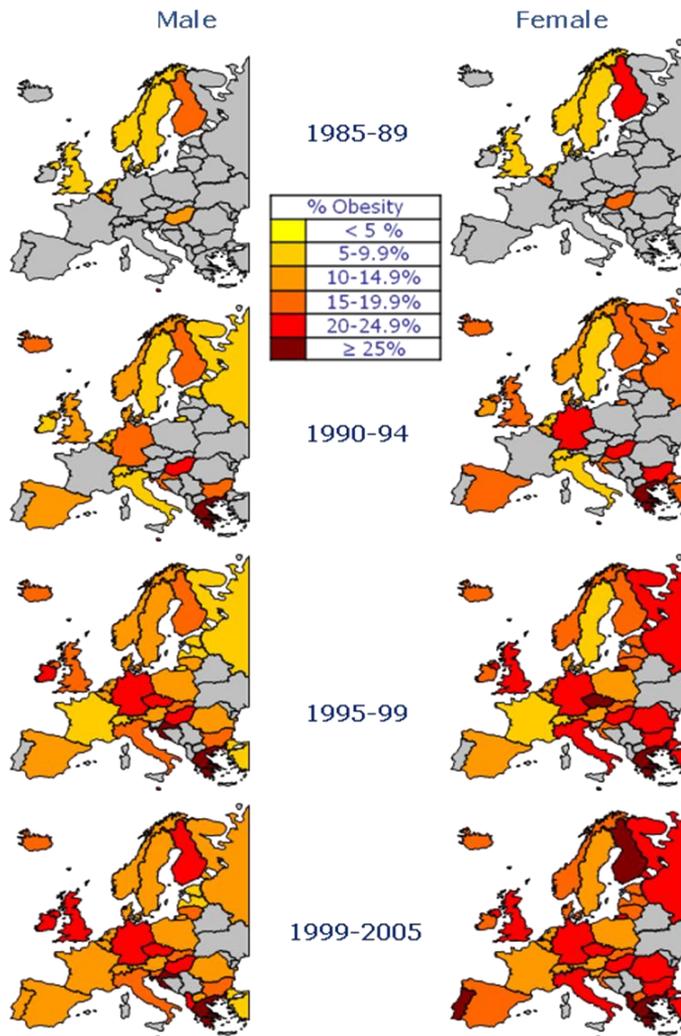


Figura 1.3 Aumento del tasso di obesità in Europa dal 1985 al 2005 (International Obesity Task Force, 2007).

1.1 Le malattie cronico-degenerative

Le malattie cronico-degenerative costituiscono un gruppo eterogeneo di patologie a eziologia multifattoriale. Sono caratterizzate da patogenesi su base degenerativa e da evoluzione cronica e progressiva. Sono anche definite malattie non trasmissibili (non communicable diseases, NCD) e sono correlate ad alterazioni del sistema immunitario, ad accentuazione della risposta infiammatoria e/o a processi infettivi [3]. Sono considerate tali le malattie cardiocircolatorie (CVD), le neoplasie, il diabete di tipo 2, le broncopneumopatie cronico-ostruttive (COPD), l'osteoporosi, le malattie del sistema nervoso come l'Alzheimer's ed il Parkinson, ecc...

Nel loro insieme, le malattie cronico-degenerative rappresentano la prima causa di morte a livello mondiale e la loro incidenza, in età lavorativa, è più alta nei paesi poveri [4]. In una recente relazione l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha stimato che nel 2005 circa 36 milioni di persone sono morte a causa delle NCD (Figura 1.4) e l'80% di questi decessi si è verificato nei Paesi in via di sviluppo. Circa un quarto, quasi 8,5 milioni di persone - superiore al numero di decessi per HIV/AIDS, tubercolosi e malaria combinati tra loro - sono morte prima del loro sessantesimo compleanno [4].

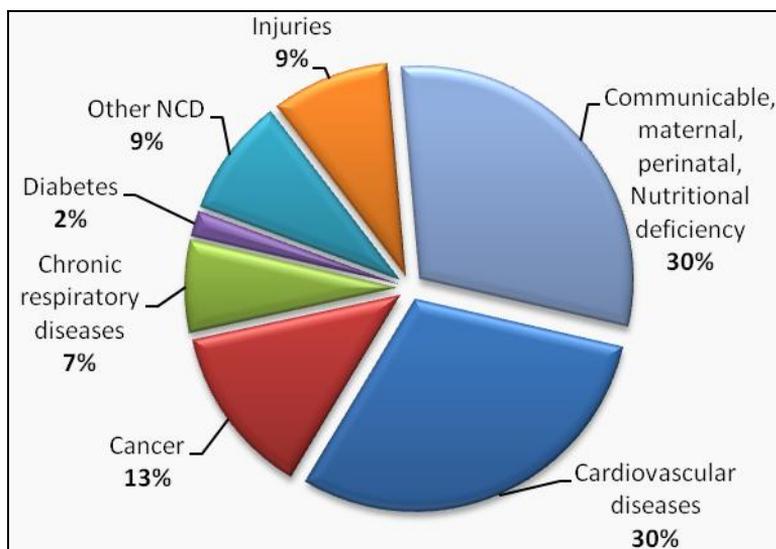


Figura 1.4 Cause di morte nel mondo nel 2005 (WHO, 2005).

Le principali cause di morte per NCD sono attribuite alle malattie cardiovascolari (30% del totale la mortalità globale), alle neoplasie (13%), alle malattie respiratorie croniche (7%) e al diabete mellito (2%) [5, 6], che insieme rappresentano circa il 60% della mortalità globale.

Secondo l'Oxford Health Alliance, il fumo, una dieta malsana e la mancanza di attività fisica sono i tre principali fattori di rischio per queste patologie. Nei paesi in via di sviluppo questi fattori tendono a concentrarsi nelle zone urbane e la loro prevalenza è in aumento a causa della rapida urbanizzazione e della crescente globalizzazione del cibo, del tabacco e degli alcolici [9]. Per esempio il rischio relativo di sviluppare il tumore al polmone è determinato dal numero di sigarette fumate (Figura 1.5).

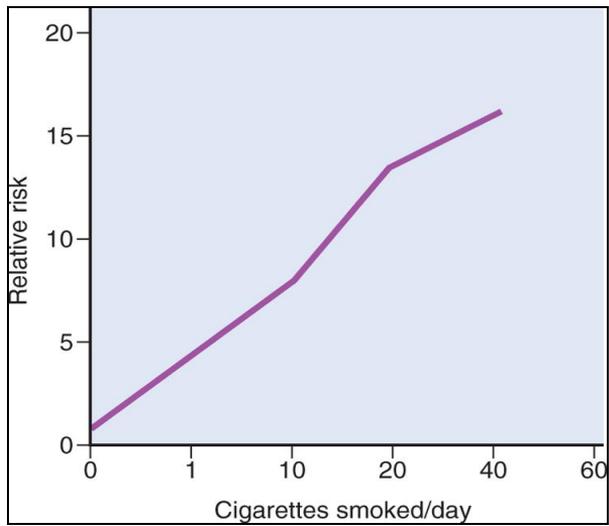


Figura 1.5 Rischio di tumore al polmone vs numero di sigarette fumate (IARC, 2003).

Inoltre, la presenza di più fattori di rischio ha un effetto moltiplicativo sul rischio di sviluppare malattie cronico-degenerative. Come si evince dal World Cancer Report del 2003, ad esempio, fumare più di 26 sigarette e consumare anche più di 120 g di alcol quotidianamente, aumenta il rischio di tumore alla laringe di circa il 45% (Figura 1.6).

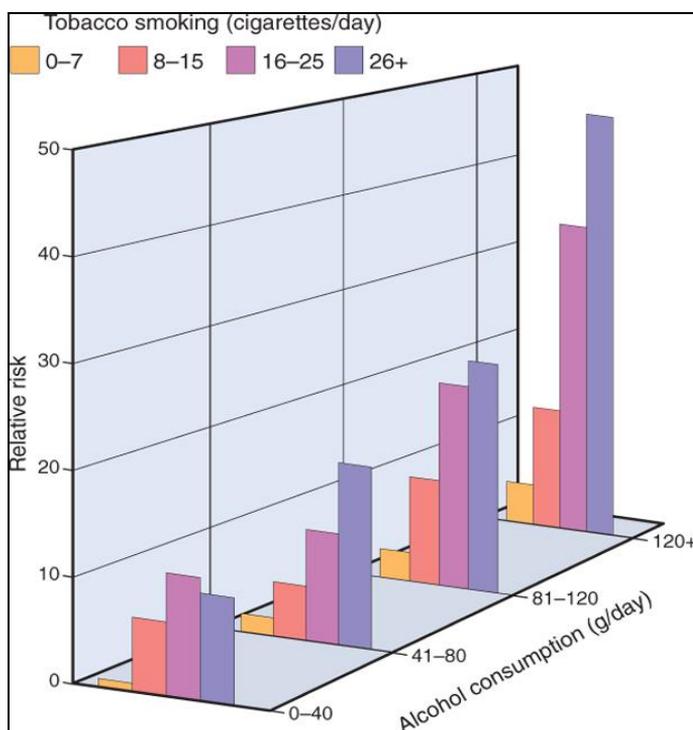


Figura 1.6 Aumento moltiplicativo del rischio di tumore alla laringe (IARC, 2003).

Il rischio di sviluppare una malattia cronico-degenerativa in età adulta è determinato da fattori genetici, ambientali, dalla vita intrauterina, dallo stato di nutrizione della gestante e dal peso alla nascita [7,8]. Alcune caratteristiche non modificabili degli individui come l'età, il sesso, la storia familiare, possono predisporre a queste patologie. Infatti, evidenze mediche mostrano come una storia familiare positiva predisponga sia per la malattia coronarica sia per il diabete [9-10], e questo fattore può essere utile nello screening già in età infantile.

Inoltre, le NCD possono portare ad uno sviluppo progressivo di complicanze, cause di disabilità soprattutto nella terza età. Ad esempio il diabete, che provoca la retinopatia diabetica, rappresenta la prima causa di riduzione significativa della vista nei paesi occidentali.

Sempre nel 2005, l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha stimato che a livello globale ci sono 1 miliardo di adulti in sovrappeso, 300 milioni dei quali sono obesi. Dal 1980, i

tassi di obesità sono aumentati più di tre volte in alcune aree del Nord America, nel Regno Unito, nell'Europa orientale, in Medio Oriente, in Australia e in Cina. Molto preoccupanti sono le patologie associate, tra le quali quelle cronico-degenerative. Mortalità e morbilità differiscono, però, in funzione della distribuzione del grasso corporeo: all'obesità centrale è associato il rischio più elevato per il cancro, il diabete mellito di tipo 2, le malattie cardiovascolari, l'ipertensione e la dislipidemia.

1.2 Sindrome metabolica e obesità

Nel 1988 Reaven [11] riconobbe il ruolo centrale dell'insulino-resistenza nell'eziologia del diabete mellito di tipo 2, nell'ipertensione e nella malattia coronarica. Il concetto di insulino-resistenza e delle anomalie metaboliche associate, che aumentavano il rischio di malattie cardiovascolari, è diventato noto come sindrome X prima, e sindrome metabolica (SM) in seguito.

Oggi, la sindrome metabolica è una questione di grande interesse pubblico ai fini della prevenzione dell'aterosclerosi. Negli Stati Uniti, più del 50% degli anziani sono affetti da questa sindrome e la sua incidenza continua ad aumentare come risultato del dilagare dell'obesità.

Oltre all'insulino-resistenza, evidenze cliniche associano alla SM anche l'intolleranza al glucosio o il diabete mellito di tipo 2, la dislipidemia, la steatosi epatica non-alcolica, l'ipertensione arteriosa e la disfunzione endoteliale. Di recente anche markers di infiammazione e di accelerata/alterata emostasi e fibrinolisi sono stati aggiunti all'elenco (Figura 1.7) [12].

- Glucose intolerance
 - impaired fasting glucose
 - impaired glucose tolerance
 - type 2 diabetes mellitus
- Dyslipidemia
 - ↑ triglycerides
 - ↓ HDL-C
 - Small, dense LDL particles
 - ↑ postprandial lipemia
- Hemodynamic
 - ↑ sympathetic nervous system activity
 - ↑ renal sodium retention
 - ↑ blood pressure
- Microalbuminuria
- Hyperuricemia and gout
- ↑ oxidative stress
- ↑ renin-angiotensin-aldosterone system activity
- Chronic, low-grade inflammation
 - ↑ CRP
- Prothrombotic state
 - ↑ PAI-1
 - ↑ fibrinogen
 - ↑ von Willebrand factor levels
- Endothelial dysfunction
 - ↑ mononuclear cell adhesion
 - ↓ endothelium-dependent vasodilatation
- Polycystic ovary syndrome
- Non-alcoholic fatty liver disease
- Poor cardiorespiratory fitness

CRP, C-reactive protein; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1.

Figura 1.7 Alterazioni cliniche associate alla sindrome metabolica.

Negli anni diverse istituzioni hanno proposto definizioni e criteri per diagnosticare la sindrome metabolica. Ad oggi le due definizioni più utilizzate provengono dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) e dall'US National Cholesterol Education Program (NCEP).

Secondo i criteri definiti dall'OMS del 1999 [13], deve essere presente un disturbo del metabolismo del glucosio/insulina quale il diabete di tipo 2 o l'intolleranza al glucosio. La diagnosi, inoltre, richiede almeno due dei seguenti elementi: l'ipertensione, trattata con farmaci

o $\geq 140/90$ mm Hg, la dislipidemia, con elevati trigliceridi plasmatici (≥ 1.7 mmol/L o ≥ 150 mg/dL) e/o basse HDL (< 0.9 mmol/L o < 35 mg/dL negli uomini e < 1.0 mmol/L o < 39 mg/dL nelle donne), l'obesità, con indice di massa corporea (BMI) > 30 kg/m² o centrale (rapporto circonferenza vita-fianchi > 0.90 cm negli uomini o > 0.85 cm nelle donne) e l'escrezione urinaria di albumina ≥ 20 μ g/min o di albumina creatinina rapporto ≥ 30 mg/g). I criteri elaborati dal Terzo rapporto dell'US National Cholesterol Education Program (NCEP-ATP III) [14] richiedono almeno tre dei seguenti fattori: circonferenza vita ≥ 102 cm negli uomini e ≥ 88 cm nelle donne, i trigliceridi plasmatici ≥ 150 mg/dL, colesterolo HDL < 40 mg/dL negli uomini o < 50 mg/dL in donne, la pressione arteriosa $\geq 130/85$ mm Hg. In particolare, la diagnosi secondo la NCEP non include una misura dell'insulina resistenza, ma si basa su una misurazione dei livelli plasmatici di glucosio a digiuno superiori 110 mg/dL. Secondo il NCEP, la sindrome metabolica è un precursore - e non comprende- il diabete di tipo 2.

L'International Diabetes Federation (IDF), invece, ha dato particolare risalto al ruolo dell'obesità centrale come elemento fortemente caratterizzante la SM, e che condiziona e/o induce sia le alterazioni metaboliche sia l'ipertensione arteriosa (Figura 1.8) [15].

	 OMS (1999)	ATP-III (2001)	 IDF (2005)
Glucosio	Diabete mellito o alterata tolleranza al glucosio	Glicemia a digiuno >110 mg/dl	>100 mg/dl o precedente diagnosi di diabete mellito
Iperensione	≥140/90 mmHg o assunzione di anti-ipertensivi	>130/85 mmHg o assunzione di anti-ipertensivi	>130/85 mmHg o assunzione di anti-ipertensivi
Ipertrigliceridemia	≥150 mg/dl	≥150 mg/dl	≥150 mg/dl
HDL colesterolo	<35 mg/dli nei maschi e <39 mg/dl nelle donne	<40 mg/dl nei maschi e <50 mg/dl nelle donne	<40 mg/dl nei maschi e <50 mg/dl nelle donne
Obesità centrale	Rapporto vita-fianchi >0,9 nei maschi >0,85 nelle donne e/o BMI >30	Circonferenza vita ≥102 cm nei maschi e ≥88 cm nelle donne	Circonferenza vita >94 cm nei maschi e 80 cm nelle donne di razza europea (valori specifici in base all'etnia per gli altri gruppi)
Microalbuminuria	Escrezione urinaria di albumina ≥20 µg/min o rapporto albumina/creatinina ≥30 mg/g		
Criteri per la diagnosi	Diabete di tipo 2 o IGT, più due qualsiasi degli altri criteri sopra citati	Tre o più di qualsiasi dei criteri sopra citati	Obesità centro-addominale più due qualsiasi degli altri criteri sopra citati

Figura 1.8 Definizioni e criteri per la diagnosi di Sindrome metabolica.

La prevalenza della sindrome metabolica è influenzata da diversi fattori modificabili e non modificabili, interconnessi tra loro:

- **Età:** Nel Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III), eseguito negli Stati Uniti utilizzando i criteri ATP-III, l'incidenza della SM è aumentata dal 6,7 % nei partecipanti tra i 20 e 29 anni di età, del 43,5 % tra i 60 e 69 anni e del 42 % nei soggetti con età ≥ 70 anni. Dal Family Heart Study emerge che la percentuale di individui affetti da SM dai 50-55 anni in poi è di quasi 2-3 volte superiore rispetto a quella presente nel gruppo di individui più giovani. Alla luce di queste evidenze, si può ipotizzare che durante la vita si accumulino fattori di rischio come l'ipernutrizione, la sedentarietà e altri fisiologici e ambientali, che possono influire l'espressione genica predisponendo per la sindrome metabolica in età più avanzata. Nell'infanzia e nell'adolescenza i dati sono più limitati. In uno studio condotto negli USA (ATP-III), i ricercatori hanno preso in esame

439 bambini e adolescenti tra i 4 e i 20 anni. Di questi, 244 erano moderatamente obesi e 195 gravemente obesi. La sindrome metabolica è stata riscontrata nella metà dei bambini gravemente obesi e nel 39% di quelli moderatamente obesi. In due anni, otto dei 34 bambini con la sindrome metabolica hanno sviluppato il diabete di tipo 2. Due anni dopo la prima fase dello studio, 77 partecipanti sono stati rimessi sotto esame e 24 ragazzi su 34 avevano ancora la sindrome metabolica ed otto di loro avevano sviluppato il diabete di tipo 2. Hanno sviluppato la sindrome 16 dei 43 bambini che inizialmente ne erano indenni [16].

- **Sesso e obesità:** L'obesità è un fattore importante nella patogenesi della sindrome metabolica e l'associazione tra obesità centrale/generalizzata e SM varia con il sesso [17]. Lo studio NHANES III ha dimostrato che la prevalenza della sindrome metabolica è aumentata da 0.9 al 3.0 % nelle persone con un BMI tra 18.5 e 20.9 kg/m², da 9.6 a 22.5 % per le persone con un BMI tra 25.0 e 26.9 kg/m², a seconda del sesso e dell'etnia [18]. In Europa, in soggetti non diabetici, la prevalenza della SM è generalmente più elevata negli uomini rispetto che nelle donne [19]. Solo in quelle popolazioni in cui l'obesità è più diffusa nelle donne, la prevalenza è più elevata nel sesso femminile. Questo modello può essere osservato in paesi come l'India, l'Iran e la Turchia [20-24]. Dati di adolescenti tra i 12 e i 19 anni che hanno partecipato allo studio NHANES III hanno mostrato che la prevalenza della sindrome metabolica (utilizzando ATP-III criteri modificati per età) variava tra lo 0,1 %, per chi aveva un BMI al di sotto del 85° percentile e fino al 29 % per coloro che avevano un BMI al di sopra del 95° percentile [25].
- **Etnia:** Alcuni gruppi etnici hanno una maggiore predisposizione all'obesità centrale rispetto ad altri. La presenza di questa condizione è più elevata tra le popolazioni dell'Asia del Sud piuttosto che negli europei e negli afro-caraibici. In uno studio epidemiologico condotto in Inghilterra, è emerso che nelle popolazioni dell'Asia del Sud vi è la più alta prevalenza di sindrome metabolica (29% negli uomini e 32% nelle donne) mentre la più bassa è tra le donne europee (14%) [26]. Un altro studio condotto su 11 coorti europee ha mostrato una prevalenza del 15,7% negli uomini e 14,2 % nelle donne [19]. Dati differenti sono stati recentemente osservati tra 2100 adulti italiani con una prevalenza del 18% nelle donne e il 15% negli uomini [27].

- **Attività fisica e dieta:** I principali effetti della dieta e dell'attività fisica sulla sindrome metabolica sono dovuti all'azione sulla distribuzione del grasso, sull'obesità e sull'insulino-resistenza. Nel Framingham Offspring Study, l'assunzione di alimenti integrali (principalmente cereali) è stata associata negativamente alla SM, al contrario dell'indice glicemico in cui è emersa un'associazione positiva [28]. Per quanto riguarda l'attività fisica, lo studio Whitehall II, condotto in Gran Bretagna su 5153 funzionari, ha rilevato che una moderata e vigorosa attività fisica nel tempo libero è associata a una bassa prevalenza di sindrome metabolica [29]. Dieta e attività fisica, pur giocando ruolo fondamentale nell'eziologia della SM, sono anche i soli fattori modificabili su cui si può agire nella prevenzione primaria e nella cura di questa malattia. Una dieta equilibrata che contempli almeno 5 porzioni di frutta e verdura e 30 minuti al giorno di attività fisica è stato dimostrato che possono ridurre il rischio di diabete anche del 65% (vedi paragrafo 1.3).

1.2.1 Fisiopatologia

L'insulino-resistenza, ovvero la ridotta risposta da parte dei tessuti periferici all'azione biologica dell'insulina, è il fattore principale nell'eziologia della sindrome metabolica. Questa condizione predispone all'iperglicemia, all'iperinsulinemia compensatoria e a squilibri metabolici importanti, tre meccanismi patologici che caratterizzano la SM e che sono legati tra loro da una sorta di circolo vizioso. Il meccanismo più importante è l'iperinsulinemia compensatoria. In condizioni fisiologiche, il mantenimento dell'omeostasi post-prandiale del glucosio richiede che le β -cellule pancreatiche secernano più insulina in risposta all'iperglicemia e la conseguente iperinsulinemia stimola l'uptake di glucosio dal muscolo, tessuto responsabile dello smaltimento dell'80-90% del glucosio ingerito, e della soppressione della gluconeogenesi che avviene per l'80% nel parte del fegato.

Un individuo obeso, può presentare una tolleranza al glucosio normale, alterata o essere affetto da diabete mellito di tipo 2. I fattori che determinano il grado di intolleranza al glucosio sono la sensibilità all'insulina e la capacità di riserva delle β -cellule pancreatiche. Negli individui insulino-resistenti, le β -cellule secernono più insulina del normale per

mantenere l'euglicemia e un'iperfunzionalità protratta le può indebolire riducendone l'attività. In questa condizione la glicemia comincia a salire e si manifesta inizialmente un'intolleranza al glucosio che può evolvere nel diabete di tipo 2.

Oltre a stimolare l'uptake di glucosio nelle cellule periferiche, l'insulina inibisce nel tessuto adiposo la lipolisi e il rilascio di acidi grassi nel sangue. Una prima manifestazione dell'insulino-resistenza è l'incapacità di sopprimere la lipolisi nel tessuto adiposo. I FFA sono quindi trasportati al fegato e ai muscoli, dove stimolano la gluconeogenesi epatica e inibiscono l'assorbimento di glucosio, peggiorando l'iperglicemia.

Alcuni ricercatori considerano l'insulino-resistenza non la causa principale della sindrome metabolica, ma solo un fattore di mediazione [12]. Questi ritengono che il problema fondamentale siano le disfunzioni dei depositi di energia. In questa teoria, l'insulino-resistenza sorge a seguito di anomalie nella trasformazione e deposito degli acidi grassi e dei trigliceridi nel tessuto adiposo periferico. Nella maggior parte dei casi, la chiave dell'anomalia sarebbe semplicemente la presenza, in eccesso, di depositi di grasso corporeo, condizione che talvolta evolve nell'obesità.

Nell'organismo lo scopo del tessuto adiposo è quello di stoccare le calorie derivanti dai pasti sotto forma di trigliceridi e di rilasciare acidi grassi non esterificati, quando i tessuti richiedono energia.

Se vi è un eccesso calorico prolungato nel tempo associato a scarsa attività fisica, si supera la capacità di deposito degli adipociti, i quali non saranno più in grado di immagazzinare i trigliceridi. Così, l'energia in eccesso è depositata sempre come trigliceridi negli epatociti, nei miociti scheletrici e negli adipociti viscerali, determinando insulino-resistenza in questi tessuti. In questo modello denominato "overflow hypothesis" l'obesità viscerale è ben correlata con l'insulino-resistenza [30].

La dislipidemia è un altro degli aspetti che contrassegna la sindrome metabolica ed è caratterizzata da elevata ipertrigliceridemia (alte VLDL), HDL basse e LDL di piccola dimensione e dense. Questa triade è stata denominata "atherogenic lipoprotein phenotype" [31]. Il meccanismo di collegamento tra insulino-resistenza e dislipidemia è mostrato in Figura 1.6.

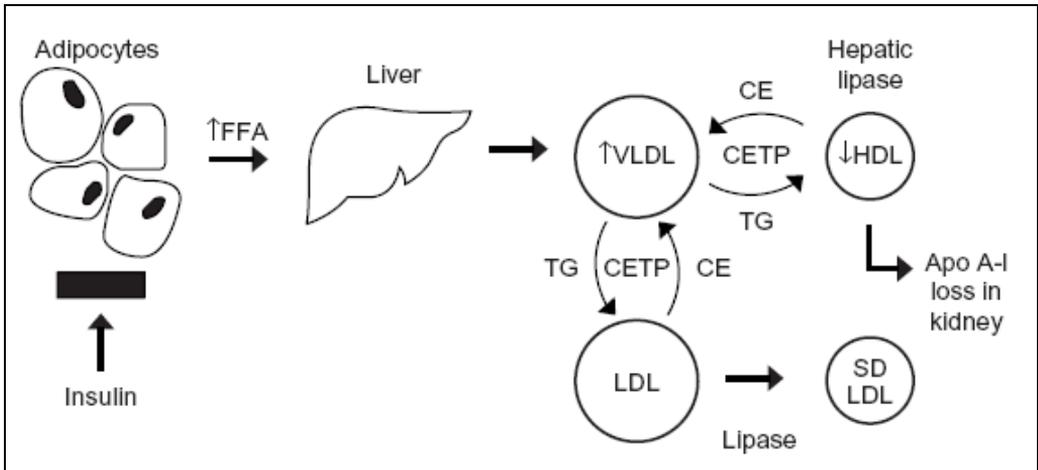


Figura 1.9 Insulino-resistenza e dislipidemia.

Normalmente, gli acidi grassi liberi (FFA) rilasciati nel sangue portale dal tessuto adiposo giungono al fegato e ai muscoli. In presenza di insulino-resistenza, la lipolisi nel tessuto adiposo è accelerata e quantità maggiori di FFA sono trasportate al fegato ed ai muscoli. A causa dell'inefficiente ossidazione o dell'eccesso di FFA che giungono ai muscoli, i trigliceridi possono accumularsi nelle fibre muscolari. Nel fegato solo una minima quantità è ossidata, mentre la maggior parte è riesterificata a formare trigliceridi. Questi sono rilasciati nel sangue nelle VLDL che giungono ai tessuti periferici dove sono idrolizzati dalla lipoproteinalipasi (LPL) a formare FFA. Le particelle rimanenti sono ulteriormente metabolizzate dalla lipasi epatica a formare LDL. Nei soggetti con la sindrome metabolica vi è una scarsa attivazione della LPL con conseguente accumulo di VLDL nel circuito ematico. Queste lipoproteine scambiano i trigliceridi con il colesterolo esterificato contenuto nelle HDL e nelle LDL, grazie all'azione della CEPT (proteina di trasferimento degli esteri del colesterolo). La maggior parte del colesterolo esterificato acquisito dalle VLDL ritorna al fegato dopo che i trigliceridi sono stati idrolizzati dalla lipoproteina lipasi. Questo processo catalizzato dalla CEPT, fa parte del trasporto inverso del colesterolo, considerato positivo per l'organismo.

Ma l'azione della CEPT ha anche sviluppi negativi sul processo aterogenico. Quando le LDL e le HDL acquisiscono i trigliceridi sono soggette a lipolisi da parte della lipasi epatica. Le HDL sono metabolizzate più rapidamente e questo determina una riduzione a livello

plasmatico del “colesterolo buono” e della apolipoproteina A-I (apoA-I) che hanno attività antiaterogena. Le LDL diventano più piccole e dense (SD-LDL) e, legandosi ai proteoglicani della parete arteriosa, sono in grado di penetrare attraverso l'intima, diminuendo la capacità antiossidante dell'endotelio e favorendo il reclutamento dei macrofagi. La presenza di queste lipoproteine di dimensioni inferiori determina, a parità di peso, una maggiore concentrazione di apoB circolante, che ha attività aterogena. Così gli FFA e i trigliceridi sono costantemente trasportati tra il fegato e il tessuto adiposo. In condizioni di insulino-resistenza questo processo non è sufficientemente attivo ed i trigliceridi si accumulano nel fegato provocando la steatosi epatica [32].

L'aumento del rilascio di acidi grassi liberi da parte degli adipociti e una sintesi maggiore di trigliceridi a livello epatico sono quindi i passaggi chiave del processo aterogenico coinvolto nella patogenesi delle malattie cardiovascolari.

L'ipertensione è un altro importante componente della sindrome metabolica, ed i livelli di pressione sanguigna sono fortemente connessi con l'obesità viscerale e con l'insulino-resistenza [33]. Nei soggetti affetti da diabete di tipo 2 vi è una chiara correlazione tra ipertensione e peso corporeo.

Diversi sono i meccanismi che, combinati, concorrono all'insorgenza di questa patologia. Negli individui sani l'insulina ha un effetto anti-natriuretico e stimola il riassorbimento del sodio a livello del tubulo convoluto prossimale [34-35]. Questo effetto è maggiore nei soggetti con insulino-resistenza [36]. Anche l'attivazione del sistema nervoso simpatico (SNS) aumentata nelle persone obese rispetto agli individui non obesi [37], e le concentrazioni sieriche di catecolamine prodotte in soggetti con obesità centrale sono significativamente maggiori rispetto a quelle nelle persone affette da obesità periferica. Gli individui obesi presentano anche un sistema renina-angiotensina più attivato [38]. Il sistema renina-angiotensina e l'attività del sistema nervoso simpatico sono legati da un feedback positivo [40]. L'angiotensinogeno, l'ACE, e il gene del recettore dell'angiotensina I sono ampiamente espressi nel tessuto adiposo umano [39] e la produzione e conversione ad angiotensina II può aumentare in soggetti obesi. Inoltre in individui affetti da obesità i livelli plasmatici di aldosterone sono più elevati rispetto ai non obesi.

1.2.2 infiammazione e sindrome metabolica

Da sempre considerato solo come un deposito passivo per la produzione di energia, il tessuto adiposo bianco (WAT) è stato riconosciuto come un organo endocrino, dalla capacità di secernere diversi peptidi bioattivi che contribuiscono alla regolazione dell'omeostasi metabolica. Le molecole principali, i cui ruoli sono stati scoperti solo recentemente sono la leptina, l'adiponectina, la resistina, il tumor necrosis factor (TNF- α), l'interleuchina-6 (IL-6), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1; noto anche come CCL2), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), l'angiotensinogeno, la visfatina, la retinol-binding protein-4, la serum amylois-A e altre. Leptina e adiponectina sono considerate adipochine primarie perché prodotte principalmente dagli adipociti. La resistina, è prodotta solo dalle cellule mononucleate, come i macrofagi, mentre IL TNF- α , L'IL-6, LA MPC-1, la visfatina e il e PAI-1 sono espressi negli adipociti, nei macrofagi attivati e/o in altre cellule immunitarie. Il tessuto adiposo è un organo complesso, con attività secretoria, che invia e riceve segnali che modulano il dispendio energetico, l'appetito, la sensibilità all'insulina, il metabolismo osseo, l'infiammazione e l'immunità [41]. Nei soggetti obesi il tessuto adiposo è caratterizzato da infiltrazione di macrofagi, reclutati grazie alla sintesi di sostanze chemioattrattive, quali la MCP-1. Sia negli uomini, sia nei topi il numero di macrofagi infiltrati è direttamente correlato con l'obesità e con la dimensione degli adipociti (Figura 1.10). I macrofagi sintetizzano a loro volta molecole pro-infiammatorie che possono modulare l'attività secretoria degli adipociti stessi [42].

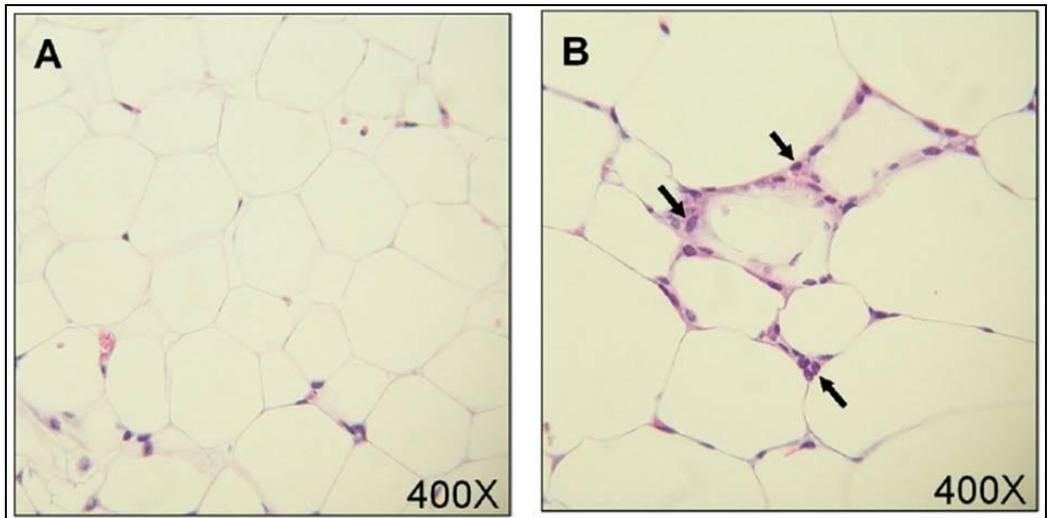


Figura 1.10 Adipose tissue inflammation from the epididymal adipose tissue of 14-week-old (A) wt C57Bl/6 mice and (B) obese *ob/ob* mice. The increase in fat cell size seen in *ob/ob* mice is accompanied by the increased infiltration of immune cells including macrophages.

Le molecole pro-infiammatorie hanno un effetto diretto sul metabolismo cellulare. Per esempio TNF- α aumenta direttamente l'insulino-resistenza e la lipolisi negli adipociti. L'IL-6 favorisce l'ipertrigliceridemia stimolando la lipolisi e la secrezione epatica di trigliceridi. La produzione di queste sostanze determina una maggior sintesi di molecole di adesione (es. intracellular adhesion molecule -ICAM- and vascular cell adhesion molecule -VCAM-) aumentando la permeabilità ed il passaggio di monociti attratti dalle molecole chemoattrattive. Il segnale infiammatorio è dato da un aumento della comunicazione crociata tra le cellule epiteliali adiacenti con gli adipociti e con i macrofagi presenti, che insieme contribuiscono a produrre citochine pro-infiammatorie e indurre uno stato di insulino resistenza locale e sistemico. Quindi, è plausibile che l'accumulo di grasso viscerale sia solo l'inizio dello stato infiammatorio nel tessuto adiposo, e che siano i macrofagi residenti ad amplificarne il segnale (Figura 1.11) [43].

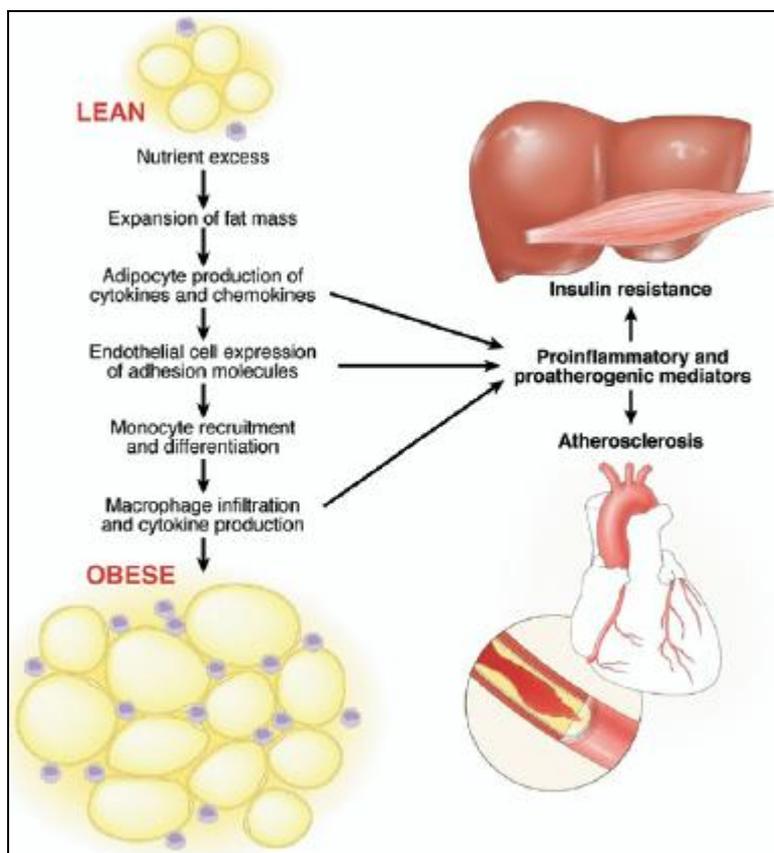


Figura 1.11 Meccanismo infiammatorio indotto dall'obesità.

Due sono i fattori di trascrizione i cui effetti sono coinvolti nel processo infiammatorio correlato all'obesità e all'insulino-resistenza: NF-kB e JNK. Questi recettori nucleari sono attivati da stimoli pro-infiammatori, quali le adipochine. Inoltre possono essere attivati dai toll-like receptors i quali, a loro volta, possono essere attivati dagli acidi grassi. Questo suggerisce un potenziale legame tra elevati livelli di FFA circolanti/tessuto adiposo e sistema immunitario. Inoltre anche le specie reattive dell'ossigeno, prodotte nel tessuto adiposo, possono attivare JNK e NF-kB [44].

I livelli plasmatici di IL-6 in particolare, sono aumentati nei pazienti con diabete di tipo 2. La produzione di IL-6 nel tessuto adiposo viscerale è di tre volte maggiore rispetto a quella del tessuto adiposo sottocutaneo, il che indica che IL-6 potrebbe essere uno dei fattori

che rende il tessuto adiposo addominale un fattore di rischio per lo sviluppo di insulina-resistenza. Infatti, studi sui topi con obesità indotta dalla dieta hanno mostrato che la sensibilità insulinica aumenta se trattati con anticorpi anti-IL-6. Questo miglioramento sembra essere dovuto al miglioramento dell'insulino-resistenza epatica, perché il trattamento con IL-6 inibisce anche l'auto-fosforilazione del recettore dell'insulina [45].

L'adiponectina è sintetizzata principalmente dal tessuto adiposo, ma è espressa anche nel tessuto muscolo-scheletrico, nei miociti cardiaci e nelle cellule endoteliali. Circola in alte concentrazioni nel siero umano (5-10 mg/mL) ed i livelli ematici sono marcatamente ridotti in soggetti con obesità addominale, con insulino resistenza, diabete di tipo 2, con la steatosi epatica non-alcolica e con l'aterosclerosi. L'adiponectinemia è inversamente correlata con l'insulino-resistenza. Non è importante per l'insulino-resistenza la concentrazione totale di adiponectina, ma il rapporto tra le due forme (alto e basso peso molecolare). Solo quella ad alto peso molecolare ha effetti protettivi nei confronti dell'insulino-resistenza, e una riduzione moderata del peso corporeo aumenta il rapporto tra le 2 forme.

In linee cellulari il TNF- α sopprime la trascrizione dei geni che codificano per l'adiponectina, e questo può spiegare i livelli bassi di adiponectinemia nei soggetti obesi. L'espressione dell'adiponectina è regolata anche da altri mediatori pro infiammatori, come l'IL-6 che ne sopprime la trascrizione e traduzione [44].

In animali obesi il trattamento con adiponectina riduce l'iperglicemia ed i livelli ematici di FFA e aumenta la sensibilità all'insulina. Una deficienza e una dieta ricca di grassi e zuccheri, invece, inducono insulino-resistenza. Inoltre nei topi l'adiponectina stimola la β -ossidazione epatica riducendo l'espressione del sterol-regulatory-element-binding protein 1C (SREBP1C), che è il principale fattore di trascrizione per i geni che codificano i mediatori della sintesi dei lipidi.

Anche la leptina svolge un ruolo importante nel modulare la risposta immunitaria e l'infiammazione, oltre alla regolazione di funzioni neuroendocrine, all'omeostasi energetica, all'ematopoiesi e all'angiogenesi. A differenza dell'adiponectina, è considerata come una citochina pro-infiammatoria. La sua funzione principale è il controllo dell'appetito: nei topi con una mutazione nel gene che codifica per leptina (ob/ob) o nel gene che codifica per il recettore

della leptina (db/db) vi sono fenotipi obesi. Tuttavia, questi topi presentano anche vari difetti nell'immunità cellulo-mediata e umorale. I livelli sierici di leptina riflettono la quantità di energia immagazzinata nel tessuto adiposo e sono proporzionali alla massa adiposa sia negli umani, sia nei topi. I livelli sierici sono 2-3 volte superiori nelle donne rispetto agli uomini, anche quando le concentrazioni sono aggiustate per età e BMI. Nei monociti e macrofagi la leptina incrementa la sintesi di citochine pro-infiammatorie come il TNF- α , l'IL-6 e l'IL-12. Inoltre, favorisce l'espressione fattori pro-infiammatori e pro-angiogenici come ad esempio MPC1 nell'endotelio vascolare.

Anche la resistina svolge un ruolo nell'infiammazione e nell'insulino-resistenza. È coinvolta nella patogenesi dell'obesità associata a insulino-resistenza e nel diabete mellito di tipo 2. La trascrizione dei geni che codificano la resistina è marcatamente aumentata dalla presenza delle citochine pro-infiammatorie IL-1, IL-6 e TNF- α , e del lipopolisaccaride (LPS). Resistina e adiponectina hanno effetti reciproci sulle cellule dell'endotelio vascolare: la resistina induce l'espressione di VCAM-1, ICAM-1 e pentraxin-3, mentre l'adiponectina reprime l'espressione di queste molecole [46].

La visfatina, nota anche come PBEF, è secreta dagli adipociti del tessuto adiposo viscerale e la sua concentrazione plasmatica diminuisce con l'insulino-resistenza. Questa adipochina si lega al recettore per l'insulina senza competere con insulina e lo attiva, il che indica che le due proteine si legano in siti diversi del recettore.

Il reclutamento dei leucociti nei tessuti è una funzione essenziale delle cellule endoteliali. Nell'aterosclerosi questo processo è alterato. Nei topi è stata riportata la presenza di capillari fenestrati nel tessuto adiposo, uno dei tratti distintivi degli organi endocrini ed esocrini, che facilitano il rilascio di prodotti nel sangue. Nel processo infiammatorio, vi è un'attivazione delle cellule endoteliali che portano alla produzione di una serie di molecole di adesione cellulare ed intercellulare (CAMs), di citochine e di ectoenzimi, che guidano i leucociti verso i tessuti e ne stimolano l'attivazione.

Le molecole di adesione (CAMs) più importanti sono le selectine, le immunoglobuline e la superfamiglia delle integrine. I livelli circolanti di ICAM-1, VCAM-1 e della E-selectina sono aumentati negli adulti e bambini obesi, mentre una riduzione del peso ne riduce i livelli.

ICAM-1 è presente in forma solubile (sICAM-1) nel siero, nel liquido cerebrospinale e nelle urina. Livelli elevati di sICAM-1 in questi fluidi sono associati a malattie cardiovascolari, diabete di tipo 2, stress ossidativo e obesità addominale. Nei topi è stato provato il ruolo potenziale delle molecole di adesione nella genesi della condizione infiammatoria associata all'obesità: nei topi che seguono una dieta ad alto contenuto di grassi, le concentrazioni di ICAM-1 correlano significativamente con il peso corporeo e con la massa grassa addominale.

1.3 il consumo di frutta e verdura nella prevenzione delle malattie cronico-degenerative

Il consumo di frutta e verdura è considerato uno strumento importante nella prevenzione delle malattie cronico-degenerative, ed in particolare nei confronti delle malattie cardiovascolari e di alcune forme tumorali [47,48]. Frutta e verdura contengono diversi componenti bioattivi, come le vitamine, i minerali, i composti fenolici e la fibra, che agiscono attraverso una serie di meccanismi, anche redox, e possono avere effetti a breve e lungo termine sullo stato di salute, favorendo, ad esempio, la funzionalità intestinale o influenzando la comparsa o il decorso di una malattia cronico-degenerativa [49].

In letteratura sono stati pubblicati diversi studi che hanno esaminato la relazione tra il consumo di frutta e verdura e le malattie coronariche e le neoplasie, con risultati positivi ed incoraggianti circa il loro effetto protettivo. Tuttavia, l'intensità delle associazioni rimane ancora incerta, a causa dei differenti approcci metodologici e delle tecniche analitiche usate.

Per quanto riguarda le CHDs, in una recente meta-analisi condotta [49] su 9 studi di coorte, è stata confermata l'associazione negativa tra il consumo di frutta e verdura e il rischio relativo (RR) di queste malattie. In particolare, da questo studio è emersa una relazione dose-risposta lineare negativa (Figura 1.12), in cui il RR si è ridotto del 4% per ogni porzione di frutta e verdura consumate quotidianamente e del 7% per ogni porzione di frutta.

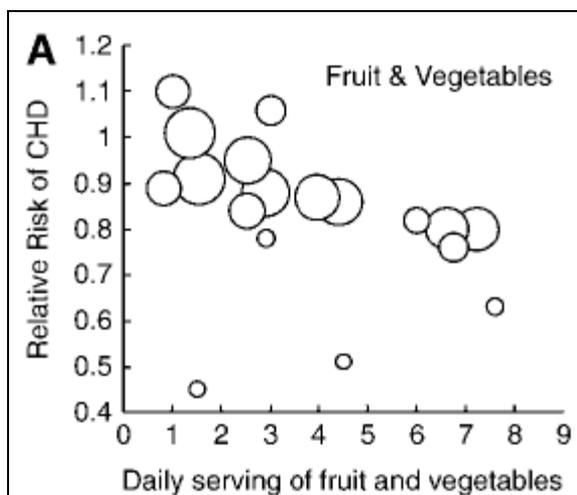


Figura 1.12 Relazione tra consumo di frutta verdura e rischio relativo di CHD.

Anche da un'altra meta-analisi del 2007, condotta su 13 studi di coorte con un follow-up medio di 11 anni, emergono le stesse conclusioni: il consumo di frutta e verdura è inversamente associato al RR di CHDs. In questo studio la popolazione è stata suddivisa per fasce di consumo di frutta e verdura. Negli individui che ne consumavano più di cinque porzioni è stata riscontrata una riduzione media del RR del 17%, rispetto ad una diminuzione del 7% nei soggetti che ne consumavano solo 3-5 porzioni [50]. Questi risultati forniscono un forte sostegno per le raccomandazioni a consumare almeno 5 porzioni al giorno di frutta e verdura, come consigliato dalle linee guida per una sana alimentazione elaborate dall'INRAN.

Da un'indagine sugli studi pubblicati relativi agli effetti protettivi di frutta e verdura si evince che il consumo di questi alimenti è associato ad abitudini alimentari equilibrate e ad un consumo ridotto di grassi saturi, il che contribuisce anche a spiegare la riduzione del RR per le CHDs associata al consumo di frutta e verdura [51-54].

Nella maggior parte studi epidemiologici che hanno indagato sulla relazione tra il consumo di frutta e verdura e l'ictus, è stato dimostrato che l'aumento del consumo di questi alimenti è associato ad una riduzione del RR. In una meta-analisi del 2006 è stata valutata quantitativamente la relazione tra consumo di frutta e verdura e l'incidenza di ictus in alcuni studi di coorte. Rispetto ai soggetti che consumavano meno di tre porzioni di frutta e verdura al

giorno, il RR medio di ictus è stato di 0,89 (IC 95% 0,83 -0 97) per le persone che consumavano da tre a cinque porzioni al giorno, e di 0.74 (0.69 -0 79) per gli individui che mangiavano più di cinque porzioni (Figura 1.13).

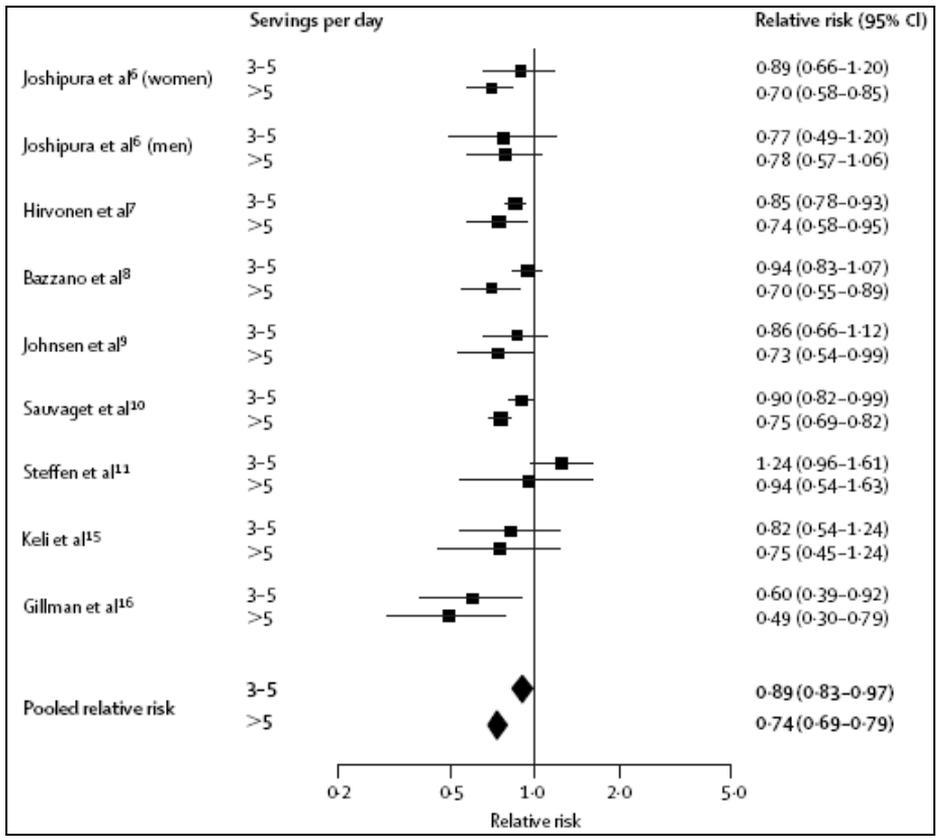


Figura 1.13 Rischio di ictus per 3-5 e 5 porzioni di verdura al giorno.

Pur non emergendo una relazione lineare tra il consumo di frutta e verdura e l'insorgenza di ictus, è evidente una relazione dose-risposta, che attribuisce a questi alimenti un effetto protettivo utile nella prevenzione di questa patologia.

A parte il sovrappeso e l'obesità, le evidenze scientifiche più rilevanti circa l'effetto della dieta sull'incidenza di cancro, riguardano l'effetto protettivo legato al consumo di frutta e verdura. Nel 1997, un panel internazionale (World Cancer Research Fund–American Institute

for Cancer Research) ha concluso che vi erano evidenze scientifiche convincenti circa l'effetto protettivo di frutta e verdura nei confronti del cancro alla bocca, faringe, esofago, stomaco e polmoni. Sono state considerate inconsistenti, invece, le evidenze riguardo all'associazione con il tumore al fegato, prostata, colon-retto e ai reni. Per di più, alcuni studi epidemiologici recenti non supportano l'ipotesi di un effetto protettivo di frutta e verdura sull'eziologia del cancro.

Cancer site	WCRF-AICR	COMA
Mouth and pharynx	Convincing	Weakly consistent for fruit, inconsistent for vegetables
Larynx	Probably	Moderately consistent, limited data
Esophagus	Convincing	Strongly consistent
Lung	Convincing, particularly for green vegetables and carrots	Moderately consistent for fruit, weakly consistent for vegetables
Stomach	Convincing, in particular for raw vegetables, allium vegetables, and citrus fruit	Moderately consistent
Pancreas	Probable	Strongly consistent, limited data
Liver	Possible for vegetables, not fruit	Not included in the review
Colon and rectum	Convincing for vegetables, limited and inconsistent data for fruit	Moderately consistent for vegetables, inconsistent and limited data for fruit
Breast	Probable, in particular for green vegetables	Moderately consistent for vegetables, weakly consistent for fruit
Ovary	Possible	Insufficient
Endometrium	Possible	Insufficient
Cervix	Possible	Strongly consistent, limited data
Prostate	Possible for vegetables, inconsistent for fruit	Moderately consistent, especially raw and salad type for vegetables, inconsistent for fruit
Kidney	Possible for vegetables, limited evidence for fruit	Not included in the review
Thyroid	Possible	Not included in the review
Bladder	Probable	Moderately consistent, limited data

² WCRF-AICR, World Cancer Research Fund–American Institute for Cancer Research; COMA, Chief Medical Officer's Committee on Medical Aspects of Food and Nutrition Policy of the United Kingdom.

Figura 1.14 principali conclusioni dei reports dei WCRF-AICR e COMA sul consumo di frutta e verdura e rischio di cancro.

In letteratura vi sono discrepanze tra i risultati ottenuti da studi caso-controllo e studi di coorte. Gli studi prospettici forniscono evidenze meno consistenti, pur essendo d'accordo sull'effetto protettivo di frutta e verdura (Figura 1.15).

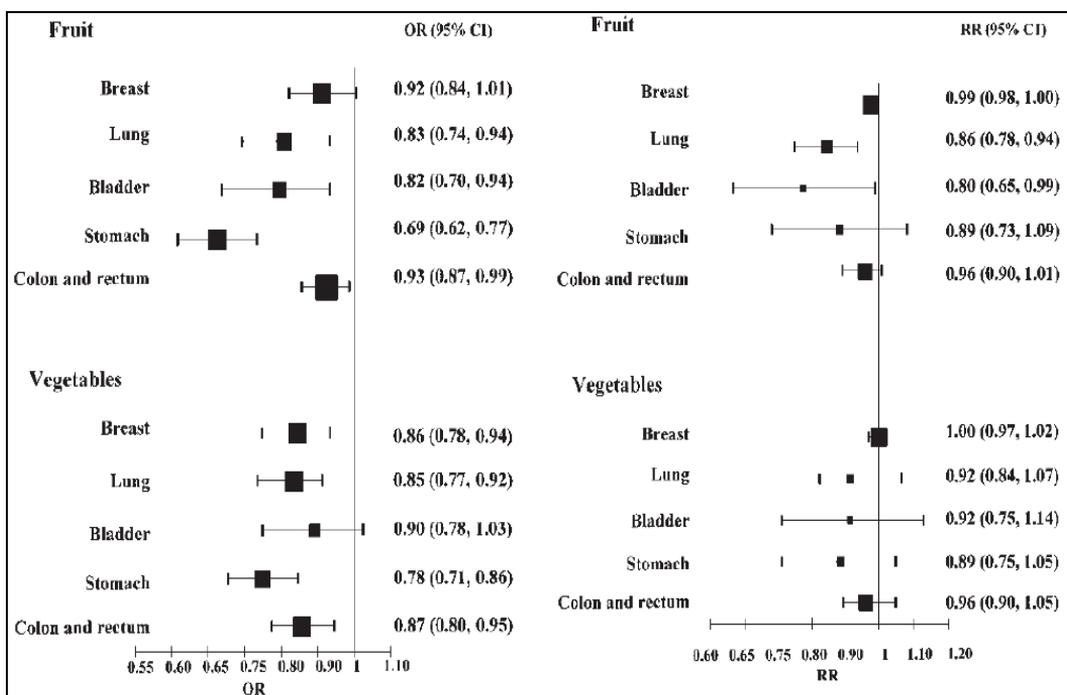


Figura 1.15 Meta-analisi di studi caso-controllo (sx) e studi di coorte (dx) sul consumo di frutta e verdura (intake di frutta e verdura di 100 g/die) e RR di sviluppare il cancro al seno, polmone, cistifellea, stomaco, colon-retto. [55].

Dall'analisi fin qui condotta, emerge come il consumo di frutta e verdura abbia delle implicazioni positive sullo stato di salute, proteggendo dall'insorgenza delle CVD e da alcune forme tumorali. L'intensità degli effetti protettivi è altresì connessa alle porzioni di frutta e verdura consumate. Ma scomponendo questi alimenti nei loro costituenti bioattivi, le evidenze scientifiche circa il loro effetto sulla salute diventano contraddittorie. Un esempio ne è la vitamina A.

Diversi studi sperimentali ed epidemiologici indicano effetti benefici sulla riduzione delle placche aterosclerotiche e nella riduzione del RR di CVD, derivanti dalla supplementazione di vitamine antiossidanti. Tuttavia studi recenti in cui sono stati definiti end-points primari e secondari danno risultati negativi.

Il Nurses Health Study (NHS), uno studio condotto valutando l'effetto della supplementazione di vit.A attraverso un questionario, non ha trovato associazioni con il rischio di sviluppare CVD. A conclusioni simili è giunto il Physicians Health Study, che prevedeva una supplementazione orale di 50 mg di β -carotene a giorni alterni. Anche in questo studio non sono emerse differenze significative nella mortalità per CVD tra il gruppo di soggetti trattato ed il gruppo di controllo.

Lo studio CARET (Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial), un trial clinico randomizzato in doppio cieco, a 2 bracci di trattamento (retinolo + β -carotene 30 mg/die, placebo), è stato interrotto a seguito di risultati preliminari sfavorevoli. Nei forti fumatori e negli individui esposti ad asbesto, l'incidenza di tumore al polmone è risultata più elevata del 28% nel gruppo trattato con β -carotene e vi sono stati anche incrementi dell'incidenza della mortalità generale del 17% e per cause cardiovascolari del 26%. Questi risultati sono la diretta conseguenza dell'aumento della produzione di radicali liberi, derivante all'esposizione ai fattori di rischio, e della presenza di agenti pro-ossidanti come la vitamina A [56].

Altri studi clinici sulla supplementazione multivitaminica, usata come coadiuvante nella prevenzione del cancro, hanno dato effetti sulla salute nulli o addirittura nocivi. Lo studio ATBC (Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study), un trial clinico randomizzato, in doppio cieco, a 4 bracci (β -carotene 20 mg/die, β -carotene 20 mg/die + tocoferolo 50 mg/die, tocoferolo, placebo), condotto in una popolazione di maschi tutti fumatori tra i 50 ed i 69 anni, ha mostrato che l'incidenza di casi di tumore polmonare è del 18% più elevata tra coloro che assumevano beta-carotene rispetto a coloro che assumevano tocoferolo o placebo. Inoltre, anche la mortalità generale è risultata dell'8% più elevata rispetto ai gruppi che non prendevano beta carotene.

Nello studio WHS o Women's Health Study, era prevista la supplementazione di beta-carotene, aspirina e vitamine E per valutare l'incidenza di cancro e malattie cardiovascolari nei vari gruppi. Dai risultati non fu osservata alcuna differenza significativa nell'incidenza di cancro tra i pazienti trattati ed il controllo [57].

Esiste, quindi, una chiara relazione dose-risposta tra il consumo di frutta e verdura e la riduzione dell'incidenza di CVD, di neoplasie e della mortalità associata a queste patologie. Vi

sono, invece, dati incerti e contrastanti circa gli effetti sulla salute di alcuni nutrienti, quando considerati singolarmente. Questo conferma la tesi che sia la sinergia dei componenti presenti in frutta e verdura, quando consumate nelle quantità raccomandate, a conferire effetti benefici a questi alimenti.

1.4 I composti fenolici

Da quanto riportato nel paragrafo precedente, si evincono gli effetti protettivi sulla salute derivanti dal consumo di alcuni alimenti di origine vegetale. In letteratura diversi studi riportano un'associazione negativa tra consumo di alimenti ricchi in polifenoli e CVD e neoplasie. Quest'associazione è stata parzialmente spiegata con l'ipotesi che i polifenoli interrompano la perossidazione indotta dalle specie reattive dell'ossigeno. Inoltre alcuni polifenoli, studiati per le loro proprietà antiossidanti, hanno la capacità di modulare la risposta cellulare in presenza di stimoli come le citochine e i fattori di crescita, proteine capaci di stimolare la proliferazione e il differenziamento cellulare. I meccanismi molecolari con cui questi composti giocano un ruolo fondamentale nell'eziopatologia dell'aterosclerosi, riguardano la loro capacità di modulare l'espressione genica, agendo sul fattore di trascrizione nucleare kappa B (NF- κ B). Questi composti hanno quindi proprietà antinfiammatorie e inducono una risposta apoptotica. Oltre che per le loro proprietà bioattive, l'altra ragione per i quali i polifenoli sono molto studiati è la loro abbondanza negli alimenti che compongono la nostra dieta.

I composti fenolici sono prodotti dalle piante durante i processi di difesa contro i patogeni e le radiazioni ultraviolette. Queste molecole possono essere classificate in diversi gruppi in funzione del numero di anelli fenolici che contengono e dei sostituenti legati all'anello. Si distinguono in acidi fenolici, flavonoidi, stilbeni e lignani.

Gli acidi fenolici possono a loro volta essere classificati in derivati dell'acido benzoico o dell'acido cinnamico (Figura 1.16).

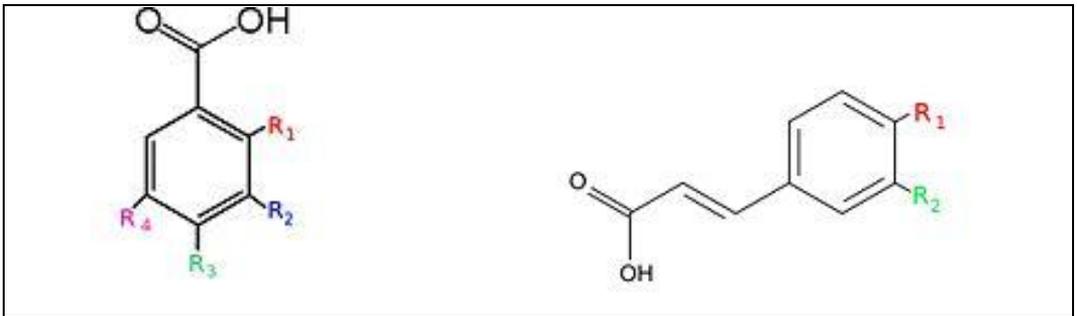


Figura 1.16 Acido benzoico generico (sx) e Acido cinnamico generico (dx).

Il contenuto di acidi idrossibenzoici nei vegetali edibili è piuttosto basso, ad eccezione di certi frutti rossi, del ravanello nero e delle cipolle, che possono raggiungere concentrazioni di decine di milligrammi per kg di prodotto fresco. Il tè è un importante fonte di acido gallico e può arrivare a contenerne fino a 4,5 g/kg. Gli acidi idrossibenzoici sono anche componenti di strutture più complesse come i tannini.

Gli acidi idrossicinnamici, invece, sono più comuni negli alimenti vegetali e consistono principalmente nell'acido p-coumarico, nel caffeico, ferulico e sinapico. Questi acidi sono raramente presenti liberi nei vegetali freschi, eccetto in quelli in cui le trasformazioni tecnologiche a cui sono sottoposti ne inducono una liberazione (freezing, sterilizzazione o fermentazione). Generalmente questi acidi sono legati a formare derivati glicosidici o esteri dell'acido quinico, shikimico o tartarico. L'acido caffeico e quinoico si combinano a formare l'acido clorogenico, che si ritrova in diversi frutti anche in concentrazione elevate: dai 70 ai 350 mg in una tazza di caffè [58]. I frutti che hanno il maggior contenuto di acidi idrossicinnamici sono i mirtilli, i kiwi, le prugne, le ciliegie e le pere con 0.5–2 g/kg. L'acido caffeico, libero o esterificato è generalmente l'acido fenolico più abbondante, rappresentando tra il 75-100% degli acidi idrossicinnamici totali contenuti nella frutta. Gli acidi idrossicinnamici sono presenti in tutte le parti dei frutti, anche se le concentrazioni maggiori sono state ritrovate negli strati più esterni dei frutti maturi. Le concentrazioni generalmente si riducono durante la maturazione, ma la quantità totale è maggiore all'aumentare della dimensione del frutto.

1.5 L'acido ferulico

L'acido ferulico (FA) è il più abbondante acido fenolico presente nelle cariossidi del frumento (0.8–2 g/kg peso secco), in cui rappresenta fino al 90% dei polifenoli totali. Per il 98% circa, è localizzato nello strato aleuronico e nel pericarpo.

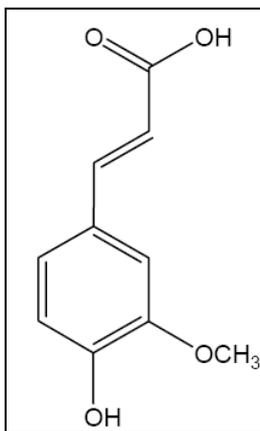


Figura 1.17 Formula di struttura dell'acido ferulico.

Le cariossidi ed i loro derivati costituiscono la fonte dietetica principale di FA. Il contenuto negli sfarinati è inversamente correlato al grado di abburattamento: più la farina sarà grezza più il contenuto di FA è maggiore. In questi alimenti l'acido ferulico si trova principalmente in forma esterificata con arabinosilani ed emicellulose e solo il 10% è presente nella forma libera solubile.

FA è un potente antiossidante con attività di radical scavenger e protegge il DNA dai danni ossidativi provocati dai ROS. L'effetto protettivo nei confronti dei danni al DNA è stato dimostrato su colture cellulari di linfociti ematici di ratto, in cui FA riduce la perossidazione lipidica [59]. In letteratura sono stati riportati anche effetti pro-apoptici e un'attività chemoprotettiva nei confronti del cancro al seno. In aggiunta, l'acido ferulico ha effetti antifungini.

Gli studi epidemiologici suggeriscono un legame tra il consumo di prodotti a base di grano integrale e la prevenzione delle NCD, come la malattia coronarica e di alcune forme tumorali [60,61]. Un apporto di 20 g di crusca di frumento fornirebbe circa 100 mg di ferulati totali e 20 mg di diferulati [62]. Tuttavia, per stabilire i loro possibili effetti in vivo, è essenziale determinare se questi composti siano assorbiti e se le forme che si trovano in circolo nel plasma possano raggiungere i tessuti target. Uno studio condotto su sei volontari mostra che dopo l'assunzione di 100 g di cereali arricchiti di crusca, l'acido idrossicinnamico prevalente a livello ematico è stato l'acido ferulico-glucuronide. Per la maggior parte dei volontari le concentrazioni plasmatiche di acido ferulico raggiungono un massimo (150-210 nM) nelle prime tre ore dall'ingestione e diminuiscono rapidamente entro le 6 ore e, più lentamente, fino alle 24 ore dal consumo (Figura 1.18).

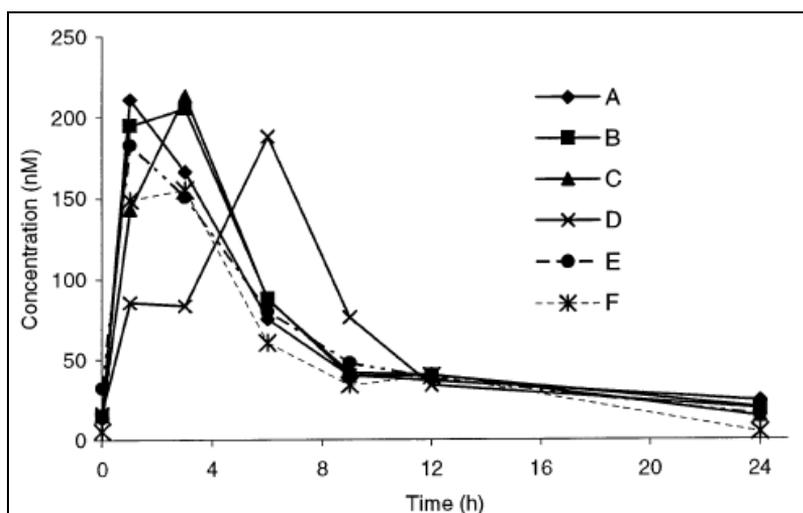


Figura 1.18 Concentrazione di FA libero immediatamente prima e nelle 24 h seguenti al consumo di cereali arricchiti in fibra in sei volontari.

Questo suggerisce che l'idrolisi dei diferulati e l'assorbimento si verificano principalmente nel piccolo intestino. Inoltre, i bassi livelli plasmatici di FA nelle 6 ore successive al consumo sono indicativi di uno scarso o nullo assorbimento nell'intestino crasso,

dove vi è buona probabilità che sia ulteriormente metabolizzato dalla microflora o escreto attraverso le feci.

1.6 L'acido salicilico

Da molti studi sul rapporto dieta-salute emerge che una dieta ricca in alimenti vegetali protegge contro l'insorgenza di diverse forme tumorali e dalle malattie cardiovascolari(1), e alcuni metaboliti secondari delle piante, come gli alcaloidi e le sostanze fenoliche, possono contribuire a tale beneficio. L'acido salicilico (SA), impiegato nella sintesi dell'Aspirina, è ampiamente usato per il trattamento preventivo delle CVD e per i suoi effetti analgesico, antipiretico e anti-infiammatorio (3).

L'acido salicilico, o acido 2-idrossibenzoico ($C_7H_6O_3$), è un acido fenolico derivato dell'acido benzoico ed è caratterizzato dalla presenza di un gruppo carbossilico legato all'anello fenolico in posizione orto.

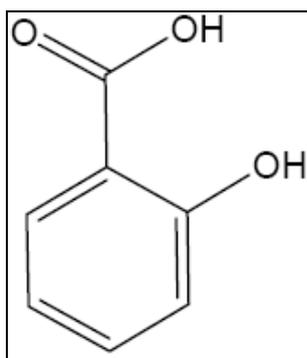


Figura 1.19 Formula di struttura dell'acido salicilico.

1.6.1 il ruolo dell'acido salicilico nelle piante

L'acido salicilico è un ormone ubiquitariamente distribuito nelle piante, dove svolge diverse funzioni di regolazione del metabolismo [63]. Agisce come molecola-segnale implicata nell'attivazione dell'espressione genica di enzimi coinvolti nelle reazioni di difesa, ma, in alcune piante, può anche indurre la fioritura. Molte piante mostrano un aumento nel loro contenuto di acido salicilico dopo essere state infettate da virus o funghi, ma anche dopo l'esposizione a radiazioni UV, all'ozono o ad altre fonti di stress. È stato osservato che la pianta del tabacco trattata con aspirina (acido acetilsalicilico), o con acido salicilico, ha una maggiore resistenza agli agenti patogeni, come il mosaico del tabacco. Il ruolo centrale del SA nei meccanismi di difesa può essere spiegato anche osservando la variante modificata di *Arabidopsis* che ha perso la capacità di produrlo, ed è più esposta ad infezioni rispetto alla variante non modificata.

Nelle piante SA è sintetizzato a partire dalla fenilalanina (Phe), un amminoacido che nei vegetali, contrariamente a quanto avviene negli animali monogastrici, non è considerato essenziale. La Phe è uno dei prodotti finali della via dell'acido shikimico, pathway che lega il metabolismo dei carboidrati con la biosintesi degli aminoacidi aromatici (Figura 1.18).

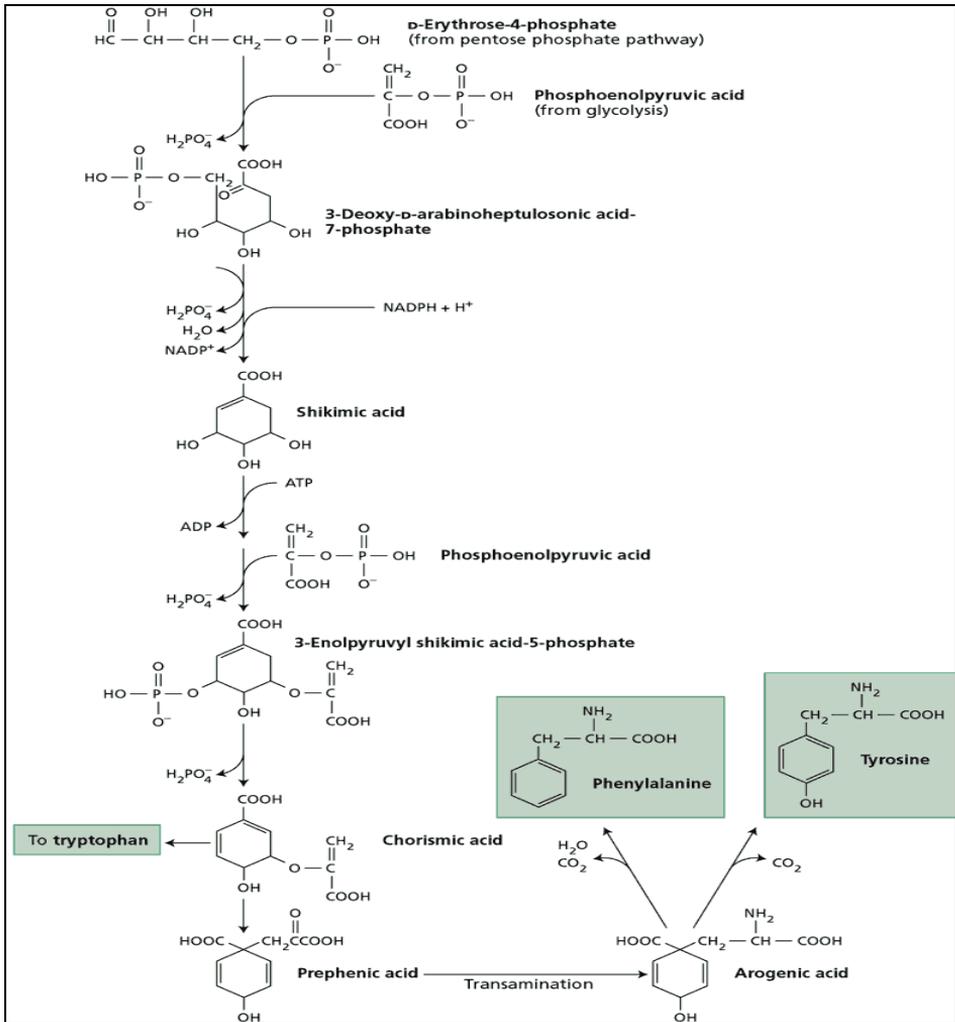


Figura 1.20 Via dell'acido shikimico.

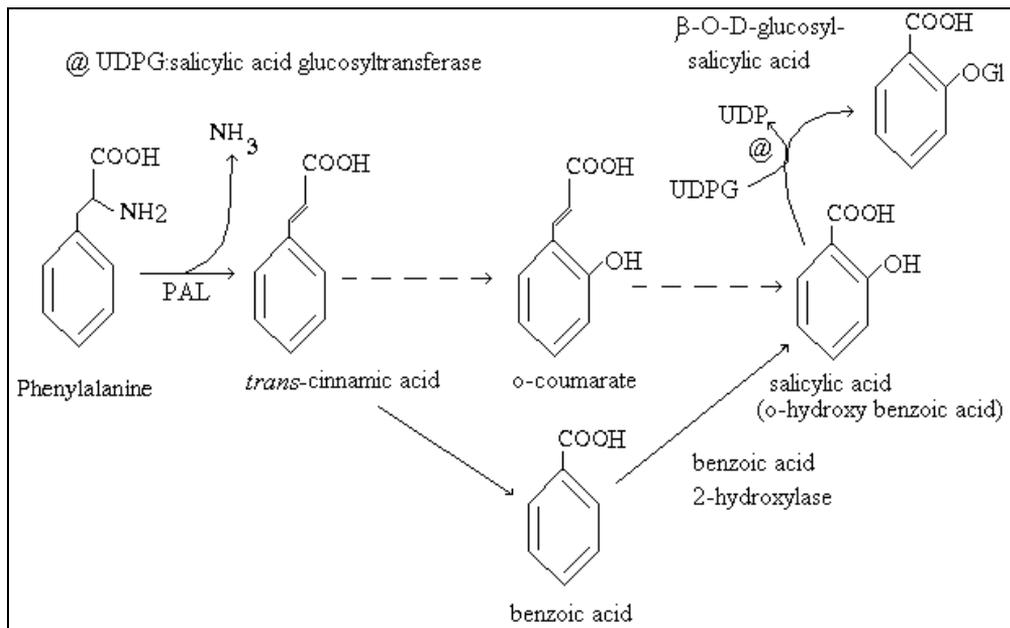


Figura 1.21 Vie sintetiche dell'acido salicilico nelle piante.

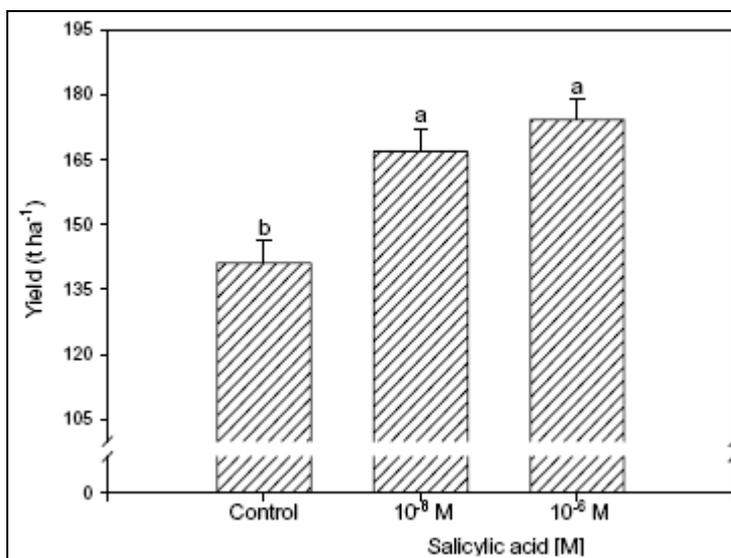
La fenilalanina, per azione dell'enzima fenilalanina ammonia liasi (PAL), è convertita ad acido *trans*-cinnamico, il precursore di numerosi fenilpropanoidi, che hanno funzioni di supporto meccanico (lignine), di protezione contro stress biotici e abiotici e pigmenti quali le antocianine. A questo punto l'acido salicilico può essere ottenuto per decarbossilazione della catena laterale dell'acido cinnamico a generare l'acido benzoico, che va in contro a idrossilazione nella posizione C-2 ad opera dell'acido benzoico 2-idrossilasi (BA2H) [64]. Alternativamente, BA2H può idrossilare l'acido *trans*-cinnamico in posizione C2 a dare l'acido orto-cumarico, che a seguito di decarbossilazione è convertito in SA, reazione catalizzata dalla *trans*-cinnamato-4-idrossilasi [65,66].

L'acido salicilico forma coniugati con diverse molecole [67-69] attraverso la glicosilazione e, meno frequentemente, con l'esterificazione o l'idrossilazione dell'anello aromatico [70]. SA-2-O- β -D-glucoside è il coniugato predominante nelle piante e la sua formazione è catalizzata dall'acido salicilico glucosiltransferasi in presenza di UTP. Il SA-2-O- β -D-glucoside si accumula nelle foglie delle piante, in seguito a stress biotici e abiotici.

1.6.1.1 Effetto dell'acido salicilico sulla produttività

L'apparato radicale gioca un ruolo chiave nella produttività di ogni pianta. È stato riportato già nel 1974 che l'aggiunta di Aspirina favorisce la crescita di un apparato radicale più sviluppato che migliora le performance della pianta. Infatti, si è visto che l'applicazione di acido salicilico a basse concentrazioni (10^{-6} - 10^{-8} M) aumenta la produzione come nella Clitoria, utilizzata per la produzione di mangimi. Lo stesso effetto è stato ottenuto anche su piante ornamentali somministrando SA in concentrazioni identiche alle precedenti. I dati in letteratura mostrano che a seguito di trattamenti con SA vi è un aumento del diametro dello stelo, del numero di foglie, della massa dei germogli anche fino al 10%.

Un altro degli effetti importanti dell'acido salicilico nelle piante è l'induzione della fioritura. Diversi esperimenti stabiliscono chiaramente che le piante trattate con SA fioriscono prematuramente rispetto a quelle non trattate. In specie ornamentali, quale Gloxinia (*Sinningia speciosa*), il trattamento con SA ha anticipato la fioritura al 24° giorno rispetto al 30° della pianta di controllo. Lo stesso effetto è stato riscontrato anche in piante coltivate in serra [71]. Recentemente, in coltivazioni di Carica papaya pretrattate con concentrazioni di SA pari 10^{-6} - 10^{-8} M è emerso anche un significativo incremento nella produzione di frutti di circa il 20% rispetto al controllo [72,73].



1.22 Produttività (ton/ha) in coltivazione di *Carica papaya* trattata con SA.

1.6.1.2 Acido salicilico e resistenza locale ai patogeni.

In seguito all'attacco di vari agenti patogeni, le piante acquisiscono la resistenza sistemica (Systemic Acquired Resistance, SAR), ovvero una stimolazione del sistema immunitario che gli consente di opporre una difesa migliore qualora lo stesso patogeno riattaccasse la pianta. Questo perché nelle piante malate SA induce la risposta ipersensibile, attraverso la quale sono in grado di circoscrivere il sito di penetrazione alla base della lesione causata dagli agenti patogeni. Secondo recenti studi, questa immunità viene promossa dall'accumulo di acido salicilico nelle cellule. Nella pianta del tabacco in cui sono stati introdotti due geni batterici che codificano per alcuni importanti enzimi coinvolti nella sintesi microbica dell'acido salicilico, la isocorismato-sintasi (ICS) e la isocorismato piruvato-liasi (IPL), queste pianticelle transgeniche producono una quantità di acido salicilico 500-1000 volte superiore alla variante normale e mostrano una sorprendente resistenza all'attacco del virus del mosaico e ad altri patogeni.

1.6.2 L'acido salicilico negli alimenti

Gli alimenti di origine vegetale hanno un ruolo centrale nella dieta, soprattutto in quella mediterranea. Per questo quantificare l'acido salicilico in questi alimenti è importante per comprendere se le quantità, in essi presenti, sono in grado di sortire effetti benefici sulla salute.

Il numero di pubblicazioni riguardanti il contenuto di SA negli alimenti è limitato, ed i risultati a cui queste giungono sono piuttosto contrastanti. Ad oggi, in letteratura sono presenti solo due studi che quantificano il SA negli alimenti vegetali più consumati, quali frutta, verdura, legumi, erbe aromatiche e spezie, birra, vino, bibite analcoliche e miele [74,75].

Nello studio condotto da Swain A. R nel 1985, sono state analizzate le concentrazioni di SA nelle parti edibili di 333 alimenti. Alcuni dei risultati ottenuti sono riportati in Tabella 1.1.

Tabella 1.1 Concentrazioni di SA negli alimenti. [75].

PRODOTTO	CONTENUTO SA (mg/100g)
Frutta	
Mela fresca Golden Delicious	0,08
Mela fresca Red Delicious	0,19
Mela fresca Granny Smith	0,59
Mela fresca Jonathan	0,38
Mirtillo in scatola	2,76
Albicocca fresca	2,58
Ciliegie fresche	0,85
Uva fresca Red Malaita	0,94
Uva fresca Sultana	1,88
Arancia fresca	2,39
Ribes congelato nero	3,06
Ribes congelato rosso	5,06
Datteri freschi	3,73
Kiwi fresco	0,32
Pompelmo fresco	0,68
Ananas fresco	2,1
Fragole fresche	1,36
Pesca fresca	0,58
Lampone fresco	5,14
Vegetali	
Cetriolo senza buccia fresco	0,78
Pomodoro pasta	0,43-1,44
Pomodoro salsa	0,94-2,48
Patate con buccia fresche	0,12
Zucchine fresche	1,04
Broccoli freschi	0,65
Cicoria fresca	1,02
Cipolla fresca	0,16
Spinaci freschi	0,58

Erbe e spezie	
Cannella polvere essiccata	15,2
Curry polvere essiccata	218
Senape francese polvere essiccata	26
Origano polvere essiccata	66
Paprika piccante polvere essiccata	203
Pepe nero polvere essiccata	6,2
Rosmarino polvere essiccata	68
Timo foglie essiccate	183
Anice polvere essiccata	22,8
Bevande	
Birra	0,23-0,35
Caffè polvere	0-0,96
Caffè granulare Nescafé Instant	0,59
Coca-cola	0,25
Tè in foglie	1,9-4,24
Tè in sacchetto	2,40-7,34
Altri prodotti	
Miele Cavillano	10,14
Miele Aristocrat	3,7
Liquirizia	7,96-9,78
Menta piperita	0,77-7,58

Dai loro risultati emerge che nella frutta vi sono concentrazioni di salicilati nel range tra 0 e 60 mg/kg e che uva e prugne secche ne le quantità maggiori. Nel caso delle mele vi è una notevole differenza nei livelli di salicilati tra le varietà. Erbe e le spezie sono la categoria, tra gli alimenti analizzati, con le concentrazioni di salicilati più elevate: fino a 2180 mg/kg per la polvere di curry. Oltre a questa spezia, anche paprika, origano e timo mostrano concentrazioni di salicilati dai 660 ai 2030 mg/kg.

Da questi dati Swain et al. hanno potuto stimare che una dieta apporti quotidianamente circa dai 10 ai 200 mg di salicilati.

Nel 1996 Venema et al. eseguirono uno studio simile arrivando, però, a conclusioni diverse (Tabella 1.2).

Tabella 1.2 Concentrazioni di SA negli alimenti [74].

product	free acetylsalicylic acid (mg/kg)	free salicylic acid (mg/kg)	free-plus-bound salicylic acid (mg/kg)
Fresh or Canned Vegetables and Fruits			
apples with peel	<0.02 ^b	<0.02 ^b	<0.02 ^b
blueberry jam	<0.02	0.55	0.67
canned apricot	<0.02	0.13	0.1
canned cherries	<0.02	0.27	0.36
cucumber with peel	<0.02	0.02	0.077
grape	<0.02	<0.02	0.03
nectarine	<0.02	0.03	0.87
orange	<0.02	<0.02	<0.02
strawberry	<0.02	0.03	0.65
tomato with peel	<0.02	0.11	0.36
Herbs and Spices			
cinnamon	<0.2	6.6	23.8
mild curry powder	<0.2	3.69	5.55
French mustard	<0.2	0.2	0.48
oregano	<0.2	11.8	19.9
hot paprika powder	<0.2	1.73	2.98
black pepper	<0.2	1.18	3.05
rosemary	<0.2	6.76	28.4
thyme	<0.2	11.95	12.8 ^e
Beverages			
pilsner beer	<0.02	<0.02	<0.02
brewed coffee	<0.02	0.24	0.37
brewed tea	<0.02	0.33	0.42
red French Bordeaux wine	<0.02	0.65	0.71
red Spanish Rioja wine	<0.02	0.68	0.70
red Italian Chianti wine	<0.02	0.32	0.32
red Californian wine	<0.02	0.26	0.28
Miscellaneous			
grape currant	<0.2	0.32	0.41
honey	<0.2	0.59	0.66
licorice	<0.2	1.25	1.62 ^e
peppermint	<0.2	<0.2	0.07
grape raisins	<0.2	0.60	0.98
tomato paste	<0.02	0.48	0.75

Nei 30 alimenti analizzati, Venema et al. riportano concentrazioni di acido acetilsalicilico inferiori al limite di rivelabilità del metodo (0,02 mg/kg). Nei campioni di frutta e verdura, invece, vi sono livelli di SA tra 0,03 e 0,55 mg/kg e fino a 12 mg/kg nelle erbe aromatiche e spezie.

Negli alimenti, a seguito di idrolisi alcalina delle forme glicosilate ed esterificate, si ricava l'SA libero. Il rapporto salicilati totali/SA libero è molto variabile.

Oltre a Venema, altri autori [76,77] hanno trovato risultati inferiori a quelli di Swain, anche di 10-100. Queste differenze possono essere dovute alla diversa origine degli alimenti e alle operazioni analitiche e di stoccaggio. Tuttavia il metodo di estrazione utilizzato da Venema è pressoché uguale a quello impiegato da Swain, mentre la tecnica di separazione e rivelazione tramite HPLC-UV di Swain, è poco specifica e alcuni composti fenolici possono essere coeluiti con l'acido salicilico libero, sovrastimandone il contenuto.

Sulla base dei dati ottenuti dal Dutch Food Consumption Survey, e considerando le concentrazioni di SA totale ottenute da Venema, è stato stimato un apporto giornaliero di salicilati di 0-6 mg/die, quantità troppo basse per ottenere risultati fisiologici misurabili in vivo.

1.6.3 L'acido salicilico nell'uomo

La storia dell'aspirina risale a molte migliaia di anni fa, quando si preparavano i primi decotti a base di corteccia di salice e di pioppo per abbassare la febbre, ridurre l'infiammazione e lenire il dolore. Il principio attivo che conferiva a queste piante le loro proprietà, erano l'acido salicilico ed i suoi derivati, identificati e isolati solo nel 1850. Nel 1899, la casa farmaceutica Bayer mise in commercio, con il nome di Aspirina, l'acido acetilsalicilico (ASA), il derivato acetilato del SA. L'ASA, rispetto all'acido salicilico ha due vantaggi: non ha un sapore amaro e non irrita la mucosa gastrica.

Dopo l'ingestione, l'aspirina è assorbita con trasporto passivo a livello gastrico e nel piccolo intestino. Appena entrato in circolo, l'ASA è deacetilato, principalmente ad acido

salicilico, ad opera dell'enzima carbossilasi. L'emivita ematica dell'acido acetilsalicilico è di soli 20 minuti, mentre quella degli altri metaboliti de-acetilati può variare dalle 2 alle 30 ore.

Nel fegato, SA si lega alle proteine plasmatiche, quali l'albumina, e si distribuisce nei tessuti e nei fluidi transcellulari di tutto il corpo, attraverso processi passivi ph-dipendenti. La biotrasformazione del SA avviene essenzialmente nel reticolo endoplasmatico e nei mitocondri epatici, dove i salicilati sono metabolizzati ed escreti come acido salicilurico (75%), acido salicilico libero (10%) come glucuronide fenolico (10%) e glucuronide acilico (5%).

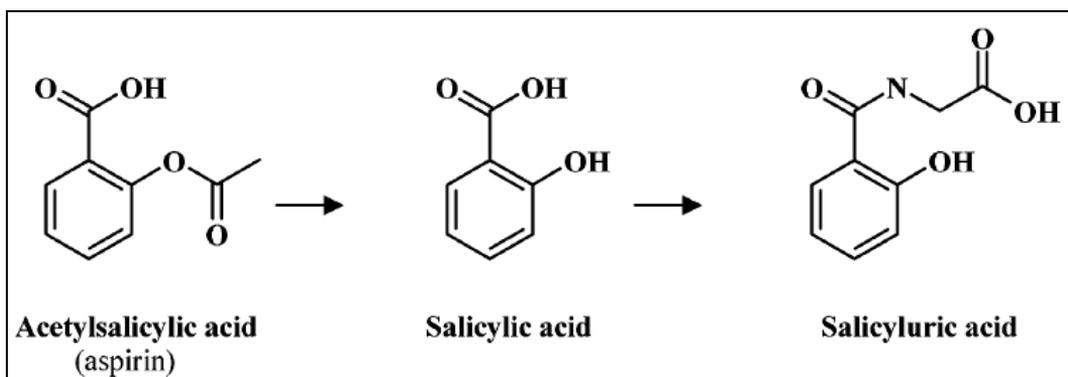


Figura 1.23 Struttura dell'acido acetilsalicilico, dell'acido salicilico e dell'acido salicilurico.

È stato recentemente dimostrato che in vivo l'aspirina ha un'azione antinfiammatoria e protettiva nei confronti del tumore al colon-retto. Queste proprietà terapeutiche sono dovute alla capacità di inibire la sintesi delle prostaglandine (PG), sintetizzate in diversi tessuti, soprattutto nel tratto gastrointestinale, nei bronchi, nell'utero, nel cervello e nel sistema cardiovascolare. Queste molecole hanno una vita brevissima (da qualche secondo a 3 minuti), ma rinnovandosi continuamente, influiscono su molte funzioni organiche, come la secrezione gastrica, la pressione arteriosa, l'aggregazione piastrinica e la permeabilità vascolare.

1.6.3.1 Effetto antinfiammatorio dell'aspirina

L'infiammazione è un meccanismo di difesa complesso, messo in atto dall'organismo a seguito di un danno tissutale causato da stimoli di natura biologica (microrganismi), chimica (veleni) o fisica (stimolazione meccanica, temperatura e irradiazioni). La risposta infiammatoria è caratterizzata da un incremento del flusso sanguigno e dalla comparsa di dolore ed arrossamento, conseguenze della liberazione di mediatori chimici (prostaglandine, istamina, bradikinina ed alcune interleukine) che favoriscono la vasodilazione e aumentano la permeabilità dei vasi ai leucociti.

La PGH-sintasi è un enzima bifunzionale, con attività ciclossigenasica e perossidasica. Il dominio con attività ciclossigenasica catalizza l'aggiunta di due molecole di ossigeno all'acido arachidonico, dando origine ad un serie di reazioni che terminano con la sintesi delle PGG₂, che sono in seguito ridotte a PGH₂ dal dominio con attività perossidasica dello stesso enzima.

Esistono due forme di ciclossigenasi, chiamate ciclossigenasi 1 (COX 1) e Ciclossigenasi 2 (COX 2). La COX 1 rappresenta l'isoforma costitutiva che si trova nella maggior parte delle cellule e dei tessuti ed è responsabile della sintesi di prostaglandine fondamentali per mantenere una corretta fisiologia. La COX 2 rappresenta la forma inducibile, prodotta occasionalmente nelle cellule coinvolte nella risposta infiammatoria o immunitaria.

L'aspirina, acetilando il residuo ossidrilico della Ser-530, blocca il legame tra l'acido arachidonico e le ciclossigenasi, inibizione irreversibile dell'attività dell'enzima. Questo determina una riduzione nella sintesi delle PGH₂. Quest'effetto inibitorio si realizza già a concentrazioni di Aspirina di 2-20 μM, ma sembra avere un'efficacia maggiore sulle COX-1.

1.6.3.2 Effetto antitrombotico

Le piastrine sono cellule anucleate, quindi, i loro enzimi non vanno in contro a turnover. Pertanto, l'inibizione delle COX-1 da parte dell'aspirina rimane tale fino a che queste cellule sono vitali, in genere per più di una settimana.

Mentre nelle piastrine è sintetizzato il trombossano A_2 , grazie alla trombossano sintasi, nelle cellule endoteliali la prostaciclina sintasi catalizza la sintesi della prostaciclina I_2 . Fortunatamente, nelle piastrine circolanti la sensibilità della COX-1 all'aspirina è maggiore rispetto a quella delle COX-2 endoteliali. Quindi, basse concentrazioni di aspirina inibiscono preferenzialmente la sintesi dei TXA_2 , un fattore che provoca aggregazione piastrinica e predispone alla trombosi, piuttosto che quella della PGI_2 , che inibisce l'aggregazione piastrinica e agisce da vasodilatatore.

La disfunzione endoteliale, che è alla base del processo aterosclerotico, è accompagnata da un'alterata produzione dell'endotelio di ossido nitrico (NO). I ridotti livelli di questa molecola favoriscono l'azione dei ROS, la vasocostrizione e l'adesione linfocitaria, aggravando lo stato aterosclerotico. Le cellule muscolari lisce giocano un ruolo importante nello sviluppo di questa patologia, migrando e proliferando nell'endotelio, con la formazione iniziale delle placche. Qui producono diversi componenti della matrice extracellulare, con reclutamento di cellule infiammatorie, quali i macrofagi. Anche le molecole di adesione ICAM-1 e VCAM-1 sono implicate nel processo aterosclerotico in quanto favoriscono l'adesione dei linfociti-T nelle cellule muscolari lisce. Per di più, le citochine infiammatorie IL-1 β e TNF α favoriscono l'overespressione dei fattori di adesione, attraverso l'attivazione di NF-kB.

In assenza di adeguati stimoli, NF-kB è localizzato nel citoplasma in forma inattiva, legato alla proteina I κ B. L'aspirina impedisce la fosforilazione di I κ B, una proteina che inibisce l'attività del recettore nucleare NF-kB. Questo farmaco previene, quindi, la degradazione di I κ B e mantiene inattivata NF-kB nelle cellule endoteliali. Attraverso questo silenziamento di NF-kB, l'aspirina riduce l'adesione dei macrofagi nelle cellule endoteliali ed in quelle muscolari lisce. Inoltre riduce anche l'espressione di ICAM-1 e VCAM-1 nelle stesse cellule.

Dalla letteratura emerge, infatti, che basse dosi di aspirina sono associate ad una riduzione significativa del rischio di sviluppare malattie cardiovascolari e di tutte le cause di morte.

1.7 Bibliografia

1. Szreter S.; Industrialization and Health. *British Medical Bulletin* **2004**, *69*, 75-86.
2. Amuna, P., Zotor, F. B.; Epidemiological and Nutrition transition in Developing Countries: Impact on Human Health and Development. *Proceedings of the Nutrition Society* **2008**, *67*, 82-90.
3. Chien, K. R.; Karsenty G.; Longevity and Lineages: Toward the Integrative Biology of Degenerative Diseases in Heart, Muscle, and Bone. *Cell*, **2005**, *120*, 533–544.
4. Mathers, C. D., Loncar, D; Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *PLoS Medicine* **2006**, *3 (11)*, 2011-2030.
5. Unwin, N., Alberti, K. G. M. M.; Chronic non-communicable diseases. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* **2006**, *100 (5-6)*, 455–464.
6. Tunstall-Pedoe, H.; Preventing Chronic Diseases. A Vital Investment: WHO Global Report. World Health Organization **2005**, 200.
7. J. N., Thompson; Fetal Nutrition and Adult Hypertension, Diabetes, Obesity, and Coronary Artery Disease. *Neonatal Network* **2007**, *26 (4)*, 235-240.
8. Gluckman, P. D., Cutfield, W., Hofman, P., Hanson, M. A.; The fetal, neonatal, and infant environments—the long-term consequences for disease risk. *Early Human Development* **2005**, *81*, 51-59.
9. Ko, G. T. C., Chan, J. C. N.; Burden of Obesity – lessons learnt from Hong Kong Chinese. *The International Association for the Study of Obesity* **2008**, *9 (1)*, 35–40.
10. Iyengar, V.; Shetty, P.; Application of nuclear techniques in the prevention of degenerative diseases (obesity and non-insulin dependent diseases) in ageing. *Current Science* **2002**, *83 (12)*, 1436.
11. Reaven G. M.; Role of Insulin Resistance in Human Disease. *Diabetes* **1988**, *37*, 1595-607.
12. Miranda, P. J., DeFronzo, R. A., Califf, R. M., Guyton, J. R.; Metabolic Syndrome: Definition, Pathophysiology, and Mechanisms. *American Heart Journal* **2005**, *149*, 33-45.

13. Alberti, K.G.M.M., Zimmet, P.Z.; Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation. *Diabetic Medicine*, **1998**, *15* (7), 539-553.
14. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III), *JAMA – Journal of the American Medical Association* **2001**, *285*(19), 2486-2497.
15. IDF - International Diabetes Federation. The IDF Consensus Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome. IDF **2006**, Belgio.
16. Weiss, R., Dziura, J., Burgert, T. S., Tamborlane, W. V., Taksali, S. E., Yeckel, C.W., Allen, K., Lopes, M., Savoye, M., Morrison, J., Sherwin, R. S., Caprio, S.; Obesity and the Metabolic Syndrome in Children and Adolescents. *The New England Journal of Medicine* **2004**, *350*, 2362.
17. Ho, S. C., Chen, Y. M., Woo, J. L. F., Leung, S. S. F., Lam, T. H., Janus, E. D.; Association Between Simple Anthropometric Indices and Cardiovascular Risk Factors. *International Journal of Obesity* **2001**, *25* (11), 1689-1697.
18. St-Onge, M., Janssen, P.; Metabolic Syndrome in Normal-Weight Americans. Definition of the Metabolically Obese, Normal-Weight Individuals. *Diabetes Care* **2004**, *27*, 222-228.
19. Hu, G., Qiao, Q., Tuomilehto, J., Balkau, B., Borch-Johnsen, K., Pyorala K.; Prevalence of the Metabolic Syndrome and its Relation to All-cause and Cardiovascular Mortality in Nondiabetic European Men and Women. *Archives of Internal Medicine* **2004**, *164* (10), 1066-1076.
20. Onat, A., Ceyhan, K., Basar, O., Erer, B., Toprak, S., Sansoy, V.; Metabolic Syndrome: Major Impact on Coronary Risk in a Population with Low Cholesterol Levels—A Prospective and Cross-Sectional Evaluation. *Atherosclerosis* **2002**, *165* (2), 285-292.
21. Azizi, F.; Prevalence of Metabolic Syndrome in an Urban Population: Tehran Lipid and Glucose Study. *Diabetes Research and Clinical Practice* **2003**, *61* (1), 29.

22. Gupta, A.; Prevalence of Diabetes, Impaired Fasting Glucose and Insulin Resistance Syndrome in an Urban Indian Population .*Diabetes Research and Clinical Practice* **2003**, *61* (1), 69.
23. Ozsahin, A. K., Gokcel A., Sezgin N., Akbaba M., Guvener, N., Ozisik, L., Karademir, B. M.; Prevalence of the Metabolic Syndrome in a Turkish Adult Population. *Diabetes, Nutrition and Metabolism* **2004**, *17* (4), 230-234.
24. Ramachandran, A.; Metabolic Syndrome in Urban Asian Indian Adults—a Population Study Using Modified ATP III Criteria. *Diabetes Research and Clinical Practice* **2003**, *60* (3), 199.
25. Cook, S., Weitzman, M., Auinger, P., Nguyen, M., Dietz, W. H.; Prevalence of a Metabolic Syndrome Phenotype in Adolescents: Findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988 – 1994. *Archives of Pediatric and Adolescent Medicine* **2003**, *157*:821-827.
26. Tillin, T., Forouhi, N., Johnston, D. G., McKeigue, P. M., Chaturvedi, N., Godsland, I. F.; Metabolic Syndrome and Coronary Heart Disease in South Asians, African-Caribbeans and White Europeans: a UK Population-Based Cross-Sectional Study. *Diabetologia* **2005**, *48*, 649–656.
27. Miccoli, R., Bianchi, C., Odoguardi, L., Penno, G., Caricato, F., Giovannitti, M., Pucci, L., Del Prato, S.; Prevalence of the Metabolic Syndrome Among Italian Adults According to ATP III Definition. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* **2007**, *15* (4), 250-254.
28. McKeown, N.M., Meigs, J.B., Liu, S., Saltzman, E.S., Wilson, P.W., & Jacques, P.F.; Carbohydrate Nutrition, Insulin Resistance, and the Prevalence of the Metabolic Syndrome in the Framingham Offspring Cohort. *Diabetes Care*, **2004**, *27*(2), 538-546.
29. Rennie, K. L., McCarthy, N.; Yazdgerdi, S., Marmot, M.; Brunner, E.; Association of the Metabolic Syndrome with Both Vigorous and Moderate Physical Activity Cardiovascular Disease. *International Journal of Epidemiology* **2003**, *32* (4), 600-606.
30. Kelley, D. E., Mandarino, L. J.; Fuel Selection in Human Skeletal Muscle in Insulin Resistance: a Reexamination. *Diabetes* **2000**, *49*, 677-683.

31. Ginsberg, H. N.; Insulin Resistance and Cardiovascular Disease. *Journal of Clinical Investigation* **2000**, *106*(5), 629-631.
32. Bamba, V., Rader, D. J.; Obesity and Atherogenic Dyslipidemia. *Gastroenterology* **2007**, *132*, 2181–2190.
33. Ferrannini, E., Natali, A., Capaldo, B., Lehtovirta, M., Jacob, S., Yki-Järvinen, H.; Insulin Resistance, Hyperinsulinemia, and Blood Pressure: Role of Age and Obesity. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Hypertension* **1997**, *30*, 1144–1149.
34. Meigs, J. B., Larson, M. G., Fox, C. S., Keaney, J. F. Jr, Vasan, R. S., Benjamin, E. J.; Association of Oxidative Stress, Insulin Resistance, and Diabetes Risk Phenotypes: the Framingham Offspring Study. *Diabetes Care* **2007**, *30*, 2529–2535.
35. Goodfriend, T. L., Egan, B. M., Kelley, D. E.; Aldosterone in Obesity. *Endocrinology Research* **1998**, *24*, 789–796.
36. Sechi, L. A.; Mechanisms of Insulin Resistance in Rat Models of Hypertension and Their Relationships with Salt Sensitivity. *Journal of Hypertension* **1999**, *17*, 1229–1237.
37. Grassi, G., Dell'Oro, R., Facchini, A., Quarti Trevano, F., Bolla, G. B., Mancia G.; Effect of Central and Peripheral Body Fat Distribution on Sympathetic and Baroreflex Function in Obese Normotensives. *Journal of Hypertension* **2004**, *22*, 2363–2369.
38. Grassi, G., Seravalle, G., Cattaneo, B. M., Bolla, G. B., Lanfranchi, A., Colombo, M., Giannattasio, C., Brunani, A., Cavagnini, F., Mancia, G.; Sympathetic Activation in Obese Normotensive Subjects. *Hypertension* **1995**, *25*, 560–563.
39. Engeli, S., Gorzelnik, K., Kreutz, R., Runkel, N., Distler, A., Sharma, A. M.; Co-Expression of Renin-Angiotensin System Genes in Human Adipose Tissue. *Journal of Hypertension* **1999**, *17*, 555–560.
40. Grassi, G.; Renin-Angiotensin-Sympathetic Crosstalks in Hypertension: Reappraising the Relevance of Peripheral Interactions. *Journal of Hypertension* **2001**, *19*, 1713–1716.
41. Shoelson, S. E., Herrero, L., Naaz, A.; Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance. *Gastroenterology* **2007**, *132*, 2169–2180.

42. Weisberg, S. P., Hunter, D., Huber, R., Lemieux, J., Slaymaker, S., Vaddi, K., Charo, I., Leibel, R. L., Ferrante, A. W.; CCR2 Modulates Inflammatory and Metabolic Effects of High-Fat Feeding. *Journal of Clinical Investigation* **2006**, *116* (1), 115–124.
43. Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J. S., Tartaglia, L. A., Chen, H.; Chronic Inflammation in Fat Plays a Crucial Role in the Development of Obesity-Related Insulin Resistance. *Journal of Clinical Investigation* **2003**, *112* (12), 1821–1830.
44. Tilg, H., Moschen, A.R.; Adipocytokines: Mediators Linking Adipose Tissue, Inflammation and Immunity. *Immunology* **2006**, *6*, 772- 783.
45. Hoene, M., Weigert, C.; The Role of Interleukin-6 in Insulin Resistance, Body Fat Distribution and Energy Balance. *The International Association for the Study of Obesity* **2007**, 1-6.
46. Sengenès, C., Miranville, A., Lolmède, K., Curat, C. A., Bouloumié, A.; The Role of Endothelial Cells in Inflamed Adipose Tissue. *Journal of Internal Medicine* **2007**, *262*, 415-421.
47. Bazzano, L. A., He, J.; Fruit and Vegetable Intake and Risk of Cardiovascular Disease in US adults: the First National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-Up Study. *The American Journal of Clinical Nutrition* **2002**, *76*, 93-99.
48. Van de Vijver, M., Van't Veer, L.; A gene-expression Signature as a Predictor of Survival in Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine* **2002**, *25*, 1999.
49. Dauchet, L., Amouyel, P., Hercberg, S., Dallongeville, J.; Fruit and Vegetable Consumption and Risk of Coronary Heart Disease: A Meta-Analysis of Cohort Studies. *The Journal of Nutrition, Nutritional Epidemiology* **2006**, 2588-2593.
50. He, F. J., Nowson, C. A., Lucas, M., MacGregor, G. A.; Increased Consumption of Fruit and Vegetables is Related to a Reduced Risk of Coronary Heart Disease: Meta-Analysis of Cohort Studies. *Journal of Human Hypertension* **2007**, *21*, 717–728.
51. Tucker, K. L., Hallfrisch, J., Qiao, N., Muller, D., Andres, R., Fleg, J. L.; The Combination of High Fruit and Vegetable and Low Saturated Fat Intakes Is More Protective Against Mortality in Aging Men Than Is Either Alone: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *The Journal of Nutrition* **2005**, *135*, 556–561.

52. Hu, F. B., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Ascherio, A., Spiegelman, D., Willett, W. C.; Prospective Study of Major Dietary Patterns and Risk of Coronary Heart Disease in Men. *The American Journal of Clinical Nutrition* **2000**, *72*, 912–921.
53. Fung, T. T., Willett, W. C., Stampfer, M. J., Manson, J. E., Hu, F. B.; Dietary Patterns and The Risk of Coronary Heart Disease in Women. *Archives of Internal Medicine* **2001**, *161*, 1857–1862.
54. Hu F. B., Stampfer, M. J., Manson, J. E., Ascherio, A., Colditz, G. A., Speizer, F. E., Hennekens, C. H., Willett, W. C.; Dietary saturated fats and their food sources in relation to the risk of coronary heart disease in women. *The American Journal of Clinical Nutrition* **1999**, *70* (6), 1001–1008.
55. Riboli, E., Norat, T.; Epidemiologic Evidence of The Protective Effect of Fruit and Vegetables on Cancer Risk. *The American Journal of Clinical Nutrition* **2003**, *78*, :559S–569S.
56. Riccioni, G., Bucciarelli, T., Mancini, B., Corradi, F., Di Ilio, C., Mattei, P. A., D’Orazio, N.; Antioxidant Vitamin Supplementation in Cardiovascular Diseases. *Annals of Clinical and Laboratory Science* **2007**, *37* (1), 89-95.
57. Greenwald, P., Anderson, D., Nelson, S. A., Taylor, P. R.; Clinical Trials of Vitamin and Mineral Supplements for Cancer Prevention. *The American Journal of Clinical Nutrition* **2007**, *85*, 314S-317S.
58. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L.; Polyphenols: Food Sources and Bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* **2004**, *79*, 727–747.
59. Sri Balasubashini, M., Rukkumani, R., Viswanathan, P., Menon, V. P.; Ferulic Acid Alleviates Lipid Peroxidation in Diabetic Rats. *Phytoterapy Research* **2004**, *18* (4), 310-314.
60. Jacobs, D.; Pereira, M.; Slavin, J.; Marquart, L. Defining the Impact of fWhole-Grain Intake on Chronic Disease. *Cereal Foods World* **2000**, *45* (2), 51-53.
61. Jacobs, D. R.; Marquart, L.; Slavin, J. L.; Kushi, L. H. Wholegrain Intake and Cancer: an Expanded Review and Meta-Analysis. *Nutrition and Cancer* **1998**, *30*, 85-96.

62. Garcia-Conesa, M. T.; Plumb, G. W.; Waldron, K. W.; Ralph, J.; Williamson, G. Ferulic Acid Dehydrodimers From Wheat Bran: Isolation, Purification and Antioxidant Properties of 8-O-4-Diferulic Acid. *Redox Report* **1997**, *3*, 319-323.
63. Raskin, I., Skubatz, H., Tang, W., Meeuse, B. J. D.; Salicylic Acid Levels in Thermogenic and Non-Thermogenic Plants. *Annals of Botany* **1990**.
64. León, J., Lawton, M. A., Raskin, I.; Hydrogen Peroxide Stimulates Salicylic Acid Biosynthesis in Tobacco. *Plant Physiology* **1995**, *108*, 1673-1678.
65. Alibert, G., Ranjeva, R.; Recherches sur les Enzymes Catalysant la Biosynthese des Acides Phenoliques Chez *Quercus pedunculata* (Ehrn): I – Formation des Series Cinnamique et Benzoique. *FEBS - Federation of European Biochemical Societies Letters* **1971**, *19*, 11-14.
66. Alibert, G., Ranjeva, R.; Recherches sur les Enzymes Catalysant la Biosyntheses des Acid Phenoliques chez *Quercus pedunculata* (Ehrn): II- Localization Intercellulaire de la Phenylalanin Mmonique-lyase, de la Cinnamate 4-Hydroxylase, et de la “Benzoate Synthase”. *BBA - Biochimica et Biophysica Acta* **1972**, *279*, 282-289.
67. Ibrahim, R. K., Towers, G. H. N.; Conversion of Salicylic Acid to Gentisic Acid and o-Pyrocatechuic Acid, All Labeled with Carbon-14, in Plants. *Nature* **1959**, *184*, 1803.
68. Griffiths, L. A.; On the distribution of gentisic acid in green plant. *Journa of Experimental Botany* **1959**, *10*, 437-442.
69. Lee, T. T., and Skoog, F.; Effect of Substituted Phenols on Bud Formation and Growth of Tobacco Tissue Culture. *Plant Physiology* **1965**, *18*, 386-402.
70. Popova, L., Pancheva, T., Uzunova, A.; Salicylic acid : Properties, Biosynthesis and Physiological Role. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* **1997**, *23*, 85-93.
71. Aristeo-Cortés, P.; Reguladores de crecimiento XIV: Efectos del Ácido Salicílico y Dimetilsulfóxido en el Crecimiento de Zanahoria, Betabel y Rábano. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias UNAM, **1998** México.
72. Herrera-Tuz, R.; Reguladores de Crecimiento XXI. Efecto del Ácido Salicílico en la Productividad de Papaya Maradol (*Carica papaya* L.). Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico Agropecuario, **2004** Conkal, Yucatán, México.

73. Martin-Mex, R., Nesticapan-Garcés, A., Larqué-Saavedra, A.; . Effect of Salicylic Acid in Sex Expression in *Carica Papaya* L. 10th International Symposium on Plant Biorregulators in Fruit Production. June 26-30 de **2005**. Saltillo, Coahuila, México. p. 113.
74. Venema, D. P., Hollman, P. C. H., Janssen, K. P. L. T. M, Katan, M. B.; Determination of Acetylsalicylic Acid and Salicylic Acid in Foods, \$Using HPLC with Fluorescence Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1996**, *44*, 1762-1767.
75. Swain, A. R., Dutton, S. P., Truswell, A. S.;. Salicylates in Foods. *Journal of the American Dietetic Association* **1985**, *85*(8), 950-60.
76. Herrmann, K.; Occurence and Content of Hydroxycinnamic and Hydroxybenzoic Compounds in Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **1989**, *28*, 4315-4347.
77. Robertson, G. L.; Kermode, W. J. Salicylic Acid in Fresh and Canned Fruit and Vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1981**, *32*, 833-836.

2 Obiettivo della tesi

Evidenze scientifiche mostrano che il consumo di frutta e verdura svolge un ruolo protettivo nei confronti delle malattie cronico-degenerative, ed in particolare delle patologie cardiovascolari e di alcune forme tumorali. Questi alimenti che contraddistinguono anche il modello mediterraneo garantiscono l'apporto di numerosi composti bioattivi, quali vitamine, minerali, composti fenolici e fibra, in grado di ottimizzare molteplici funzioni fisiologiche dell'organismo. Sulla base del ruolo protettivo che è stato dimostrato sia *in vivo* sia *in vitro*, resta da definire quanto queste molecole siano biodisponibili ed a quali concentrazioni si ritrovino in circolo. Per ottenere queste informazioni è necessario disporre di metodiche semplici, sensibili e altamente selettive per quantificarne le concentrazioni, talvolta molto basse, nei presenti fluidi biologici.

Scopi del presente studio sono stati:

1. Sviluppare e validare una nuova metodica analitica in grado di quantificare gli acidi salicilico e ferulico nel sangue umano. Per poter disporre di una metodica altamente sensibile e specifica, adeguata a quantificare questi composti alle concentrazioni in cui sono presenti nel siero, tale metodo utilizza la gas-cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa impiegando opportuni standard interni marcati con deuteri.
2. Studiare il ruolo che gli acidi salicilico e ferulico presenti nella frutta possono svolgere quando questa viene somministrata ad un gruppo di volontari sani, soffermandoci in particolare sulle loro potenzialità antinfiammatorie.
3. Valutare se le concentrazioni ematiche degli acidi salicilico e ferulico, due biocomposti presenti in frutta, verdura e cereali integrali variano in funzione del pattern di mediterraneità della dieta, prendendo come termine di paragone la Vitamina C. È stata inoltre indagata l'influenza del livello di aderenza alla dieta mediterranea sullo stato infiammatorio dell'organismo umano. Infine è stato studiato se i livelli plasmatici di acido

salicilico, acido ferulico e di vitamina C possono rappresentare dei predittori di mediterraneità della dieta e dello stato di nutrizione dei soggetti analizzati.

3 Materiali e metodi

3.1 Messa a punto e validazione della metodica analitica

La messa a punto e la validazione del metodo analitico oggetto di studio sono state portate a termine nei laboratori del Centro internazionale per lo Studio della Composizione Corporea (ICANS) e della Sezione di Nutrizione del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche dell'Università degli Studi di Milano.

Tale metodica prevede un'estrazione liquido-liquido del siero con etilacetato ed etere, a cui sono stati aggiunti gli standard interni deuterati (d3-FA, d4-SA), dopo opportuna deproteinizzazione con acetonitrile e idrolisi enzimatica con β -glucuronidasi a 37°C per un'ora. L'estratto organico così ottenuto è portato a secco in corrente d'azoto a 70°C e derivatizzato con 50 μ L di una soluzione (1:1) di ACN: BSFTA+TMCS1% a 70°C per un'ora. Segue l'iniezione in GC-MS-EI-SIM (Figura 3.1).

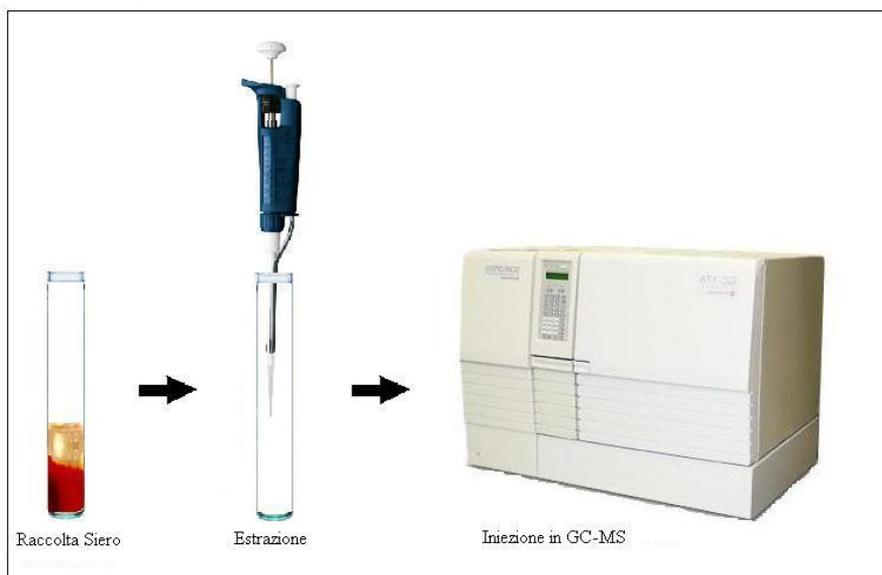


Figura 3.1 Diagramma illustrato del metodo

3.1.1 Preparazione delle aliquote di siero

Il siero impiegato per l'analisi è stato ottenuto lasciando coagulare il sangue per 30 minuti a temperatura ambiente. Il sangue coagulato è stato poi centrifugato a 3500 rpm per 10 minuti a 5 °C. Le aliquote di siero così ottenute sono state stoccate in provette Eppendorf da 1,5 mL e, dopo opportuna codifica, conservate in freezer a -80°C.

3.1.2 Preparazione delle soluzioni standard

Durante l'analisi sono state utilizzate aliquote di standard di FA e SA in soluzione acquosa (acqua milliQ) a diversa concentrazione. Queste sono state ottenute per diluizioni successive di soluzioni madri di FA (ferulic acid, Sigma Ultra 99%, F-3500, Germany) e SA (salicylic acid, Sigma Ultra 99%, S-5922, Germany) a concentrazione di 1 mg/mL in MeOH.

Le aliquote degli standard interni d3-FA e d4-SA in soluzione acquosa (acqua milliQ) a diversa concentrazione sono state preparate sempre per diluizioni successive di soluzioni madri di d3-FA (99% atom %D, CDN isotopes, D-6669, Canada) e d4-SA (98,7% atom % D, CDN isotopes, D-1156, Canada) a concentrazione di 1 mg/mL in MeOH.

3.1.3 Preparazione dei campioni e Iniezione dell'estratto in GC-MS

- In eppendorf da 1,5 mL sono stati prelevati:

Tabella 3.1 Schema di preparazione dei campioni

Siero	Bianco	Standard
<ul style="list-style-type: none"> • 200µL di siero 	<ul style="list-style-type: none"> • 200µL di acqua milliQ 	<ul style="list-style-type: none"> • 200µL di soluzioni standard di FA e SA (5,10,15,20,40 ng)
<ul style="list-style-type: none"> • 20µL d4-SA 500 ng/mL 	<ul style="list-style-type: none"> • 20µL d4-SA 500 ng/mL 	<ul style="list-style-type: none"> • 20µL d4-SA 500 ng/mL
<ul style="list-style-type: none"> • 40µL d3FA 500 ng/mL 	<ul style="list-style-type: none"> • 40µL d3FA 500 ng/mL 	<ul style="list-style-type: none"> • 40µL d3FA 500 ng/mL

- Sono stati deproteinizzati aggiungendo 300µL di Acetonitrile
- Sono stati centrifugati a 15000 RPM per 5 minuti a 5°C
- È stato recuperato il surnatante in una provetta di pirex da 10 mL

- Sono state preparate delle aliquote utilizzando le soluzioni degli standard e degli standard interni secondo le concentrazioni indicate in tabella
- È stato aggiunto 1 mL di tampone citrato a pH 5
- Sono stati aggiunti 50 μ L di enzima β -glucuronidasi (50 unità, Type H-5 from *Helix pomatia*, CAS 9001-45-0, EC 3.2.1.31, Sigma)
- È stata effettuata un'idrolisi enzimatica a 37°C per un'ora
- Sono stati aggiunti 200 μ L di HCl 6N
- Sono stati aggiunti 500 mg di cloruro di sodio
- Estrazione liquido-liquido:
 - Sono stati aggiunti 3 mL di etilacetato,
 - sono stati agiti per 3 minuti,
 - Sono stati centrifugati a 2500 RPM per 5 minuti,
 - È stato recuperato il surnatante in una provetta in pirex.
 - Sono stati aggiunti 3 mL di etere etilico, sono stati agiti per 3 minuti,
 - Sono stati centrifugati a 2500 RPM per 5 minuti,
 - È stato recuperato il surnatante in una provetta in pirex.
 - Sono stati aggiunti 3 mL di etilacetato, sono stati agiti per 3 minuti,
 - Sono stati centrifugati a 2500 RPM per 5 minuti, è stato recuperato il surnatante in una provetta in pirex.
- il surnatante è stato portato a secco a 70°C in corrente d'azoto

- Sono stati derivatizzati con 50 μ L di una soluzione (1:1) di ACN: BSFTA+TMCS1% a 70°C per un'ora.
- È stato iniettato 1 μ L di campione prelevato utilizzando una siringa Hamilton da 10 μ L.

3.2 effetto di un pasto a base di frutta sulle concentrazioni ematiche degli acidi salicilico e ferulico e sulle risposte metaboliche e infiammatorie in soggetti sani

3.2.1 Soggetti

Ventisei volontari sani, 13 maschi e 13 femmine, con età media di $23,25 \pm 0,50$ anni e indice di massa corporea medio di $23,36 \pm 0,59$ kg/m², sono stati reclutati tra gli studenti dell'Università degli Studi di Milano attraverso l'affissione di manifesti. Ciascuno di essi è stato sottoposto ad una visita medica al fine di accertarne lo stato di salute, di nutrizione, e di valutarne la composizione corporea. I criteri di esclusione adottati includevano: il fumo, l'assunzione di alcol, il vegetarianismo, l'assunzione di integratori alimentari, le terapie farmacologiche in atto, la presenza di malattie cronico-degenerative, di quelle infiammatorie e di disordini metabolici.

Il presente studio è stato condotto secondo le linee guida stabilite dalla Dichiarazione di Helsinki. L'approvazione dal Comitato Etico è stata ottenuta e tutti i soggetti hanno firmato il consenso informato.

3.2.2 Disegno sperimentale

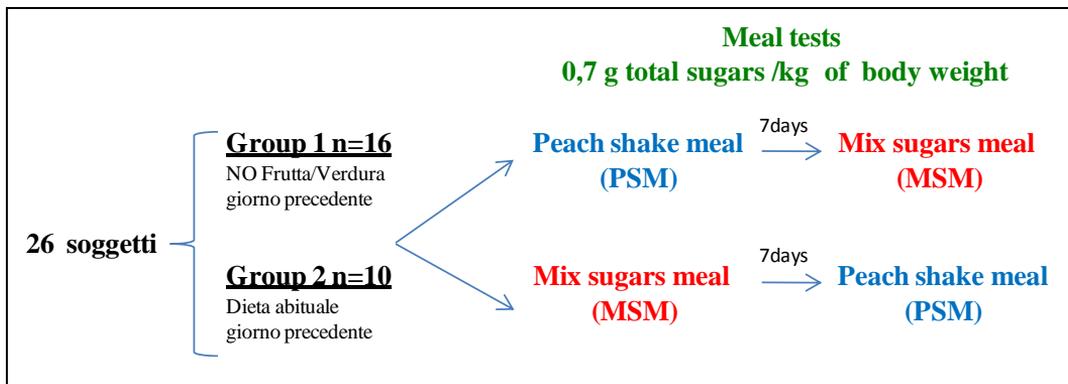


Figura 3.2 Disegno sperimentale

In figura 3.2 è mostrato il disegno sperimentale: in uno studio randomizzato, crossover, con un periodo di wash-out di una settimana, ciascun soggetto, a digiuno da almeno 12 ore, ha ricevuto due pasti: un omogeneizzato di pesca fresca (PSM) e una soluzione acquosa (MSM) con la stessa composizione quali-quantitativa di zuccheri della pesca. Le quantità di PSM e MSM somministrate sono state calcolate in modo da fornire 0,71 g di zuccheri totali (Σ glucosio, fruttosio e saccarosio) per chilogrammo di peso corporeo.

Dal momento che i composti fenolici hanno una emivita di diverse ore, per meglio comparare il reale contributo che un pasto di frutta possa fornire ai livelli circolanti dei composti fenolici SA e FA, 16 volontari (Gruppo 1: 8 maschi, 8 femmine) si sono astenuti dal consumo di frutta e verdura il giorno precedente gli esperimenti; i restanti 10 volontari (Gruppo 2: 5 maschi, 5 femmine) hanno mantenuto la loro dieta abituale. Campioni di sangue venoso sono stati raccolti dopo aver posizionato un ago cannula nella vena antecubitale di ciascun volontario, prima del consumo pasto e dopo 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 minuti. Durante ciascun esperimento i soggetti si sono astenuti dal consumo di cibo. Le aliquote di sangue raccolte in provette Eppendorf sono state conservate a -80°C fino al momento dell'analisi.

3.2.3 Valutazione dello stato di nutrizione

I volontari sono stati interrogati per ricostruire la loro anamnesi patologica prossimale e remota, farmacologica cronica ed in atto.

3.2.3.1 Valutazione della composizione corporea

Per indagare la composizione corporea dei soggetti ci si è avvalsi delle misurazioni antropometriche e dell'ecografia addominale.

Le misurazioni antropometriche effettuate in questo studio sono state:

- peso e altezza: sono stati misurati con una bilancia a pesi mobili dotata di statimetro (SECA 711, Hamburg, Germany). Il soggetto, con biancheria intima, è stato collocato in posizione eretta, con il dorso ed i talloni aderenti al piano verticale e le punte dei piedi leggermente divaricate. Il capo è stato posto in modo tale da mantenere orizzontale la linea di visione. Al fine di rendere confrontabile il peso tra gruppi di individui sono stati elaborati diversi indici peso/altezza. Il più utilizzato è il Body Mass Index (BMI):

$$\frac{\text{Peso}(kg)}{[\text{altezza}(m)]^2}$$

Tabella 3.2 Classificazione dell'indice di massa corporea

BMI (kg/m²)	CATEGORIA
<18,5	Sottopeso
18,5-25	Normopeso
25-30	Sovrappeso
30-35	Obesità di 1° grado
35-40	Obesità di 2° grado
>40	Obesità di 3° grado

- pliche cutanee: sono state misurate impiegando un plicometro (Holtain LTD), secondo le procedure standardizzate proposte dall'OMS, al fine di valutare la percentuale di massa grassa (FM) e di massa magra (FFM) mediante la rilevazione dello spessore doppio dell'epidermide, della fascia sottostante e del tessuto adiposo sottocutaneo. Applicando l'equazione di Durnig e Womersley è stata determinata la percentuale di FM e di FFM. I valori di riferimento per la massa grassa sono pari al 15-18% per gli uomini e 20-25% per le donne. In particolare sono state rilevate:
 - Plica bicipitale e tricipitale: misurate rispettivamente sul lato anteriore e posteriore del braccio in corrispondenza del punto medio tra l'acromion e l'olecrano (Figura 3.3).

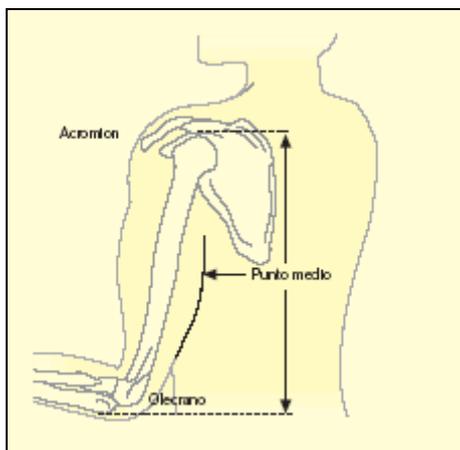


Figura 3.3 Plica tricipitale

- •Plica sovrailiaca: misurata in corrispondenza del punto medio tra l'ultima costola e la spina iliaca (figura 3.4).

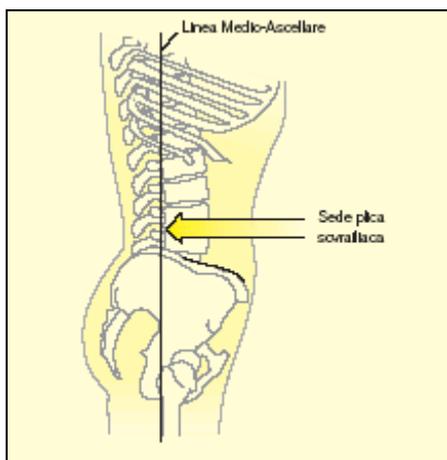


Figura 3.4 Plica sovrailiaca

- •Plica sottoscapolare: misurata al di sotto della punta inferiore della scapola, a 45° circa rispetto la verticale, ponendo il braccio dietro la schiena.

- circonferenza vita: è stata misurata con nastro metrico flessibile e anelastico, secondo le procedure standardizzate proposte dall'Ufficio Europeo dell'OMS. La misura è stata rilevata sul soggetto in posizione eretta, con l'addome rilassato, le braccia pendenti ai lati del corpo ed i piedi uniti, in corrispondenza del punto medio tra l'ultima costola e la spina iliaca.

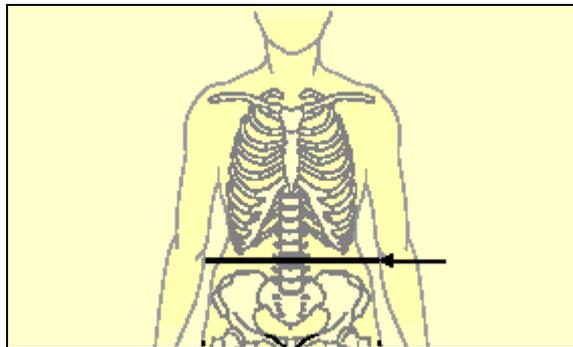


Figura 3.5 Misurazione circonferenza vita

L'ecografia è stata effettuata con ecografo TOSHIBA, modello SSA-220A, in tre diversi punti dell'addome per determinare il grasso sottocutaneo, viscerale e preepatico.

3.2.4 Analisi del frutto

Nel presente lavoro, i campioni erano costituiti da esemplari di *Prunus persica laevis*, comunemente definita pesca noce o nettarina, che si caratterizza per essere una pesca glabra da consumo fresco.

In particolare, il fenotipo considerato è stato lo Stony Hard e la varietà Big Top. I campioni sono stati conservati a T di -80°C dalla raccolta fino al momento dell'utilizzo.

3.2.4.1 Umidità

L'umidità è stata valutata mediante la perdita di peso del campione per essiccamento in stufa sottovuoto a 60°C:

$$Umidità\% = \frac{(p_1 - p_3)}{(p_2 - p_1)};$$

- p_1 : taratura del crogiolo posto a 105 °C per 30 minuti, raffreddato in essiccatore e pesato con bilancia analitica (Mettler AE 200, capacità 205 g, accuratezza 0,1 mg).
- p_2 : peso del campione (5 g) nel crogiolo tarato.
- p_3 : peso crogiolo dopo essiccamento di una notte in stufa a 60 °C sottovuoto.

3.2.4.2 Ceneri

Le sostanze minerali sono state determinate mediante incenerimento a 550°C per 6 ore, secondo il metodo AOAC 940.26:

$$Ceneri\% = \frac{(p_3 - p_2)}{p_1} * 100;$$

- p_1 : peso crogiolo dopo incenerimento in muffola a 550°C per 6 ore.
- P_2 : taratura del crogiolo calcinato in muffola a 550°C per un'ora e raffreddato nell'essiccatore.
- p_3 : peso del campione nel crogiolo tarato.

3.2.4.3 Proteine totali

La determinazione quantitativa delle proteine è stata eseguita sulla base del contenuto di azoto del campione che è stato convertito in solfato d'ammonio, secondo il metodo Kjeldahl previsto dal protocollo AOAC 920.152.

3.2.4.4 Determinazione degli zuccheri solubili

Gli zuccheri solubili, glucosio, fruttosio, saccarosio e galattosio, sono stati determinati mediante estrazione a caldo e successiva analisi con HPLC, secondo il metodo messo a punto da Brighenti et al. [1]. Il metodo prevede la preparazione di una sospensione in acqua distillata di 1 g di campione che è messa in bagno termostato a 60°C per 30 minuti. I campioni sono lasciati a raffreddare a temperatura ambiente per altri 30 minuti e poi portati a 200 mL di volume. La sospensione ottenuta è filtrata su carta filtro. Un'aliquota del filtrato, in seguito purificata su filtro Whatman 0,45 µm e su cartuccia C18, è opportunamente diluita per la determinazione quantitativa con HPLC.

Condizioni sperimentali per l'analisi in HPLC:

- Colonna: CarboPac PA1 analytical column (4 x 250 mm). Dionex, cat n° 035391.

- Precolonna: CarboPac PA1 Guard column (4 x 50 mm). Dionex, cat n° 043096.
- Eluente: NaOH 160 mM.
- Flusso: 1 mL/min
- Rivelatore Pulsed Amperometric Detector, Dionex.
- Inject Volume: 20 μ L.
- Tempo di ritenzione: 15 minuti.
- Pompa: isocratica, Spectra System P1000, Thermo Separation Product

Per calcolare la concentrazione dei quattro monosaccaridi nel campione è stato adottato il metodo della retta di taratura, che è stata costruita analizzando soluzioni a concentrazioni note degli standard (range 0,5-10 ppm) nelle stesse condizioni sperimentali del campione. Riportando in grafico le concentrazioni (asse x) e le aree dei picchi ottenute (asse y), è stata costruita la migliore retta passante per i punti, con il metodo della regressione lineare dei minimi quadrati. Per interpolazione del valore dell'area del campione con la retta di taratura, è stato calcolato il suo contenuto di zuccheri solubili.

3.2.4.5 Fibra totale, solubile ed insolubile

La determinazione della fibra solubile e insolubile è stata compiuta seguendo il metodo enzimatico-gravimetrico Prosky, protocollo AOAC 991.43.

Il metodo prevede la digestione enzimatica di 1 g di campione essiccato, pesato in quadruplo, con α -amilasi (E. C. 3.2.1.1, Sigma A-3176), proteasi (E. C. 232-752-2, Sigma P-5308) e amiloglicosidasi (E. C. 232-877-2, Sigma A-9931). In parallelo è stata eseguita la stessa determinazione su due bianchi.

La soluzione digerita è filtrata sottovuoto su crogiolo con setto poroso, precedentemente tarato. Il residuo trattenuto sul setto del crogiolo contiene la frazione di fibra insolubile. Al filtrato, contenente la frazione solubile, sono aggiunti 4 volumi di etanolo al 96% ed è lasciato a decantare per un'ora a temperatura ambiente, dopodiché la soluzione è filtrata su crogiolo tarato.

I residui di fibra solubile e insolubile sono lavati con etanolo al 96% e acetone e poi essiccati in stufa a 100 °C per una notte e poi pesati.

Per ogni coppia di residui, su uno sono determinate le proteine secondo il metodo Kjeldahl, e sull'altro le ceneri, incubando il crogiolo in muffola a 550 °C per una notte.

Il contenuto percentuale di fibra, sia per la frazione solubile sia per quella insolubile, è determinato sottraendo al peso del residuo corrispondente la quantità di proteine e di ceneri e il contributo del bianco secondo la seguente formula:

$$Fibra = \frac{\left(\frac{R_1 + R_2}{2} - P - CEN - B \right) * 100}{\left(\frac{M_1 + M_2}{2} \right) * 1000};$$

Dove:

- R_1 : residuo in mg del crogiolo su cui sono state quantificate le proteine.
- R_2 : residuo in mg del crogiolo su cui sono state misurate le ceneri.
- P : proteine del campione in mg.
- CEN : ceneri del campione in mg.

- $\frac{(M_1 + M_2)}{2}$: media dei pesi dei campioni in g.
- B: bianco

Il bianco è stato ricavato da:

$$Bianco = \left(\frac{R_{B1} + R_{B2}}{2} \right) - P_B - CEN_B;$$

Dove:

- R_1 : residuo in mg del crogiolo su cui sono state quantificate le proteine.
- R_2 : residuo in mg del crogiolo su cui sono state misurate le ceneri.
- P_B : proteine del bianco in mg.
- CEN_B : ceneri del bianco in mg.

3.2.4.6 Polifenoli totali

La determinazione dei composti fenolici nelle pesche è stata eseguita applicando la metodica messa a punto da Scalbet et al. [2].

Per la quantificazione, sono state sfruttate proprietà riducenti dei composti fenolici, ossidati dal reattivo di Folin Ciocalteu. Il reattivo è una combinazione di acido fosfotungstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e acido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) che si riduce in una miscela di ossidi blu di tungsteno e molibdeno (W_8O_{23} e Mo_8O_{23}). La colorazione blu ottenuta ha un massimo assorbimento nel visibile ad una lunghezza d'onda di 760 nm e l'assorbanza letta è direttamente proporzionale al contenuto di polifenoli totali nel campione.

L'estrazione dei polifenoli totali dal campione è stata messa a punto nel laboratorio della sezione di Nutrizione del DISTAM, a partire dai metodi di [3] e di Vinson J. A. et al. [4].

1. Pesare 5g di campione in provettoni da 100 mL e aggiungere 50 mL di soluzione estraente (MeOH:HCl 2,4 N in proporzione 1:1).
2. Omogeneizzare con Ultra-Turrax per un minuto.
3. Porre nel bagno termostato a 90 °C per 3 ore al buio, agitando ogni 30 minuti.
4. Centrifugare per 10 minuti a 3000 rpm.
5. Filtrare su un filtro di carta recuperando il filtrato in un pallone.
6. Lavare i provettoni con 25 mL di soluzione al 35% di MeOH, 35% di acetone e 30% di HCl 1 N, lasciare agire per 10 minuti e filtrare nello stesso pallone.
7. Portare a piccolo volume con il Rotavapor.
8. Recuperare l'estratto e portarlo a volume in un matraccio da 25 mL con acqua distillata.
9. Filtrare la soluzione su filtri per siringhe Whitman 0,45 µg raccogliendo il filtrato in provette.
10. Purificare l'estratto ottenuto con cartucce C-18 SPE:
 - a. Attivare la cartuccia con 2 ML di MeOH seguiti da 4 mL di acqua distillata.
 - b. Passare 1 mL di estratto attraverso la cartuccia, scartando il filtrato.
 - c. Lavare la C-18 con 4 mL di acqua distillata, scartando il filtrato.

- d. Lavare la cartuccia in due passaggi usando 2 mL di MeOH ogni volta, raccogliendo la soluzione in un pallone.
- e. Portare a secco con il Rotavapor.
- f. Aggiungere all'estratto secco 2 mL di acqua distillata e agitare con il Vortex per circa 2 minuti.

11. L'estratto così ottenuto è pronto per la lettura spettrofotometrica:

- a. Prelevare 0,5 mL di estratto e aggiungere nel seguente ordine: 2,5 mL di reattivo di Folin-Ciocalteu diluito 1:10 con acqua distillata e 2 mL Na_2CO_3 , preparato sciogliendo 7,5 g del sale in 100 mL in acqua distillata.
- b. Porre nel bagno termostato a 50 °C per 5 minuti.
- c. Raffreddare il campione in acqua ghiacciata.
- d. Leggere l'assorbanza a λ 760 nm contro bianco trattato come il campione.

Per calcolare la concentrazione dei polifenoli totali nel campione è stato adottato il metodo della retta di taratura, che è stata costruita analizzando soluzioni a concentrazioni note di acido gallico (range 0-100 $\mu\text{g/mL}$) nelle stesse condizioni sperimentali del campione. Riportando in grafico le concentrazioni (asse x) e le assorbanze ottenute (asse y), è stata costruita la migliore retta passante per i punti con il metodo della regressione lineare dei minimi quadrati. Per interpolazione del valore di assorbanza del campione con la retta di taratura è stato calcolato il contenuto di polifenoli totali.

3.2.4.7 Catechine totali

Le catechine totali sono state quantificate colorimetricamente impiegando la 4-dimetilaminocinmaldeide (DAC) e (+)-catechina come standard di riferimento, secondo la metodica proposta da Mc Murrough et al.

L'estrazione delle catechine dalla pesca è stata progettata nel laboratorio della sezione di Nutrizione del DISTAM, a partire dai metodi di U. Ime [3] e di Vinson J. A. et al. [4].

1. Pesare 5g di campione in provettoni da 100 mL ed aggiungere 50 mL di soluzione estraente (MeOH:HCl 2,4 N in proporzione 1:1).
2. Omogeneizzare con Ultra – Turrax per un minuto.
3. Porre nel bagno termostato a 90 °C per 3 ore al buio e agitando ogni 30 minuti.
4. Centrifugare per 10 minuti a 3000 rpm.
5. Filtrare su un filtro di carta recuperando il filtrato in un pallone.
6. Lavare i provettoni con 25 mL di soluzione al 35% di MeOH, 35% di acetone e 30% di HCl 1 N, lasciare agire per 10 minuti e filtrare nello stesso pallone.
7. Portare a piccolo volume con il Rotavapor
8. Recuperare l'estratto e portarlo a volume in un matraccio da 10 mL con acqua distillata.
9. L'estratto così ottenuto è pronto per la lettura spettrofotometrica:
 - a. In una provetta da 10 mL aggiungere 5,0 mL di soluzione DAC (preparata in un matraccio da 100 mL miscelando 0,3 g di DAC in 25 mL di HCl al 37% e portando a volume con metanolo e

lasciandola a 40 °C per un'ora) e 1 mL di estratto e agitare accuratamente.

- b. La soluzione ottenuta è posta immediatamente in cuvetta e la sua assorbenza è determinata a 640 nm contro bianco.

Per quantificare le catechine totali nel campione è stato adottato il metodo della retta di taratura, analizzando soluzioni a concentrazioni note di (+) catechina (range 5-100 mg/mL) nelle stesse condizioni sperimentali del campione. Per interpolazione del valore di assorbanza del campione con la retta di taratura è stato determinato il contenuto di catechine totali.

3.2.4.8 Quantificazione dell'acido salicilico

L'acido salicilico (SA) è stato determinato tramite gas-cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS) mediante l'utilizzo di uno standard interno (IS) del SA marcato con isotopi stabili (SA-d6).

La preparazione delle soluzioni standard, l'estrazione e la determinazione con GC-MS del SA nella pesca sono state messe a punto nel laboratorio della sezione di Nutrizione del DISTAM [5]. Il metodo ha alta sensibilità, con un limite di rivelabilità pari a 0,6 ng ed un limite di quantificazione di 2 ng.

1. Preparazione delle soluzioni standard:

- Soluzione madre di SA (salicylic acid, Sigma Ultra 99%, S-5922, Germany), con concentrazione di 1 mg/mL in metanolo. Le successive soluzioni di lavoro (range 2,5-5 ng/mL), impiegate per costruire la retta di taratura, sono state ottenute diluendo opportunamente la soluzione madre in acqua.
- Soluzione madre dello standard interno (98,7% atom % D, CDN isotopes, D-1156, Canada) o 2-hydroxybenzoic acid-d6, seguendo lo

stesso protocollo utilizzato per la soluzione madre del SA. Lo standard interno è stato diluito sino a ottenere una concentrazione finale di 0,5 µg/mL in acqua.

2. La preparazione dei campioni:

- Idrolisi basica 10 g di campione omogeneizzato con 10 mL di NaOH 6,25 M, in agitazione per un'ora a temperatura ambiente.
- Riposo a temperatura ambiente per una nottata.
- Il campione è quindi portato a pH 1-2 con HCl 10 M.
- Estrazione liquido-liquido in imbuto separatore con 50 mL di etere dietilico per 2 volte raccogliendo la fase organica e filtrandola su sodio solfato anidro.
- Prelevare un'aliquota di 5 mL ed aggiungere 80µL di IS-SA-d6 0,5 µg/mL.
- Portare a secco in corrente d'azoto a 40°C e aggiungere all'estratto secco 50 µL una soluzione (1:1) di (ACN: (MTBSTFA+1%TBDMCS) per derivatizzare il campione.. Agitare con il vortex per 30 secondi.
- Lasciare agire tutta la notte a temperatura ambiente.

Analisi in GC-MS, condizioni sperimentali:

- GC-MS: Shimadzu GCMS-QP505A.
- Colonna: DB-1MS capillary column, 15 m x 0.25 mm I.D., film thickness 0,25 µm (Agilent Technology, Palo Alto, CA, USA).
- T iniettore: 250°C.

- T interfaccia: 230°C.
- Sistema di iniezione: splitless (1 µL).
- Column inject pressure: 21.4 kPa.
- Flusso gas carrier (He): 1,0 mL/min.
- Split ratio: 20.
- Programma T forno:

rampa (°C/min)	T (°C)	Keep time (min)
-	60	2,00
20	160	-
6	195	-
40	300	-

- Modo di acquisizione: Selected Ion Monitoring (SIM).
- Detector: 1,50 kV.
- Sim table:

Compound	Molecular Ion	Specific Ion	RT (min)
Salicylic Acid	366	309	11,85
Salicylic Acid-d4	370	313	11,85

3.2.5 Esami ematochimici

Ad ogni prova, il sangue dei volontari è stato prelevato in provette Vacutainer. Il plasma è stato separato in provette con anticoagulante (EDTA), dopo moderata agitazione e centrifugazione per 10 minuti a 3500 rpm. Il siero, utilizzato per l'analisi di tutti gli altri parametri ematochimici, è stato ottenuto lasciando coagulare a temperatura ambiente il sangue per 30 minuti e poi è stato centrifugato a 3500 rpm per 10 minuti.

Plasma e il siero così ottenuti sono stati stoccati in provette Eppendorf da 1,5 mL, opportunamente codificate e conservati in freezer a -80°C.

Nel presente studio sono stati misurati i livelli circolanti di glucosio e insulina basale e ogni 10 minuti nella prima mezz'ora e ogni 30 minuti fino alla terza ora; C-peptide al basale e ogni 30 minuti; I trigliceridi, il colesterolo totale, il colesterolo LDL e l' HDL-colesterolo sono stati studiati al basale e al termine di ogni prova. Tali parametri i parametri sono stati analizzati mediante kit commerciale Roche Diagnostics Italia, con Cobas Integra 400 Plus e Cobas 411 (Roche diagnostics).

Le concentrazioni ematiche di acido salicilico, acido ferulico, Interleukina-6 (IL-6), di Proteina C-reattiva, di acidi grassi liberi (FFA) e le concentrazioni di leptina sono state dosate al basale e ogni 30 minuti per le tre ore successive ai pasti.

3.2.5.1 Acidi grassi non esterificati

La determinazione quantitativa degli acidi grassi non esterificati (FFA) nel siero è stata condotta impiegando un saggio enzimatico-colorimetrico (Roche Diagnostic Italia, Cat. No. 11383175001).

Il metodo prevede che in presenza di acil-CoA sintasi e ATP, gli acidi grassi liberi siano convertiti in acil-CoA, con produzione di AMP e pirofosfato (PP).

In presenza di acil-CoA ossidasi, l'acil-CoA reagisce con l'ossigeno molecolare a formare 2,3-enoil-CoA e perossido di idrogeno. Grazie all'azione della perossidasi, l' H_2O_2 converte la 4-aminopirina ed il 2,4,6-tribromo-3-idrossi-acido benzoico in un colorante rosso. L'intensità del colore è misurata nel visibile, ad lunghezza d'onda di 546 nm.

Procedimento:

1. Preparare i reagenti:

<i>Reagenti</i>	<i>PREPARAZIONE</i>	<i>STABILITÀ</i>
Mix A	Sciogliere una pastiglia della bottiglia 2 (contenente ATP, CoASH, acil-CoA sintasi, perossidasi, 4-aminopirina, ascorbato ossidasi) nella bottiglia 1 (tampono: fosfato di potessio)	5 giorni a 2-8 °C 8 ore a 15-25 °C
Mix B	Sciogliere una pastiglia della bottiglia 5 (con acil-CoA ossidasi) nella bottiglia 4 (soluzione diluente).	

2. Preparazione dello standard:

- Dissolvere 6 g di triton x-100 in matraccio tarato da 100 mL con 80 mL di acqua distillata a T di 40 °C.
- Lasciare raffreddare fino al raggiungimento di 15 °C.
- Portare a volume con acqua distillata (Soluzione 1).
- Dissolvere 9 mg di acido palmitico (Sigma Ultra 99%) in 100 mL di etanolo a T di 40 °C; Lasciare raffreddare fino al raggiungimento di 15 °C (Soluzione).
- Miscelare lentamente 80 mL di soluzione 1 con la soluzione 2.
- Agitare con ancoretta magnetica per 30 minuti, quindi portare a volume in un matraccio da 100 mL. Lo standard così ottenuto è stabile per 3 giorni a 4-8 °C.

3. Dispensare nelle cuvette:

Reagenti	BIANCO	CAMPIONE
Mix A	1,0 mL	1,0 mL
Campione	-	0,5 mL
Acqua distillata	0,5 mL	-

4. Lasciare le cuvette ad una temperatura di 25 °C per 10 minuti.

5. Aggiungere in ogni cuvetta 50 μL di soluzione di N-etil-maleimide (bocchetta 3); Agitare al vortex e leggere l'assorbanza (Abs_1) ad una lunghezza d'onda di 546 nm.
6. Dispensare in ogni cuvetta 50 μL di Mix B e lasciare ad una temperatura di 25 $^\circ\text{C}$ per 15 minuti.
7. Leggere l'assorbanza (Abs_2) ad una lunghezza d'onda di 546 nm.

Sono state calcolate le differenze di assorbanze per ogni campione ematico e per il bianco:

$$\Delta\text{Abs} = \text{Abs}_2 - \text{Abs}_1$$

Ad ogni ΔAbs_c dei campioni sottrarre la differenza di assorbanze del bianco (ΔAbs_b):

$$\Delta A_c = \Delta\text{Abs}_c - \Delta\text{Abs}_b$$

La concentrazione di FFAs sierici è stata determinata con l'equazione:

$$\text{FFAs (mM)} = 1.192 * \Delta A_c$$

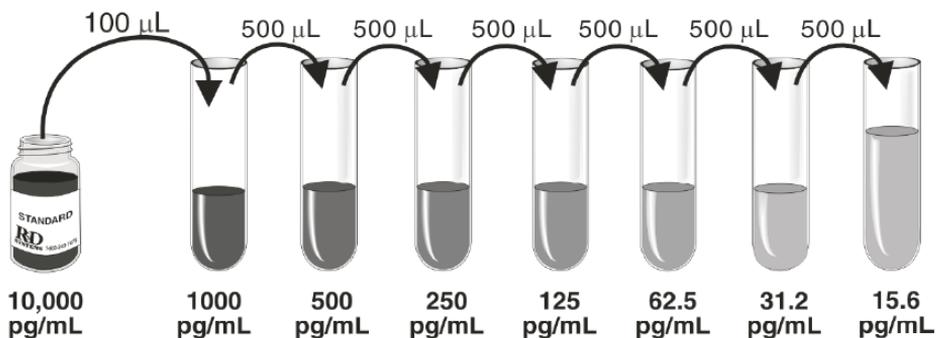
3.2.5.2 Determinazione della leptina

La quantificazione della leptina è stata eseguita con dosaggio immunoenzimatico diretto in fase solida (Quantikine DLP00, R&D Systems Europe, Ltd).

Il metodo prevede una diluizione iniziale del siero di 100 volte, prelevando 10 μL campione in 990 μL di Calibrator Diluent RD5P.

Preparazione dei reagenti:

1. Mantenere tutti i reagenti a temperatura ambiente prima dell'utilizzo.
2. Tampone di lavaggio: agitare delicatamente il concentrato per dissolvere i cristalli; dispensarne 20 mL in 480 mL di acqua distillata.
3. Substrate Solution: miscelare eguali volumi di Color Reagents A e Color Reagent B, non oltre 15 minuti dall'utilizzo. La soluzione ottenuta deve essere conservata al buio.
4. PCalibrator Diluent RD5P: diluire 20 mL di Calibrator Diluent RD5P concentrato in 80 mL di acqua distillata.
5. Leptin Standard: ricostituire lo standard con 1,0 mL di acqua distillata ottenendo una stock solution con concentrazione di 10.000 pg/mL e porla in agitazione per 15 minuti. Preparare le diluizioni in Calibrator Diluent RD5 come raffigurato di seguito. Il Calibrator Diluent RD5 rappresenta anche lo standard a concentrazione 0 pg/mL.



Procedimento:

1. Dispensare in ogni pozzetto 100 µL di Assay Diluent RD1-19.
2. Aggiungere 100 µL di standards, controlli o campioni nei pozzetti.
3. Coprirli con le strip adesive e lasciarli incubare per 2 ore a temperatura ambiente.

4. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto e lavarlo con 400 μ L di tampone di lavaggio; ripetere l'operazione per tre volte.
5. Capovolgere la microplate per eliminare i residui di soluzione dal pozzetto.
6. Aggiungere 200 μ L di Leptin Conjugate e Coprire i pozzetti con le strip adesive e lasciarli incubare per 1 ora a temperatura ambiente.
7. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto e lavarlo con 400 μ L di tampone di lavaggio; ripetere l'operazione per tre volte.
8. Aggiungere 200 μ L di Substrate Solution lasciarli incubare, al buio, per 30 minuti a temperatura ambiente.
9. Aggiungere 50 μ L di Stop Solution; Il colore dei pozzetti cambierà da blu a giallo.
10. Determinare l'assorbanza entro 30 minuti ad una lunghezza d'onda di 450 nm. Correggere l'assorbanza a 450 nm con quella ottenuta a λ di 540 nm o di 570 nm per ottenere una misura più accurata:

$$Abs_{450nm} - Abs_{540/570nm}$$

Per determinare la concentrazione di leptina nel siero bisogna mediare tra loro i valori di assorbanza dei duplicati e sottrargli l'assorbanza media del bianco. Mettendo in grafico l'Abs degli standards e la loro concentrazione si ottiene una curva di taratura dal quale è possibile estrapolare le concentrazioni dei campioni analizzati e, tenendo conto del fattore di diluizione, determinare la concentrazione sierica di leptina.

3.2.5.3 Dosaggio dell'acido salicilico e dell'acido ferulico

L'acido salicilico (SA) e l'acido ferulico (FA) sono stati determinati con la metodica messa a punto nella prima parte della presente tesi di dottorato: si veda paragrafo 3.1.

3.2.5.4 Dosaggio dell'Interleuchina 6

La determinazione quantitativa dell'IL-6 è stata eseguita mediante dosaggio immunoenzimatico diretto in fase solida (Quantikine HS600B R&D Systems Europe, Ltd).

Il metodo prevede l'utilizzo di una micro-piastra su cui sono immobilizzati anticorpi monoclonali specifici per l'IL-6. Gli standards ed i campioni sono aliquotati nei pozzetti e l'IL-6, in essi presente, si legherà all'anticorpo immobilizzato. Dopo aver eseguito i lavaggi necessari a rimuovere tutte le sostanze non affini agli anticorpi anti-IL-6, sono stati aggiunti anticorpi policlonali anti IL-6 coniugati con fosfatasi alcalina. Nei lavaggi successivi sono stati eliminati tutti gli anticorpi policlonali che non si sono legati alla IL-6, ed è stato aggiunto, dopo incubazione, il substrato, che reagendo con l'enzima ha determinato lo sviluppo del colore. La reazione colorimetrica è stoppata ed è stata misurata l'assorbanza dei campioni che è proporzionale alla quantità di IL-6 legatasi inizialmente. Utilizzando gli standard a valore di IL-6 noto, è stata generata una curva di dosaggio dalla quale è stata estrapolata la concentrazione di IL-6 nei campioni.

3.2.5.5 Dosaggio della Proteina C reattiva

La determinazione quantitativa della proteina c reattiva (PCR) è stata eseguita mediante dosaggio immunoenzimatico diretto in fase solida (Quantikine DRPC00, R&D Systems Europe, Ltd).

3.3 Relazione tra livello di mediterraneità della dieta e concentrazioni di acido salicilico e ferulico circolanti in soggetti sovrappeso e obesi

3.3.1 Soggetti e disegno sperimentale

Il presente studio è stato portato a termine presso il Centro Internazionale per lo Studio della Composizione Corporea (ICANS). Centonove soggetti sono stati reclutati tra i pazienti che si sono presentati spontaneamente per sottoporsi ad una visita medica specialistica volta all'accertamento dello stato nutrizionale e di salute finalizzato ad una dietoterapia.

Durante tale visita medica è stato richiesto ai volontari di compilare due questionari: uno per stimare il livello di attività fisica e un altro per valutare il livello di aderenza della propria dieta abituale al modello alimentare mediterraneo.

In sede di visita medica è stato eseguito anche un prelievo venoso e il sangue raccolto è stato trattato come descritto nel paragrafo 3.2.5 .

Il criteri di esclusione adottato nel presente studio sono stati un'anamnesi farmacologica positiva per antinfiammatori, anti-aggreganti piastrinici (Aspirina, Cemirit, Cardierene, Aspro, Noalgesin, Acsal, Flectadol), integratori alimentari, presidi dermatologici (Duofilm, Verunec, Kerofilmver, Verel, Transversal) se assunti cronicamente e/o il giorno precedente alla prima visita e l vegetarianismo.

3.3.2 Valutazione della composizione corporea

La valutazione della composizione corporea dei volontari che hanno preso parte al presente studio è stata condotta seguendo le procedure descritte nel paragrafo 3.2.3 e suoi sottoparagrafi (misurazione dei parametri antropometrici, ecografia addominale). In aggiunta a queste sono state anche eseguite:

- calorimetria indiretta: “gold standard” per la misurazione del metabolismo basale, ovvero la quantità di energia impiegata in condizioni di neutralità termica, dal soggetto sveglio, ma in uno stato di totale rilassamento fisico e psichico, a digiuno da almeno 12 ore. In altre parole, il metabolismo basale è il minimo dispendio energetico necessario a mantenere le funzioni vitali e lo stato di veglia. Tale metodica si basa sul principio che l’organismo ricava energia mediante ossidoriduzione dei substrati energetici contenuti negli alimenti mediante reazioni in cui si consuma ossigeno e si produce anidride carbonica in proporzione all’energia generata. La calorimetria indiretta prevede quindi l’analisi dell’aria espirata dal soggetto, sia in termini di composizione che di volume. Attraverso la misura dell’ossigeno consumato e dell’anidride carbonica prodotta è possibile stabilire la spesa energetica del soggetto e la tipologia del substrato utilizzato. La prima, espressa come quantità di energia per unità di tempo, è calcolata mediante l’applicazione dell’equazione di Weir ($\text{Kcal/min} = 3.94 * \text{VO}_2 + \text{VCO}_2$);
- Analisi bioimpedenziometrica: che è stata eseguita in multifrequenza mediante un bioimpedenziometro omopolare. Il paziente in posizione eretta con due elettrodi ai piedi e due impugnati nelle mani attraverso manubri. In seguito all’analisi, che ha una durata media di 2 minuti e 30 secondi, attraverso equazioni specifiche è possibile risalire al contenuto di acqua corporea totale ed extra-cellulare. Da queste poi, mediante equazioni predittive, sono calcolate la FM e la FFM.
- Misurazione della pressione arteriosa.

3.3.3 Esami ematochimici

Gli esami ematochimici sono stati dosati sul siero ottenuto centrifugando (3500 rpm per 10 minuti a 5°C) il sangue lasciato a coagulare a temperatura ambiente per 30 minuti. Le aliquote di siero ottenute sono state stoccate in freezer a -80°C. Di seguito sono elencate le analisi eseguite:

- profilo lipidico (colesterolo totale, colesterolo LDL, colesterolo HDL, trigliceridi);
- glicemia e insulinemia;
- enzimi caratterizzanti funzionalità epatica (ALT, AST, γ GT);
- stato infiammatorio (proteina C reattiva);
- azotemia e acido urico.

L'analisi è stata eseguita con kit Roche Diagnostics, su Sistema COBAS INTEGRA 400 PLUS e sistema analitico di immunochimica COBAS 411.

3.3.3.1 Dosaggio dell'acido salicilico e dell'acido ferulico

L'acido salicilico (SA) e l'acido ferulico (FA) sono stati determinati con la metodica messa a punto nella prima parte della presente tesi di dottorato: si veda paragrafo 3.1.

3.3.3.2 Dosaggio della vitamina c plasmatica

Per la preparazione dei campioni ematiti, sono stati prelevati 150 μ L di siero e trasferiti in una Eppendorf contenente 150 μ L di acido meta-forsforico (MPA) al 10% in Na₂-EDTA 0.54 mM. Dopo opportuna agitazione con il Vortex, le Eppendorf sono state centrifugate a 10.000 rpm per 5 minuti a 4°C. Sono stati quindi prelevati 100 μ L di surnatante, e sono stati trasferiti in

una Eppendorf contenente 100 μ L di MPA al 5% in Na₂-EDTA 0.54 mM. Dopo opportuna agitazione con il Vortex, queste sono state iniettate in HPLC-DAD (Agilent 1200) impostando i seguenti parametri:

- Colonna: Polyamine 250*4,6 mm 5 μ m
- Fase mobile: 50 mM NH₄H₂PO₄/Acetonitrile 30/70 v/v, isocratica
- Flusso: 1,0 mL/min
- Temperatura di lavoro: ambiente.
- Detector: UV-DAD 250 nm.

3.3.4 Valutazione della mediterraneità della dieta

Per valutare quanto le abitudini alimentari del campione fossero coerenti con il regime dietetico mediterraneo è stato impiegato il “mediterranean score” [6].

Il “mediterranean score” è il punteggio ottenuto dai soggetti dopo avere risposto ad un questionario validato, caratterizzato da 14 domande (Allegato 1), che valuta l’assunzione di alcuni alimenti caratteristici della dieta mediterranea e non (es. olio di oliva come grasso da condimento, verdura, frutta, vino, pesce, legumi, frutta secca, soffritto, carne bianca e rossa, insaccati, grassi di origine animale, bevande zuccherate, dolci di produzione industriale).

Per la determinazione dello score di mediterraneità sono stati seguiti i criteri di seguito

1. ≥ 4 cucchiaini di olio d'oliva/giorno
2. ≥ 2 porzioni di verdura (cotta o cruda) o 1 porzione verdura cruda al giorno
3. ≥ 3 porzioni di frutta (incluso fino a 1 succo di frutta) al giorno
4. < 1 porzione di carne rossa, hamburger o insaccati al giorno
5. < 1 porzione di burro, margarina o panna al giorno
6. < 1 bicchiere di bevande zuccherate al giorno
7. ≥ 3 bicchieri di vino la settimana
8. ≥ 3 porzioni di legumi la settimana
9. ≥ 3 porzioni di pesce o molluschi e crostacei la settimana
10. < 3 prodotti da forno, sia commerciali che di pasticceria la settimana
11. > 1 porzione di noci, nocciole e arachidi la settimana
12. consumo di carne bianca $>$ consumo di carne rossa
13. ≥ 2 volte verdure, pasta, riso, o altri piatti preparati con soffritto la settimana

riportati:

Tabella 3.3 Criteri per l'assegnazione del punteggio di mediterraneità

Se la risposta del soggetto corrisponde al criterio di aderenza alla dieta mediterranea riportato nella tabella, viene assegnato 1 punto; in caso contrario, non viene assegnato alcun punto. Lo score totale è definito dalla sommatoria dei punti: il punteggio è compreso tra 0 (che indica che nessun criterio è stato rispettato, e quindi la minima aderenza alla dieta mediterranea) e 14 (che indica che tutti i criteri sono stati rispettati, e quindi la massima aderenza alla dieta mediterranea). Una buona aderenza alla dieta mediterranea è rappresentato da un punteggio maggiore-uguale a 9.

Al fine di comprendere meglio le abitudini alimentari dei pazienti, il questionario alimentare che è stato loro somministrato era composto da altre 19 domande (Allegato 2), e mediante

queste, si stima la frequenza settimanale di consumo di latte e latticini, uova, patate, alimenti integrali, pizza, cibo da fast-food, birra, caffè, tè.

Nell'analisi da noi effettuata, abbiamo considerato come descrittori di mediterraneità:

- Mediterranean Score;
- numero di cucchiaini di olio al giorno;
- numero di porzioni di frutta consumate quotidiane;
- numero di porzioni di verdura consumate quotidiane;
- consumo di alimenti integrali.

3.4 Analisi statistica

I risultati dello studio sono stati espressi come media \pm errore standard (ES). Quando necessario i dati sono stati log-normalizzati. Per determinare le differenze significative tra le variabili valutate tra i diversi soggetti e tempi è stato utilizzato il test t di Student a due code per dati appaiati con la correzione di Bonferroni (limite di significatività $p < 0,05$). Sono state inoltre valutate le correlazioni e la presenza di possibili relazioni causa-effetto tra le variabili mediante coefficiente di correlazione di Pearson e regressione lineare ai minimi quadrati. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il programma SPSS versione 17

3.5 Bibliografia

1. Brighenti F, Testolin G, Porrini M, Simonetti P. Fibra Totale e Composizione Qualitativa dei Glucidi Disponibili negli Alimenti Integrali del Commercio: Procedura di Analisi Enzimocromatografica. *Rivista della Società Italiana Scienze Alimentari* **1987**, *16*,199-204.
2. Scalbert, A.; Quantitative Method for the Estimation of Tannins in Plant Tissues. *Chemistry and Significance of Condensed Tannins* **1989**, 259-280.
3. Imeh, U.,Khokhar, S.; Distribution of Conjugated and Free Phenols in Fruits:Antioxidant Activity and Cultivar Variations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, 6301-6306.
4. Vinson J. A., Su, X.; Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Food: Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49*, 5315-5321.
5. Battezzati, A., Fiorillo, G., Spadafranca, A., Bertoli, S., Testolin, G.; Measurement of Salicylic Acid in Human Serum Using Stable Isotope Dilution and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry* **2006**, *354*, 274-278.
6. Martínez-Gonzalez , M.A., Development of a short dietary intake questionnaire for the quantitative estimation of adherence to a cardioprotective Mediterranean diet. *European Journal of Clinical Nutrition* **2004**, *58*,1550-52.

4 Risultati

4.1 Messa a punto e validazione della metodica analitica

4.1.1 Analisi in GC-MS: condizioni sperimentali

Dopo aver effettuato numerose prove di analisi il protocollo GC-MS è stato ottimizzato secondo i seguenti parametri:

- GC-MS: Shimadzu GCMS-QP505A.
- Colonna: DB-5MS capillary column, 30 m x 0.25 mm I.D., film thickness 0,25 μm (Agilent Technology, Palo Alto, CA, USA).
- T iniettore: 250°C.
- T interfaccia: 230°C.
- Sistema di iniezione: splitless (1 μL).
- Column inject pressure: 64.5 kPa.
- Flusso gas carrier (He): 1,0 mL/min.
- Split ratio: 50.
- Flusso totale: 52.7 mL/min
- Programma T forno gas-cromatografico (4.1) :

Tabella 4.1 . Programma forno GC

rampa (C°/min)	T	Tempo (min)
-	80	1,00
10	220	0,00
20	300	0,00

- Modo di acquisizione: Selected Ion Monitoring (SIM).
- Detector: 1,50 kV.
- Selected Ion Monitoring table (Tabella6) :

Tabella 4.2 Ioni selezionati in GC-MS

Composto	Ione molecolare	Ione specifico	Tempo di ritenzione
FA	338	323	11.47
IS d3-FA	341	326	11.45
SA	282	267	17.66
IS d4-SA	286	271	17.64

Di seguito sono riportate le immagini relative agli spettri di massa:
(Figura4.1 – 4.4).

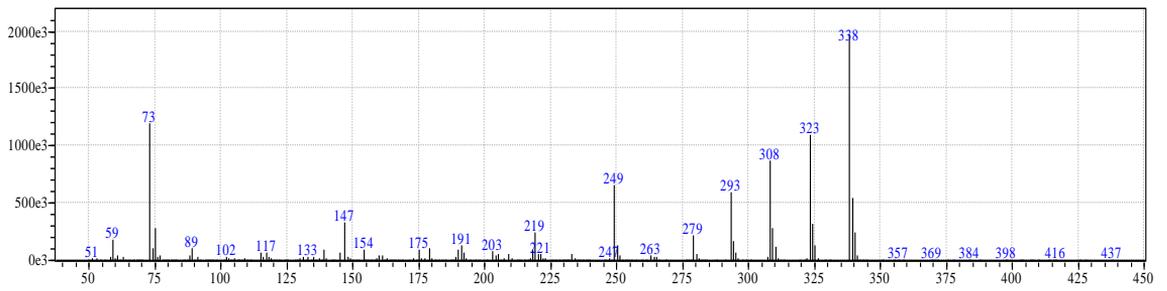


Figura 4.1 Spettro di massa dell'acido ferulico

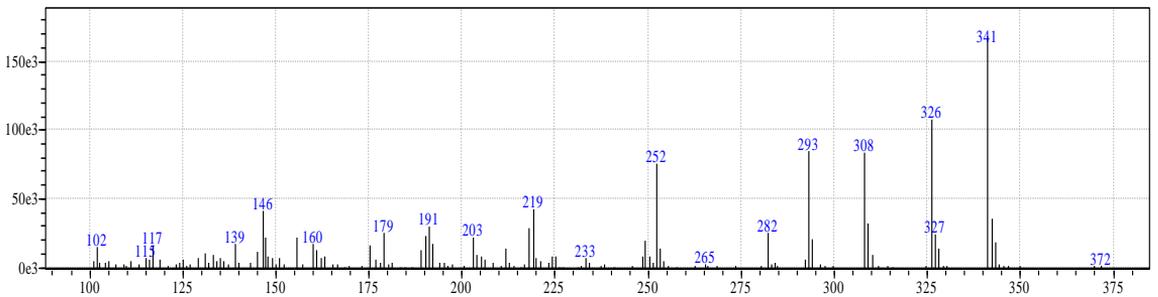


Figura 4.2 Spettro di massa dell'acido ferulico deuterato

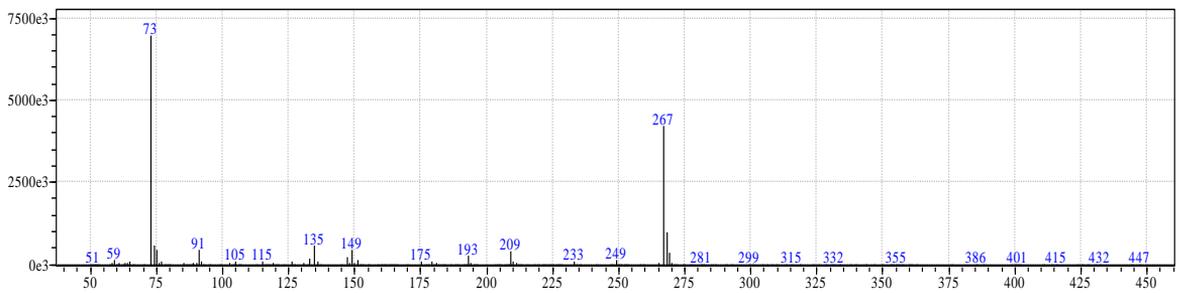


Figura 4.3 Spettro di massa dell'acido salicilico

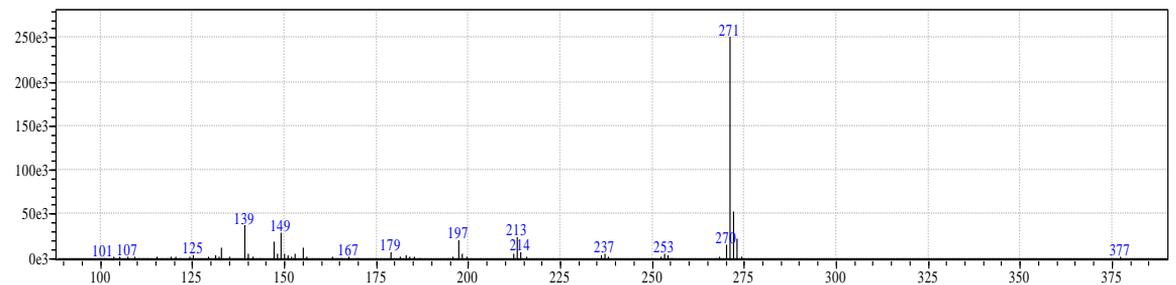


Figura 4.4 Spettro di massa dell'acido salicilico deuterato

Di seguito sono riportate le immagini relative ai cromatogrammi (Figura 4.5 – 4.6)

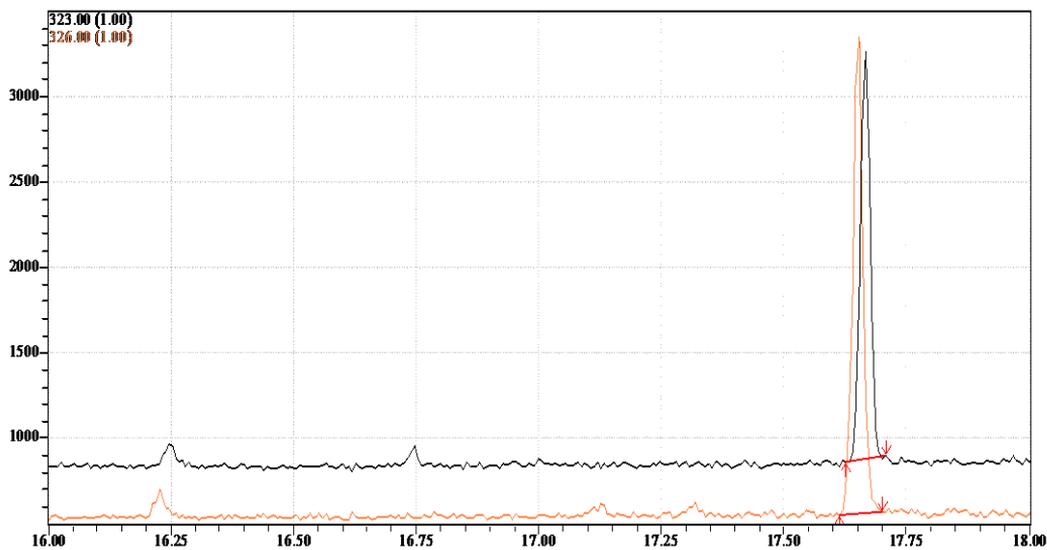


Figura 4.5 Cromatogramma dello standard 15 ng di acido ferulico + 20 ng d3-FA derivatizzati.

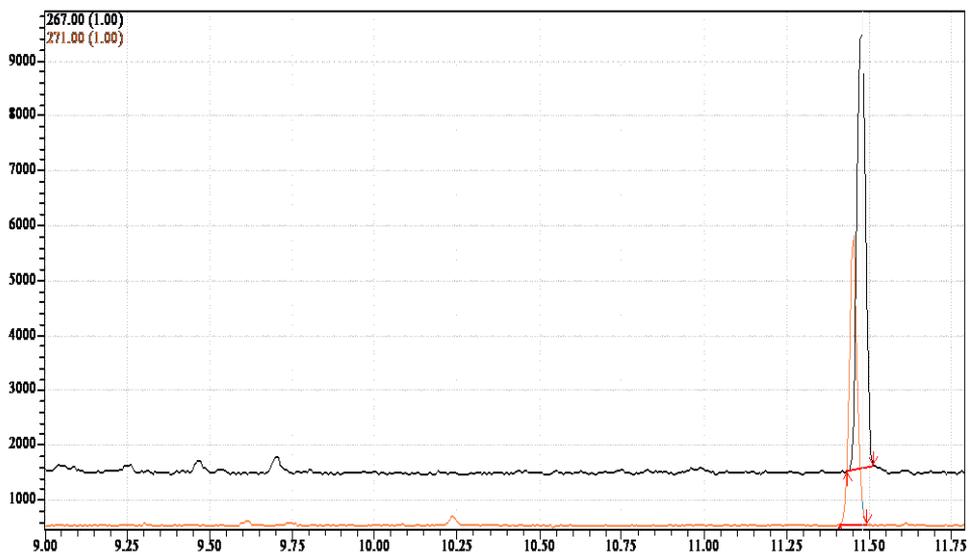


Figura 4.6 Cromatogramma dello standard 15 ng di acido salicilico + 10 ng d4-SA derivatizzati.

4.1.2 Limiti di rivelabilità e di quantificazione

Il limite di rilevabilità (ldr), definito come la concentrazione corrispondente al minimo segnale significativo, è stato calcolato effettuando 10 misurazioni di campioni bianchi indipendenti. Le concentrazioni di FA e SA corrispondenti ai segnali sono state calcolate mediante regressione lineare ordinaria ai minimi quadrati. Dal test non parametrico di “Kolmogorov-Smirnov per un campione”, la distribuzione delle concentrazioni ottenute è risultata normale (tab7).

Tabella 4.3 Test non parametrico di Kolmogorov-Smirnov per la valutazione della distribuzione delle concentrazioni ottenute

Test di Kolmogorov-Smirnov per un campione			
		area FA/aread3-FA	area SA/aread4-SA
Numerosità		10	10
Parametri normali ^{a, b}	Media	1,1840	,4230
	Deviazione standard	,36007	,12893
Differenze più estreme	Assoluto	,142	,140
	Positivo	,142	,140
	Negativo	-,119	-,118
Z di Kolmogorov-Smirnov		,449	,443
Sig. Asint. a 2 code		,988	,989

a. La distribuzione del test è Normale.
b. Calcolato dai dati.

Le quantità medie, corrispondenti ai minimi segnali (ms), sono di 1.18 ± 0.36 ng per il FA e 0.42 ± 0.12 ng per il SA. I limiti di rivelabilità, o minimi segnali significativi, espressi come $3.3 \sigma_{ms}$ sono di 1.18 ng per il FA, e 0.42 ng per il SA. I limiti di quantificazione calcolati ($10 \sigma_{ms}$) sono di 3,58 ng per il FA e di 1.28 per il SA (Figura 4.7).

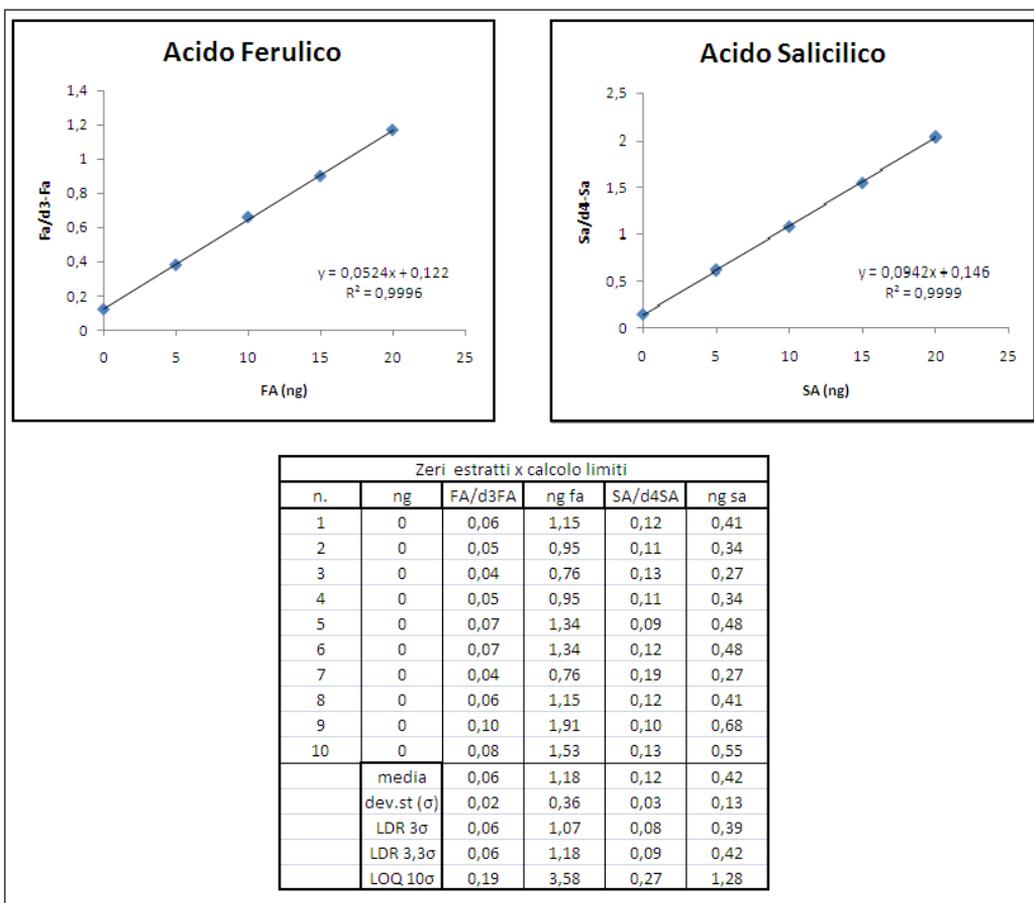


Figura 4.7 Rette e valori dei limiti di rivelabilità e quantificazione

4.1.3 Range dinamico lineare

Il range dinamico lineare della metodica in studio è stato esplorato utilizzando soluzioni standard non estratte a concentrazioni note (2,5-200 ng) di acidi ferulico e salicilico.

Dalle prove effettuate, il segnale varia linearmente con la concentrazione nell'intervallo 5-100 ng sia per il FA, sia per il SA (Figura 4.8).

Per una miglior valutazione di tale parametro sono state analizzate aliquote di siero opportunamente drogate con le quantità di FA e SA riportate in letteratura come presenti nel siero umano (FA: 5-30 nM; SA: 0.01-30 μ M) (Figura 4.9).

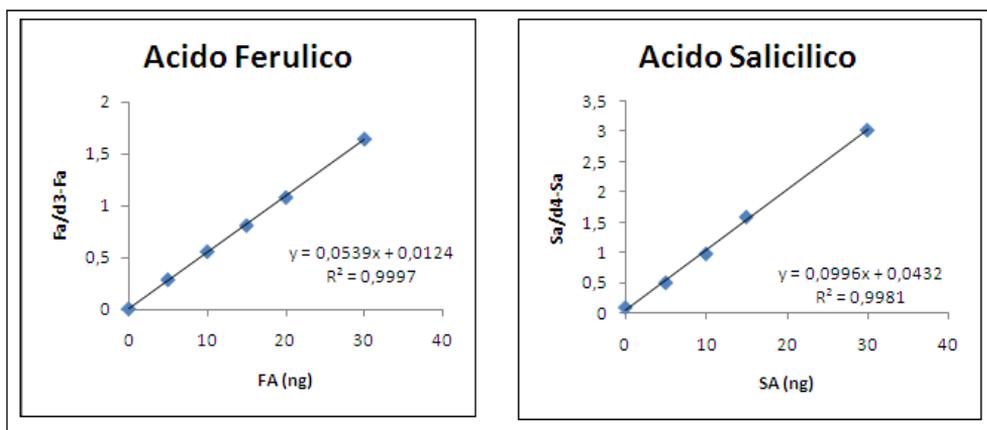


Figura 4.8 Range dinamico lineare retta non estratta

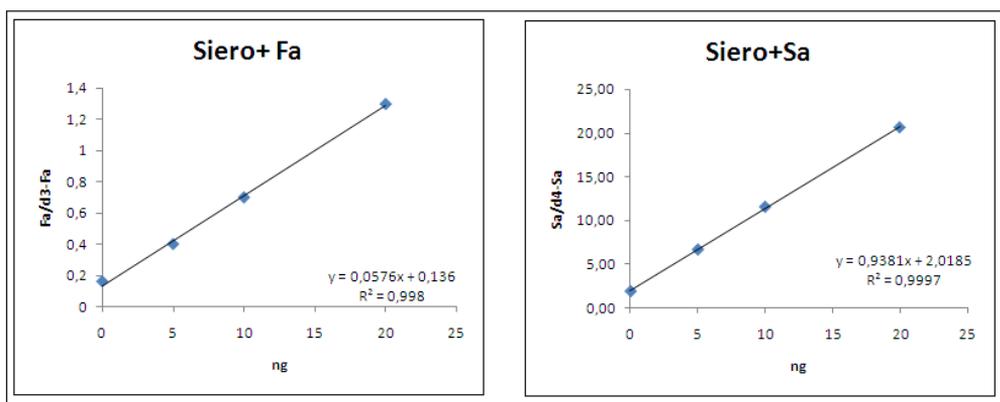


Figura 4.9 Range dinamico lineare retta estratta con siero drogato

4.1.4 Accuratezza e precisione

L'accuratezza del metodo è stata espressa come percentuale di recupero rispetto a soluzioni di riferimento. A tale scopo sono state estratte ed analizzate 15 aliquote di siero fortificate con 5,10,20 ng di FA e SA. Il recupero medio ottenuto è stato di $105.85 \pm 0.50\%$ per il FA, e di $95.34 \pm 1.45\%$ per il SA.

La precisione è stata valutata come ripetibilità ristretta, ovvero in condizioni (laboratorio, apparecchiatura, operatore) mantenute costanti. La ripetibilità intra-day è stata eseguita con misurazioni ravvicinate nel tempo. Nelle tabelle seguenti sono riportati i valori medi ottenuti corredati di deviazione standard, coefficiente di variazione (CV) e errore relativo percentuale (ER%).

Tabella 4.4 Ripetibilità intraday Acido Ferulico

n	Std (ng)	Media (ng)	Deviazione std	CV%	ER%
5	5	4.75	0.34	7.10	-5.07
5	10	9.96	1.69	16.97	-0.37
5	20	20.64	1.31	6.37	3.20

Tabella 4.5 Ripetibilità intraday Acido Salicilico

n	Std (ng)	Media (ng)	Deviazione standard	CV%	ER%
5	5	6.70	0.69	10.27	34.07
5	10	11.59	2.31	19.91	15.92
5	20	20.69	0.58	2.79	3.42

Legenda:

- n= numerosità campione
- std= quantità assoluta in ng
- CV%= coefficiente di variazione
- ER%= errore relativo percentuale

La ripetibilità inter-day, invece, è stata stimata su 5 aliquote di campione (siero drogato) contenente 5 ng di SA e FA, estratti e analizzati in tre giorni diversi. Dal test non parametrico di “Kolmogorov-Smirnov per un campione”, la distribuzione dei risultati ottenuti è risultata normale (Tabella 4.6, Figura17).

Tabella 4.6 Test non parametrico di Kolmogorov-Smirnov per la valutazione della distribuzione dei risultati

Test di Kolmogorov-Smirnov per un campione			
		FA 5 ng	SA 5 ng
Parametri normali ^{a,b}	Numerosità	15	15
	Media	6,25	10,37
	Deviazione standard (S_r)	,702	,530
Differenze più estreme	Assoluto	,164	,138
	Positivo	,136	,138
	Negativo	-,164	-,102
Z di Kolmogorov-Smirnov		,637	,534
Sig. Asint. a 2 code		,812	,938

a. La distribuzione del test è Normale.
b. Calcolato dai dati.

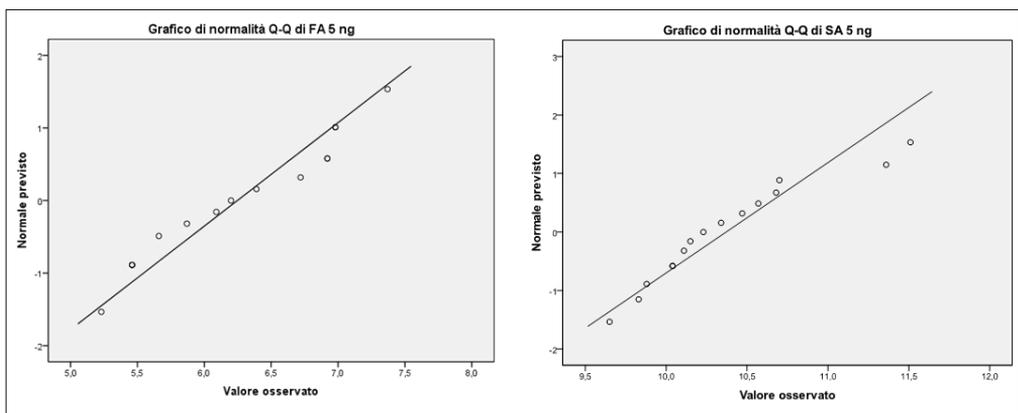


Figura 4.10 Distribuzione dei risultati ottenuti per FA e SA

Sulla base dei risultati della ripetibilità inter-day, è stato calcolato il limite di ripetibilità (r) della metodica secondo la formula:

$$r = t_{p=0.95;v=n-1} * S_r * \sqrt{2}$$

Nel nostro caso, il valore critico della distribuzione t di Student è di 2.145 e

- $r = 2.12$ per il FA
- $r = 1.60$ per il SA.

R è utilizzato come il criterio di accettabilità dei dati in doppio ottenuti in condizioni di ripetibilità, secondo lo schema di seguito riportato: $|x_1 - x_2| \leq r$.

4.2 effetto di un pasto a base di frutta sulle concentrazioni ematiche degli acidi salicilico e ferulico e sulle risposte metaboliche e infiammatorie in soggetti sani

4.2.1 caratterizzazione nutrizionale delle pesche

Nella Tabella 4.7 sono riportati i risultati della composizione bromatologia delle pesche impiegate nel presente studio.

Dall'analisi della soluzione zuccherina MSM non è stata riscontrata la presenza né di acido salicilico né di acido ferulico.

Tabella 4.7 composizione bromatologica delle pesche

Moisture (g/100g)	85,91±0,001
Tot sugars (g/100g)	11,44
Glucose (g/100g)	1,26±0,01
Fructose (g/100g)	1,30±0,03
Sucrose (g/100g)	8,92±0,03
Protein (g/100g)	0,065±0,005
Ash (g/100g)	0,30±0,002
Tot fiber (g/100g)	0,60±0,03
SA (mg/100g)	0,06±0,001
FA (mg/100g)	0.14 ± 0.010
Polyphenols (mg/100g)	89,86±4,36

Tabella 4.8 Quantità somministrate per kg di peso corporeo

	PSM	MSM
Moisture (M) / Water addede (W) (g)	6,24	6,24
Tot sugars (g)	5,36 M	5,36 W
Glucose (g)	0,71	0,71
Fructose (g)	0,08	0,08
Sucrose (g)	0,08	0,08
Protein (g)	0,56	0,56
Ash (g)	0,004	0
Tot (g)	0,02	0
fiber (g)	0,04	0
SA (mg)	0,004	0
FA (mg)	0,009	0
Polyphenols (mg)	5,61	0

4.2.2 Stato di nutrizione e composizione corporea

Il campione era composto da 26 soggetti, 13 uomini e 13 donne. Nella tabella 4.9 sono riportati i dati della composizione corporea del campione di volontari.

Tabella 4.9 Composizione corporea media dei volontari

	Età (anni)	Peso (kg)	Altezza (m)	BMI (kg/m2)	Plica bic (mm)	Plica tric (mm)	Plica sottosc (mm)	Plica sovrail (mm)	%BF	CV (cm)
media	23,25	66,82	1,69	23,36	6,49	14,28	15,41	17,89	22,48	76,21
E.S	0,50	2,66	0,03	0,59	0,58	1,10	1,17	1,71	1,35	1,53

4.2.3 risposta metabolica e infiammatoria post-prandiale

Nella tabella 4.10 sono riportati i valori medi della risposta post-prandiale al pasto di frutta (PSM) e alla soluzione zuccherina (MSM).

La concentrazione di glucosio plasmatico è aumentata più lentamente ($p < 0,01$) con PSM rispetto a MSM ($+9,69 \pm 0,70$ vs $3,15 \pm +28,21$ mg/dL a 15 min), riducendosi più lentamente nell'ultima ora ($p < 0,001$) determinando una minor escursione glicemica media rispetto a MSM ($39,15$ mg/dL vs $50,42$ mg/dL, $p < 0,05$). L'insulina dopo i pasti aumenta raggiungendo il picco massimo dopo 45 minuti sia con PSM ($41,49 \pm 5,94$ μ U / mL) sia con MSM ($38,40 \pm 5,56$ μ U / mL). Nelle ultime due ore l'insulinemia è diminuita meno rapidamente con PSM rispetto a MSM. Gli acidi grassi liberi sono stati percentualmente più soppressi dopo l'ingestione PSM rispetto a MSM ($-72,04\%$ vs $-53,31\%$, $p < 0,01$) nelle prime due ore, e, dopo il pasto a base di pesca i le concentrazioni di FFA sono rimaste inferiori al valore basale anche dopo tre ore dal consumo PSM ($P < 0,05$).

Non abbiamo trovato differenze significative sia nei valori basali sia dopo i pasti per quanto riguarda la proteina C-reattiva (CRP). Al contrario, già dopo la prima ora l'IL-6 tende ad aumentare sia con PSM e MSM, ma meno con PSM ($2,48 \pm 0,89$ pg / mL di $9,38 \pm 2,47$ pg / mL, $p < 0,05$) (figura 4.11)

Tabella 4.10 Risposta metabolica e infiammatoria ai pasti

Time (min)	Plasma glucose (mg/dL)				Insulin (μ U/mL)				FFA (μ mol/L)				CRP (ng/mL)				IL6 (pg/mL)			
	PSM		MSM		PSM		MSM		PSM		MSM		PSM		MSM		PSM		MSM	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
0	86,28	1,2	84,28	1,1	9,85	1,45 α	7,27	0,92 α	0,52	0,07 α	0,35	0,05 α	1086	402	1295	475	1,98	0,44	1,97	0,25
15	95,13	1,63* α	114,14	4,15* α	30,17	4,16*	34,57	3,72*		n.e	n.e	n.e	n.e		n.e		n.e		n.e	
30	112,88	2,25*	111,52	3,32*	37,07	4,08*	32,72	5,13*	0,34	0,04* α	0,2	0,02* α	n.e		n.e		1,18	0,15	1,12	0,16
45	111,69	3,93*	113,18	10,28*	41,49	5,94*	38,4	5,56*		n.e	n.e	n.e	n.e		n.e		n.e		n.e	
60	89	2,71	84,36	5,72	27,17	4,28* α	18,89	2,98* α	0,12	0,01*	0,15	0,01*	n.e		n.e		2,83	0,42	3,12	0,54
90	84,81	1,67	77,95	4,53	19,01	3,09* α	12,21	3,62 α		n.e	n.e	n.e	975,5	364	661,5	323	n.e		n.e	
120	84,58	1,67 α	79,2	2,26* α	14,1	2,27	11,56	2,33	0,1	0,01* α	0,27	0,05 α	n.e		n.e		3,27	1,36	4,84	2,42*
180	81,64	1,22* α	77,16	1,35* α	7,71	1,02 α	5,62	0,92 α	0,32	0,05* α	0,49	0,05* α	1084	360	1156	452	2,48	0,89*	9,38	2,47*

*:p<0.05 vs t0

α :p<0.05 PSM vs MSM

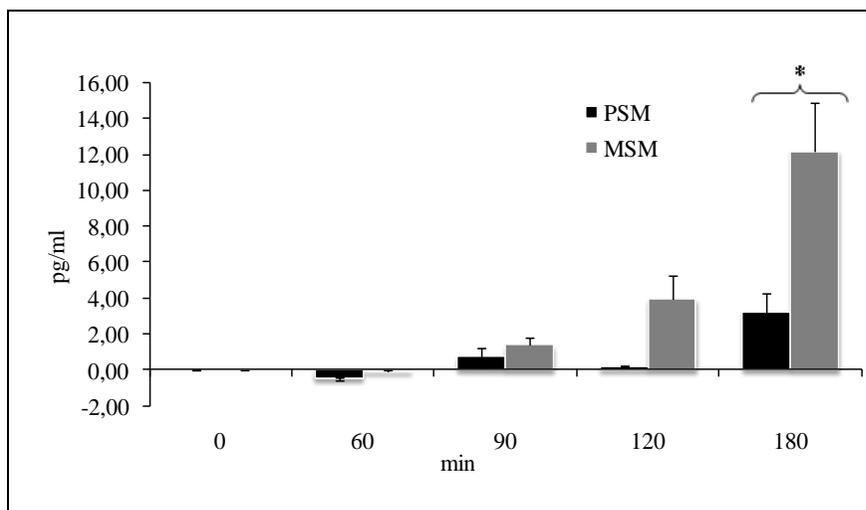


Figura 4.11 Variazione assoluta dei valori di IL-6 dopo il pasto a base di frutta (PSM) e dopo la soluzione zuccheria (MSM).

4.2.4 variazioni della concentrazione di acido salicilico e acido ferulico

La variazione dei livelli sierici di acido salicilico e ferulico è stata valutata durante la prova sperimentale PESCA, nei tempi t_0 , t_{30} , t_{60} , t_{90} , t_{120} e t_{180} (Figura 4.12-4.13).

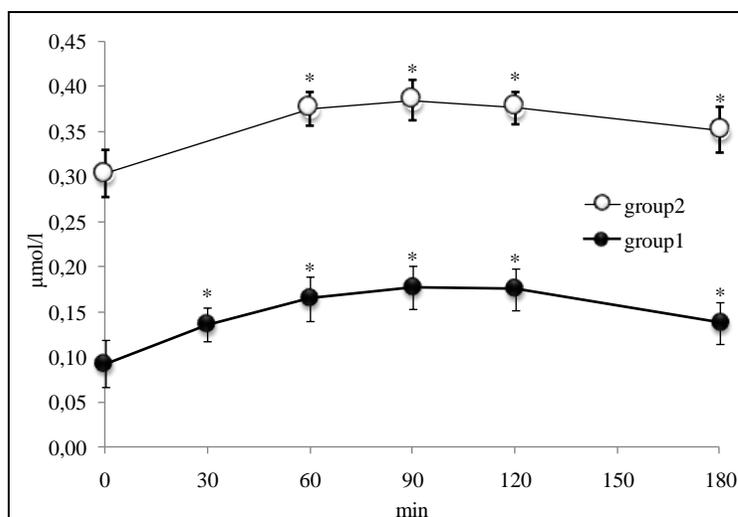


Figura 4.12 Andamento delle concentrazioni ematiche di acido salicilico dopo l'assunzione dell'omogeneizzato di pesca (PSM) in soggetti che si sono astenuti dal consumo di frutta e verdura il giorno prima del test (Gruppo 1, n = 16), e nei soggetti che hanno mantenuto la dieta abituale (Gruppo 2, n = 10) *: $p < 0,05$ vs t_0 .

La concentrazione basale di SA era inferiore ($p < 0,001$) nel Gruppo 1 ($0,09 \pm 0,02 \mu\text{mol/L}$) rispetto al Gruppo 2 ($0,30 \pm 0,03 \mu\text{mol/L}$). Dopo l'ingestione di frutta i livelli SA nel Gruppo 1 sono aumentati in modo significativo dopo 30 e 60 minuti ($p < 0,001$) e hanno raggiunto il picco a 90 min ($p < 0,01$) a $0,18 \pm 0,015 \mu\text{mol/L}$. Due ore dopo l'ingestione del pasto PSM i livelli plasmatici di SA tendevano a ridursi, rimanendo, tuttavia, al di sopra del valore basale ($0,14 \pm 0,01 \mu\text{mol/L}$), $p < 0,05$) anche dopo 3 ore. Nel Gruppo 2, dopo l'ingestione di PSM, l'andamento delle concentrazioni ematiche del SA era simile a quella del Gruppo 1, raggiungendo sempre la concentrazione massima ($0,38 \pm 0,02 \mu\text{mol / L}$), $p < 0,05$) a 90 min, e diminuendo subito dopo ma mantenendosi sempre al di sopra del valore basale ($0,35 \pm 0,03 \mu\text{mol/L}$) $p < 0,01$) dopo 3 ore.

Le variazioni dei livelli sierici di acido ferulico sono state valutate solo nella prova sperimentale PESCA e nei tempi t_0 , t_{30} , t_{60} , t_{90} , t_{120} e t_{180} (Figura 4.2).

Tabella 4.11 Concentrazioni sieriche dell'acido ferulico dopo l'assunzione di PSM

FA	t0	t30	t60	t90	t120	t180
Media (nM)	28,81	34,40	29,07	31,87	34,39	29,36
ES	3,46	3,46	3,46	3,32	3,46	3,46

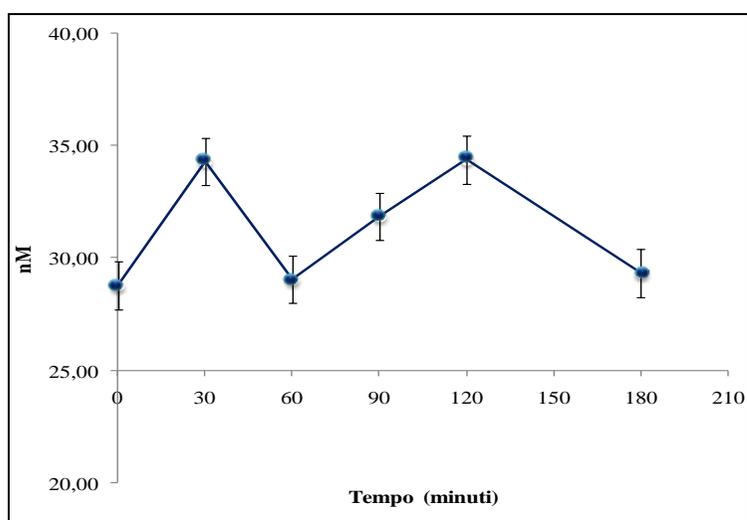


Figura 4.13 Andamento delle concentrazioni ematiche dell'acido ferulico dopo l'assunzione dell'omogeneizzato di pesca PSM.

La concentrazione basale (t_0) media osservata è stata di $28,81 \pm 4,34$ nM con una variabilità interindividuale che va da 8,49 nM a 58,76 nM.

Nelle tre ore successive all'assunzione dell'omogeneizzato di pesca, è stato riscontrato un andamento delle concentrazioni ematiche caratterizzato da due picchi (34,40 nM e 34,39 nM), ai tempi t_{30} e t_{120} , seguiti da riduzioni dei livelli di FA prossimi al livello basale. Questo fenomeno potrebbe essere attribuito alla forma con cui FA si presenta nella pesca. Infatti, mentre l'acido

ferulico libero è immediatamente assorbito nel primo tratto del piccolo intestino, i diferulati richiedono l'azione di specifiche idrolasi e sono assorbiti solo nell'ultimo tratto dell'intestino tenue. Dall'entità dei picchi si potrebbe altresì ipotizzare che nella pesca FA e i suoi derivati siano presenti in concentrazioni molto simili.

Con l'assunzione del pasto a base di frutta non sono evidenti variazioni significative delle concentrazioni sieriche di acido ferulico rispetto al valore basale.

4.2.5 Relazione tra livello di mediterraneità della dieta e concentrazioni di acido salicilico e ferulico circolanti in soggetti sovrappeso e obesi

4.2.6 Analisi del Mediterranean Score

Nel presente studio sono stati reclutati 109 pazienti. A tutti è stato sottoposto un questionario per valutare l'aderenza al regime dietetico mediterraneo. Nove di essi sono stati esclusi poiché non lo hanno compilato interamente.

In figura 4.14 è riportata la distribuzione dei Med Score dei restanti 100 pazienti. Analisi del Mediterranean Score

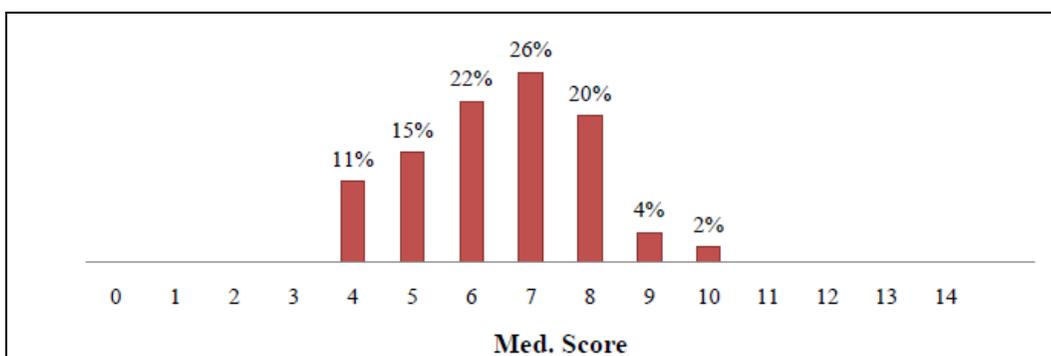


Figura 4.14 Distribuzione dei punteggi di mediterraneità della dieta di 100 pazienti

Il 48% dei soggetti presentava un Med Score compreso tra 6 e 7, e solo 6 soggetti su 100 presentavano una buona aderenza alla dieta mediterranea (punteggio ≥ 9).

Nella tabella 4.12 sono riportate le caratteristiche antropometriche dei 100 pazienti.

Tabella 4.12 Caratteristiche antropometriche dei 100 pazienti

Età (anni)	Peso (Kg)	Altezza (m)	BMI (Kg/m²)	CV (cm)	Body Fat %
40,97±13,94	85,55±23,34	168,10±24,97	29,75±6,50	97,28±22,44	35,53±7,75

Dal campione iniziale di 100 soggetti sono stati esclusi coloro che assumevano farmaci antinfiammatori, antiaggreganti e presidi dermatologici.

Nella selezione finale dei pazienti, è stata assegnata la priorità a coloro che mostravano un punteggio di mediterraneità più basso (≤ 5) e più alto (≥ 8): il campione finale risultava quindi costituito da 32 soggetti, 21 femmine e 11 maschi.

Di essi 13 presentavano un Med Score ≤ 5 , 5 un Med Score di 6-7, e 14 un Med Score ≥ 8 . Dall'analisi scomposta del questionario, condotta considerando i singoli alimenti caratteristici del regime mediterraneo, è emerso che i 32 pazienti consumavano quotidianamente 1,16±1,21 frutti e 1,08±0,77 porzioni di verdura, equivalenti a circa 220g di verdura. Il numero di cucchiaini di olio utilizzati come condimento o durante la preparazione dei piatti era di 3,19±2,04. Risultava infine che soli 4 soggetti su 32 (12.5%) consumavano abitualmente pane, pasta e cereali integrali.

4.2.7 Stato nutrizionale e di salute dei soggetti

Nella tabella di seguito riportata sono riassunte le caratteristiche antropometriche dei 32 pazienti.

Tabella 4.13 Caratteristiche antropometriche del campione finale (31 pazienti)

Età (anni)	Peso (Kg)	Altezza (m)	BMI (Kg/m²)	CV (cm)	Body Fat %
39,84±10,64	86,86±24,27	170,00±9,76	29,54±5,42	97,67±18,48	35,60±6,45

Il campione presentava un'età media di $39,84 \pm 10,64$ anni (18- 65 anni), le donne $41,86 \pm 11,75$ anni e gli uomini $36,00 \pm 7,07$ anni.

In base al calcolo del BMI: il 25% dei soggetti risultava essere normopeso, il 28% sovrappeso, il 35% obeso di 1°, il 9% obeso di 2° e il 3% obeso di 3°. Nella figura sottostante è riportata la distribuzione dei pazienti in funzione del loro indice di massa corporea.

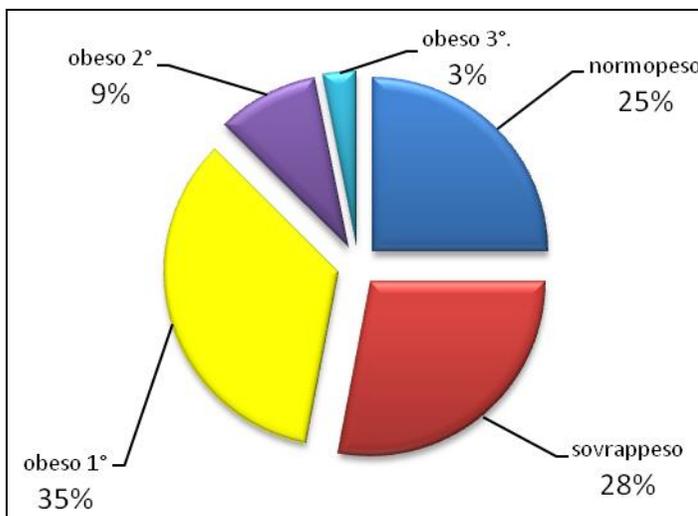


Figura 4.15 Distribuzione dei soggetti in base al BMI.

Alla prima visita le donne presentavano un BMI di $27,50 \pm 4,09$ Kg/m² e gli uomini di $33,45 \pm 5,70$ Kg/m².

Il valore medio di circonferenza vita ($97,67 \pm 18,48$ cm) era di $89,1 \pm 11,86$ cm nelle donne e $115,73 \pm 17,04$ cm negli uomini, valori in entrambi i casi superiori ai criteri definiti dall'International Diabetes Federation (IDF 2005, Tab. 6.17) per la sindrome metabolica.

Nella tabella seguente sono riportate le misurazioni plicometriche.

Tabella 4.14 Misurazioni plicometriche del campione finale

Plica bicipitale (cm)	Plica tricipitale (cm)	Plica sottoscapolare (cm)	Plica sovrailiaca (cm)
16,18±8,27	26,52±8,67	30,78±10,73	36,16±7,68

I pazienti presentavano una percentuale di grasso corporeo di 35,60±6,45%, 37,98±5,65% nelle donne e 31,06±5,54% negli uomini, anche in questo caso superiori ai valori di riferimento (23-25% per le donne e 15-18% per gli uomini).

La misurazione e la distribuzione del tessuto adiposo misurate con l'ecografia addominale sono riportate nella tabella seguente:

Tabella 4.15 Distribuzione del tessuto adiposo nel campione

Tessuto adiposo viscerale (cm)	Tessuto adiposo sottoc. preepatico (cm)	Tessuto adiposo sottoc. sottosternale (cm)	Tessuto adiposo sottoc. sottombelicale (cm)
5,68±2,83	1,56±0,67	2,24±0,91	3,29±1,20

La pressione arteriosa diastolica era di 77,66±10,47 mmHg e quella sistolica di 124,37±12,99 mmHg.

Nella tabella seguente sono riportati gli esiti degli esami ematochimici:

Tabella 4.16 Parametri ematochimici analizzati

	Media	ES
Colesterolo totale (mg/dL)	210,03	37,11
HDL (mg/dL)	60,25	15,56
LDL (mg/dL)	126,69	30,93
Trigliceridi (mg/dL)	109,41	79,25
Glicemia (mg/dL)	93,00	11,47
Insulina (μIU/mL)	12,35	11,71
TSH (μIU/mL)	2,36	1,40
FT4 (pmol/L)	11,43	2,56
GPT (IU/L)	24,94	14,39
GOT (IU/L)	19,94	4,87
γGT (IU/L)	27,27	29,45
Azotemia (mg/dL)	34,09	6,19
Acido urico (mg/dL)	5,11	1,53
Creatinina (mg/dL)	0,75	0,15
WBC (1000.000/μL)	6,78	1,39

RBC (1000.000/μL)	4,86	0,54
HB (g/dL)	14,42	1,29
MCV (fL)	88,33	5,98
PCR (mg/L)	2,18	2,20
SA (nM)	113,80	75,94
FA (nM)	71,67	27,99
Vit C (mg/dL)	1,28	0,42

In accordo con i criteri definiti dall'IDF, 5 pazienti su 32 presentavano la Sindrome Metabolica.

Tabella 4.17 Definizioni e criteri per la diagnosi di Sindrome Metabolica (IDF, 2005).

Glucosio	≥ 100 mg/dL o precedente diagnosi di Diabete Mellito
Ipertensione	$\geq 135/85$ mmHg o assunzione di anti-ipertensivi
Ipertrigliceridemia	≥ 150 mg/DL
Colesterolo HDL	<40 mg/dL uomini; <50 mg/dL donne
Obesità centrale	Circonferenza vita >94 cm negli uomini; >80 cm nelle donne
Criteri per la diagnosi	Obesità centrale+2 qualsiasi degli altri criteri

4.2.8 Relazione tra mediterraneità della dieta, stato nutrizionale e concentrazioni plasmatiche di SA, FA e VitC

Le concentrazioni di acido salicilico, acido ferulico e vitamina C rilevate nei 32 pazienti sono state rispettivamente di $113.80 \pm 75.94 \text{ nm}$, $0,07 \pm 0,03 \text{ } \mu\text{M}$ e $72,67 \pm 23,85 \text{ } \mu\text{M}$.

In seguito alla suddivisione del campione in funzione dell'aderenza alla dieta mediterranea, i pazienti con un Med Score ≥ 8 mostravano livelli circolanti di acidi salicilico, ferulico e vitamina C superiori rispetto a quelli riscontrati nel gruppo di soggetti avente un punteggio ≤ 5 , differenza che, tuttavia, non è risultata essere statisticamente significativa.

Dall'analisi condotta considerando solo i pazienti che presentavano un Med Score ai limiti, estremi della distribuzione ovvero ≤ 5 e ≥ 8 (Tabella 4.18), emerge che BMI, la circonferenza braccio, le pliche bicipitale-tricipitale-sottoscapolare, il tessuto adiposo sottocutaneo, la pressione arteriosa, la glicemia e la proteina C reattiva sono significativamente più elevati nei soggetti con un Med Score ≤ 5 . Inoltre sempre in questa classe di pazienti vi sono i valori più bassi di colesterolo HDL.

Tabella 4.18 Suddivisione dei soggetti analizzati in base al Med Score e differenze tra i due gruppi.

	Med Score ≤ 5 (n=13)		Med Score ≥ 8 (n=14)		t-test
	Media	ES	Media	ES	p-value
Età	41,69	12,73	40,36	8,43	0,749
Peso (Kg)	94,94	24,30	79,94	22,24	0,106
BMI (kg/m2)	31,99	4,23	27,31	5,44	0,019
Circ. Vita (cm)	104,09	14,64	92,86	20,33	0,125
Circ. polso (cm)	16,85	1,55	16,46	1,87	0,542
Circ. braccio (cm)	37,08	5,03	32,25	4,44	0,014
P A sist (mmHg)	130	7,36	120,00	15,32	0,043
P A diast (mmHg)	83,46	7,18	73,57	10,82	0,010
T. A. viscerale (cm)	6,59	2,99	5,00	3,00	0,207
T. A. preepatico (cm)	1,76	0,66	1,33	0,64	0,119
T. A. sottosternale (cm)	2,71	0,83	1,90	0,90	0,031
T. A. sottombelicale (cm)	3,69	1,04	2,29	1,29	0,123
B F %	37,55	6,44	34,74	6,70	0,278
Plica bicipitale (mm)	20,39	9,50	13,16	6,35	0,027

Plica tricpitale (mm)	31,65	7,56	23,00	7,90	0,008
Plica sovrailliaca (mm)	39,93	6,42	33,76	8,37	0,077
Plica sottoscapolare (mm)	36,58	8,69	25,79	10,85	0,013
Colesterolo totale (mg/dL)	210,31	35,65	212,5	34,5	0,872
HDL (mg/dL)	54,54	14,66	66,07	13,69	0,045
LDL (mg/dL)	130,38	26,99	123,57	30,00	0,542
Trigliceridi (mg/dL)	138,31	111,68	89,29	40,50	0,136
Glicemia (mg/dL)	99,15	13,47	88,07	8,21	0,015
Insulina (μIU/mL)	12,93	8,60	11,75	11,50	0,810
TSH (μIU/mL)	2,95	1,63	1,71	0,59	0,013
FT4 (pmol/L)	11,57	1,24	10,94	3,44	0,539
GPT (IU/L)	27,25	16,12	20,66	11,92	0,236
GOT (IU/L)	19,71	4,49	19,21	5,61	0,804
γGT (IU/L)	37,55	40,47	20,24	18,67	0,161
Azotemia (mg/dL)	32,00	4,74	34,93	5,82	0,166
Acido urico (mg/dL)	5,70	1,63	4,63	1,39	0,079
PCR (mg/L)	3,68	3,24	1,62	1,83	0,050
SA (μM)	0,10	0,10	0,12	0,06	0,615

FA (nM)	63,42	12,84	80,51	39,31	0,148
Vit C (mg/dL)	1,17	0,34	1,37	0,48	0,246

Come mostrato dai grafici seguenti, il livello di aderenza al regime alimentare mediterraneo è risultato essere correlato con i parametri antropometrici ed ematochimici riportati in Tabella 4.19.

Tabella 4.19 Relazione tra Med Score e stato di nutrizione

Med Score		
	r	p-value
BMI (kg/m²)	0,395	0,025
P A diast (mmHg)	0,391	0,027
Plica bicipitale (mm)	0,423	0,016
Plica tricipitale (mm)	0,512	0,003
Plica sottoscapolare (mm)	0,523	0,004
Σ pliche (mm)	0,363	0,041
Circ. braccio (cm)	0,432	0,014
T. A. sottoc.sottostern(cm)	0,471	0,010
Glicemia (mg/dL)	0,445	0,011
TSH	0,399	0,024

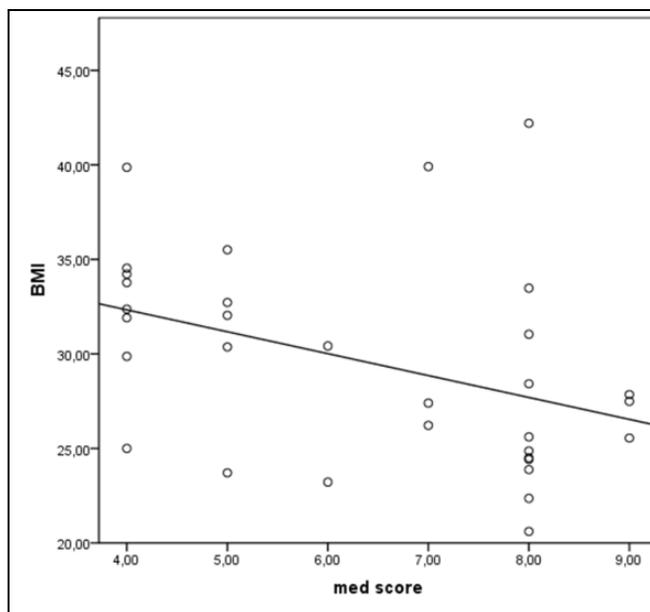


Figura 4.16 Correlazione medscore-BMI

Come riportato nella tabella seguente, il livello di aderenza al regime alimentare mediterraneo non risulta correlato alle concentrazioni plasmatiche di acido salicilico, acido ferulico e vitamina C, sebbene all'aumentare dell'aderenza alla dieta mediterranea questi siano ritrovati nel plasma in concentrazioni maggiori (Tabella 4.18).

Tabella 4.20 relazione tra medscore e concentrazioni ematiche di SA, FA e vit c

Med Score		
	r	p-value
SA (µM)	0,060	0,744
FA (nM)	0,248	0,172
Vit C (mg/dL)	0,222	0,222

In seguito all'analisi e alla quantificazione del consumo quotidiano di frutta e verdura dei 32 soggetti, sono mostrate in Tabella 4.21 e 4.22 le correlazioni significative riscontrate.

Tabella 4.21 Correlazioni con il n di porzioni di frutta

n. porzioni frutta		
	r	p-value
Circ. Vita (cm)	0,380	0,035
Vit C (mg/dL)	0,434	0,013
P A sist (mmHg)	0,338	0,028
FT4 (pmol/L)	0,438	0,012

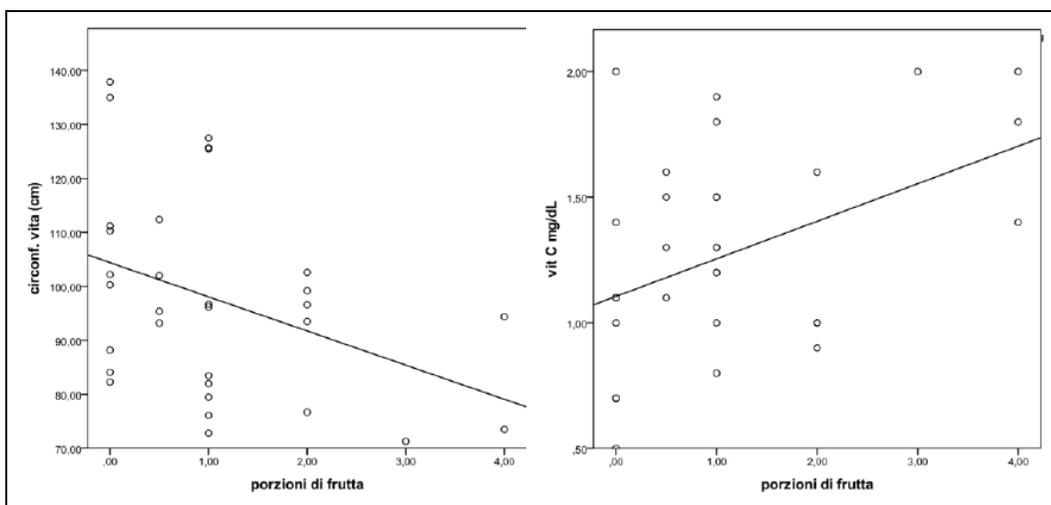


Figura 4.17 Correlazioni tra porzioni di frutta e circonferenza vita e Vit. C

Tabella 4.22 Correlazioni con il n di porzioni di verdura

n. porzioni verdura		
	r	p-value
P A sist (mmHg)	0,338	0,028
FT4 (pmol/L)	0,438	0,012

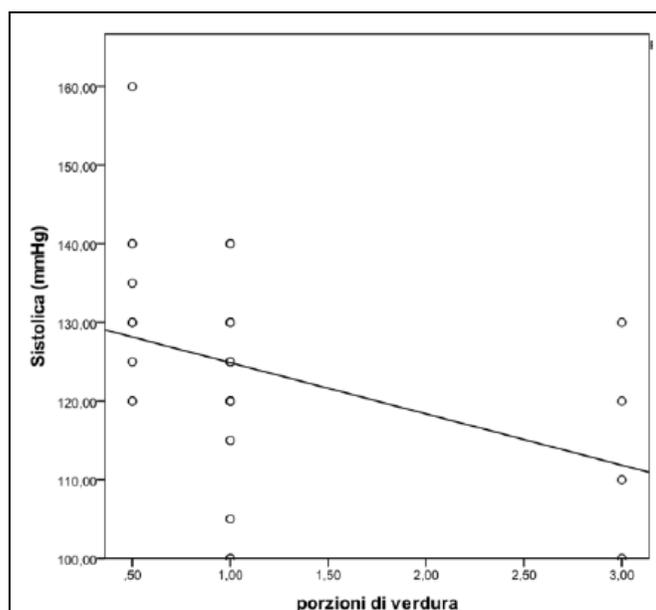


Figura 4.18 Correlazione tra porzioni di verdura e pressione sistolica

4.2.9 Relazioni tra concentrazioni plasmatiche di SA, FA, Vit C e stato nutrizionale

Le concentrazioni di acido salicilico sono risultate essere negativamente correlate sia con la misura della plica bicipitale sia con quella tricipitale; è stata inoltre riscontrata una differenza tra le concentrazioni di acido salicilico ritrovate nel siero di soggetti fumatori che sono significativamente inferiori rispetto a quelle riscontrate nei non fumatori.

Tabella 4.23 correlazioni con l'acido salicilico

Acido Salicilico		
	r	p-value
Plica bicipitale (mm)	0,438	0,012
Plica tricipitale	0,373	0,035
Fumatore	0,348	0,050

Figura 4.19 Correlazione tra SA e plica bicipitale

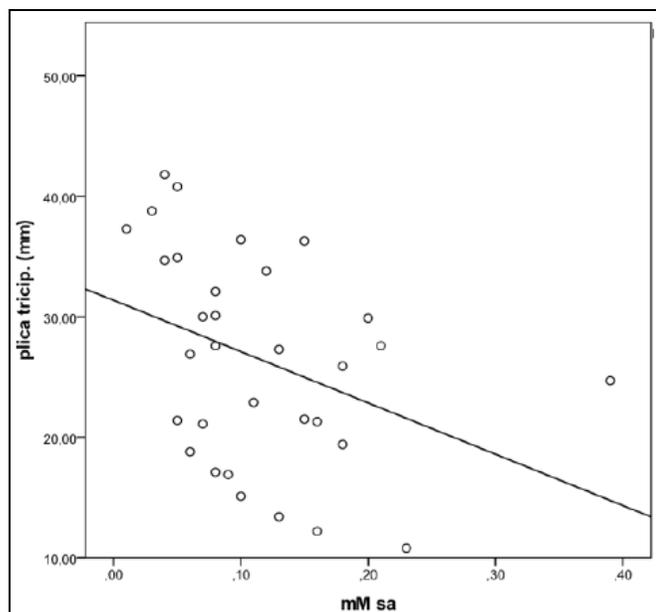


Figura 4.20 correlazione tra SA e plica tricipitale

L'acido ferulico presentava una correlazione significativa con i parametri ematochimici riportati nella seguente tabella:

Tabella 4.24 correlazioni con l'acido ferulico

Acido ferulico		
	r	p-value
GOT (IU/L)	0,349	0,026
WBC (1000.000/μL)	0,525	0,002
MCV (fL)	0,437	0,014

La vitamina C presentava livelli sierici significativamente più elevati in soggetti con minore spessore di tessuto adiposo sottocutaneo e viscerale, minore circonferenza vita, glicemia e insulinemia, come mostrato in Tabella 4.25.

Tabella 4.25 Correlazioni con Vit. C

Acido ferulico		
	r	p-value
Peso (kg)	0,462	0,008
BMI (kg/m2)	0,458	0,008
P A sist (mmHg)	0,528	0,002
Plica bicipitale (mm)	0,527	0,002
Plica sovrailiaca (mm)	0,568	0,002
Circ. Vita (cm)	0,606	<0,001
Circ. polso (cm)	0,479	0,006
Circ. braccio (cm)	0,443	0,011
T. A. viscerale (cm)	0,389	0,037
T. A.s. preepatico (cm)	0,443	0,016
Glicemia (mg/dL)	0,375	0,034
Insulina (μIU/mL)	0,433	0,013
GPT (IU/L)	0,437	0,012
GOT (IU/L)	0,379	0,033

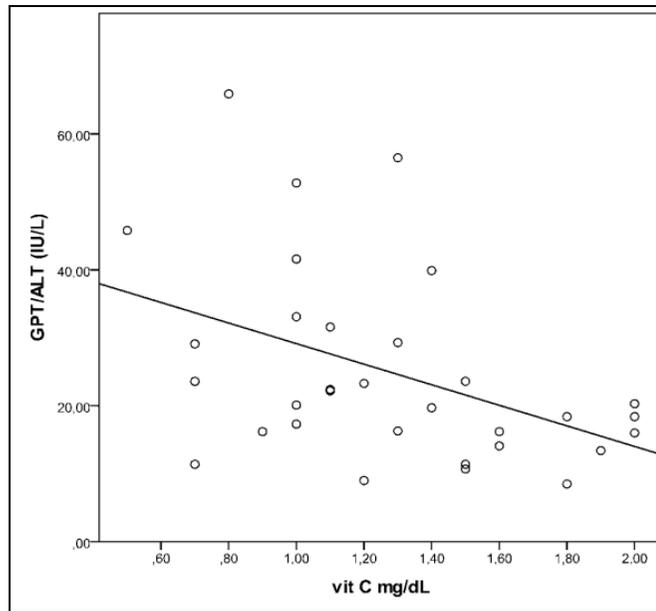


Figura 4.21 Correlazione Vit.C-GPT

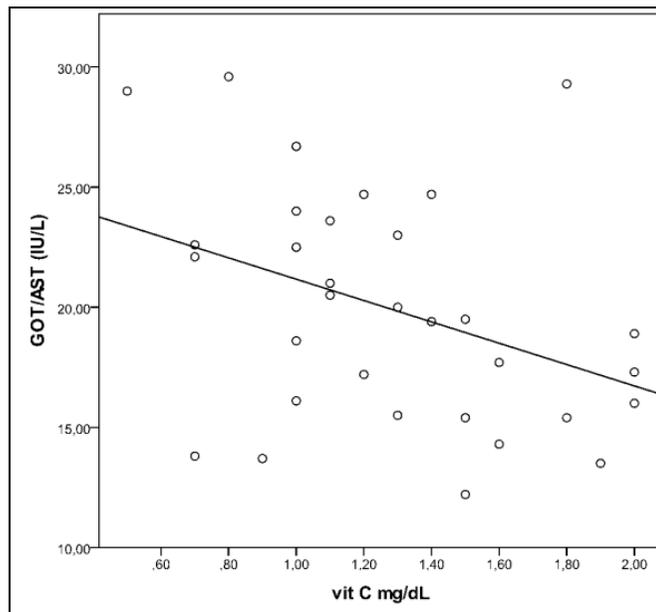


Figura 4.22 Correlazione Vit.C-GOT.

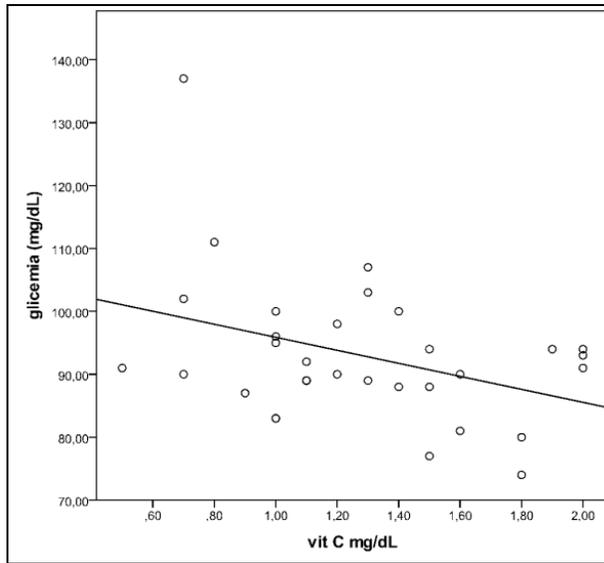


Figura 4.23 Correlazione Vit.C-Glicemia

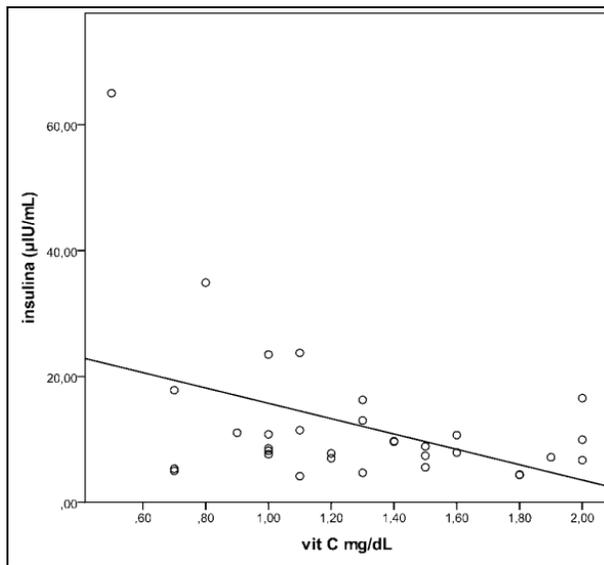


Figura 4.24 Correlazione Vit.C-Insulinemia

5 Conclusioni

L'eventualità che gli alimenti abbiano un valore che vada di là dalle proprietà strettamente nutritive, e che possano contribuire al miglioramento del benessere e dello stato di salute, si è ormai radicata nella popolazione e nel mondo scientifico. Numerosi sono i lavori scientifici diretti verso questa categoria di alimenti e crescente è l'interesse dei consumatori verso nuovi composti bioattivi con la potenzialità di ottimizzare lo stato di salute e il benessere individuale.

Scopo del presente lavoro è stato quello di studiare la relazione tra il consumo di frutta e verdura, componenti tipici del regime dietetico di tipo mediterraneo, e le concentrazioni ematiche degli acidi salicilico e ferulico, due composti fenolici ampiamente diffusi nel mondo vegetale e dalla comprovata azione protettiva sull'uomo. Il primo passo per poter indagare tale relazione è stato sviluppare e validare una metodica analitica per la determinazione dell'acido salicilico e dell'acido ferulico nel sangue umano, che avesse una miglior selettività e sensibilità rispetto alle tecniche analitiche ad oggi utilizzate, quali l'HPLC con rivelatore ultravioletto o elettrochimico, presenti in letteratura. A tale scopo è stata adoperata la gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa. Inoltre, nell'analisi quantitativa è stato corretto l'effetto matrice adoperando concentrazioni note di d4-SA e di d3-FA, standard interni marcati con isotopi stabili. Questi, avendo le stesse proprietà chimico fisiche del SA e del FA naturalmente presenti negli alimenti, si comportano come questi ultimi nelle fasi di estrazione, derivatizzazione e separazione gas-cromatografica, ma avendo un rapporto m/z (massa/carica) più alto rispetto ai composti naturali sono riconosciuti dal rivelatore, lo spettrometro di massa, permettendo la correzione dell'effetto matrice. La combinazione di tali accorgimenti ci ha permesso di raggiungere limiti di quantificazione molto bassi, pari a 1,28ng per l'acido salicilico e 3,58ng per l'acido ferulico, rendendo idoneo questo metodo per la quantificazione dell'acido ferulico e dell'acido salicilico nel siero anche di soggetti che consumano ridotte quantità di alimenti di origine vegetale e/o che non fanno uso di farmaci contenenti salicilati né ferulati. Inoltre, i tempi di ritenzione relativamente brevi, l'ampio range dinamico lineare (0-20 ng sia per SA sia per FA) e le ridotte quantità di siero necessarie per l'analisi (200 μ L) lo rendono un metodo idoneo sia per studi di popolazione, dove si possono riscontrare concentrazioni ematiche piuttosto eterogenee, sia per la ricerca dove sono necessarie elevate precisione e accuratezza, dal momento che tale metodo è caratterizzato da una buona ripetibilità intra ed inter-giornaliera ed una percentuale di recupero prossima al 100%. Oltre a quanto sopra riportato,

la presenza nei metodi di una fase di deproteinizzazione e di una fase di idrolisi enzimatica con β -glucuronidasi, permette la determinazione del SA e del FA legati alle proteine plasmatiche, del SA e del FA coniugati con l'acido glucuronico durante le reazioni di fase 1, oltre al SA e al FA liberi nel plasma.

Data l'importanza farmacologica dell'acido salicilico e dell'acido ferulico, l'opportunità di poterli quantificare simultaneamente ci ha permesso di studiare se questi due composti bioattivi possano essere considerati due biomarker dell'esposizione al consumo di frutta e verdura nell'uomo.

I risultati ottenuti da questo studio confermano che l'acido salicilico è presente nel sangue umano indipendentemente dall'assunzione di farmaci a base di salicilati. Quest'affermazione è dimostrata dal fatto che in tutti i 26 soggetti sani in studio è stata riscontrata la presenza di acido salicilico circolante. Una ricerca condotta da Spadafranca *et al.* riporta che circa il 20% della variabilità delle concentrazioni ematiche di acido salicilico in soggetti sani a digiuno è attribuibile al consumo di frutta e verdura delle ultime 24 ore (figura 5.1) [1]. Per comprendere quale sia l'origine dell'acido salicilico che abbiamo ritrovato nei nostri soggetti, e per confermare e/o confutare la ormai crescente convinzione presente in letteratura che frutta e verdura ne siano le principali fonti di assunzione, una parte del nostro campione di volontari (n=16 su 36) si è astenuto dal consumo di frutta e verdura per 24 ore, mentre i restanti 10 soggetti hanno mantenuto la loro dieta abituale includendo frutta e verdura. Dalle analisi sul siero è emerso che nei soggetti che hanno potuto consumare liberamente frutta e verdura nelle 24 ore precedenti il prelievo, vi erano concentrazioni di SA tre volte superiori ($0,30 \pm 0,03 \mu\text{mol/L}$) rispetto agli individui che si erano astenuti dal consumo di frutta e verdura ($0,09 \pm 0,02 \mu\text{mol/L}$, $p < 0,05$).

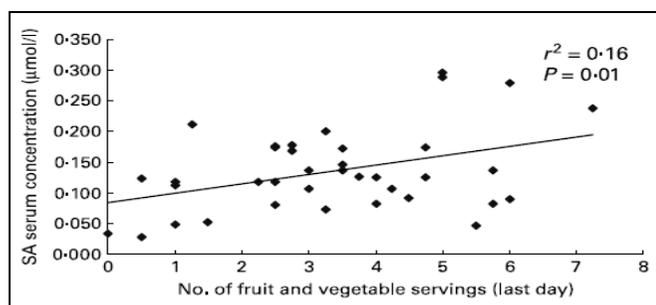


Figura 5.1 Relazione tra l'assunzione di frutta e verdura delle ultime 24h e concentrazioni di SA nel siero di 36 soggetti sani [1].

Questi risultati avvalorano l'ipotesi che frutta e verdura contribuiscono al pool dell'acido salicilico nell'uomo, influenzandone le concentrazioni ematiche nelle ore successive ai pasti. Già Blacklock *et al.* nel passato avevano monitorato le concentrazioni di SA in soggetti vegetariani, non vegetariani e in pazienti che assumevano quotidianamente 75mg di Aspirina (tabella 5.1) ed era emerso che nei soggetti in cui frutta e verdura rappresentavano la base dell'alimentazione, come per i vegetariani, si potevano riscontrare elevate concentrazioni ematiche di acido salicilico, alla stregua di quelle presenti durante una terapia cronica con bassi dosaggi di Aspirina[2].

Tabella 5.1 Concentrazione di acido salicilico nel siero dei vari gruppi di persone [2].

	Non vegetariani	Vegetariani	Pazienti che assumono 75mg/dì die Aspirina
Mediana	0.07	0.11	10.03
range	(0.02-0.20)	(0.04-2.47)	(0.23-25-40)
numerosità	n=39	n=37	n=14

Un altro risultato importante di questo studio è stato ritrovare presenza di acido salicilico nel siero di soggetti che non hanno né assunto farmaci a base di salicilati, né hanno consumato frutta e verdura per 24 ore. È noto che l'acido salicilico ha un'emivita media di 3-6 ore quando presente nel sangue in concentrazioni inferiori ai 300 µg/mL (1440-2100 µmol/L), mentre a concentrazioni più elevate il suo metabolismo rallenta a causa della progressiva saturazione dei sistemi enzimatici

di fase 1 che metabolizzano i salicilati, con conseguente allungamento dell'emivita fino alle 15-30 ore [3]. Nel nostro studio le concentrazioni basali ritrovate nel campione di volontari sono oltre 10.000 volte inferiori, pertanto la presenza di tale SA, potrebbe essere attribuibile a meccanismi alternativi come ad una biosintesi endogena, che l'uomo attua a partire da precursori quali l'acido benzoico, come recentemente suggerito da Paterson *et al.* [4]. Se così fosse, l'uomo avrebbe a disposizione una quantità costante di substrati per la biosintesi di acido salicilico in quanto l'acido benzoico, oltre a essere naturalmente presente negli alimenti vegetali, in quanto precursore degli acidi cinnamici e fenolici, è sempre più spesso aggiunto agli alimenti come conservante (E210-E219 acido benzoico e i suoi sali).

Nel nostro studio abbiamo dimostrato che un pasto a base di pesca, equivalente a due porzioni di frutta, è in grado di fornire una quantità di SA pari a $0,06 \pm 0,001$ mg/100g che, seppur modesta rispetto alle quantità di acido acetilsalicilico clinicamente utilizzate (che sono di due ordini di grandezza superiore rispetto a quelli presenti negli alimenti vegetali), è in grado di produrre un incremento dei livelli circolanti di SA del 100% già nella prima ora dopo il pasto; e tale incremento perdura per oltre tre ore dal termine del pasto. Inoltre, le concentrazioni massime di SA riscontrate dopo 90 minuti dall'ingestione del pasto sia nei soggetti a dieta libera il giorno precedente l'ingestione del pasto a base di frutta ($0,38 \pm 0,02$ $\mu\text{mol} / \text{L}$) collimano con quelle che si possono ritrovare nei sia nei soggetti che assumono quotidianamente bassi dosaggi di acido acetilsalicilico [2]. Inoltre, l'andamento delle concentrazioni ematiche dell'acido salicilico dopo l'assunzione delle due porzioni di frutta riscontrato nel nostro lavoro, anche nei soggetti che non hanno consumato FV nelle 24 ore precedenti, è in accordo con i risultati ottenuti precedentemente da Paterson *et al.* dopo che un solo soggetto aveva consumato circa 545 g di una zuppa vegetale contenente 17,24 mg/100g di salicilati totali [5].

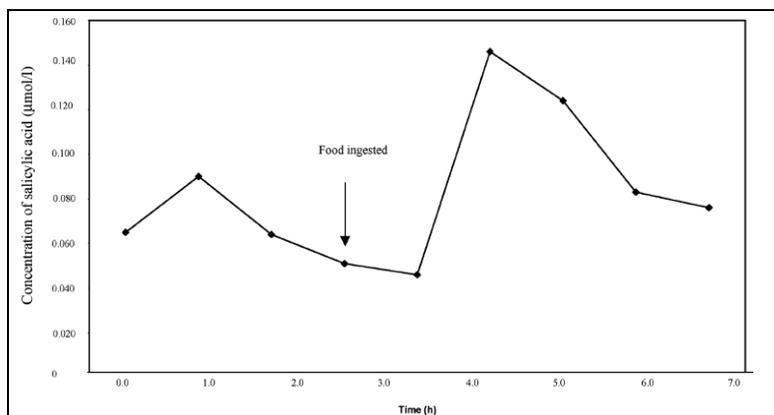


Figura 5.2 Concentrazione di acido salicilico nel siero di un volontario prima e dopo il consumo di alimenti ricchi di salicilati.

Gli stessi livelli ematici di acido salicilico circolanti da noi riscontrati ($0,30 \mu\text{mol/L}$) dopo una somministrazione in acuto, sono stati ritrovati anche nel campione studiato ($n=11$) da Duthie *et al.* dopo un'assunzione continuata di 15 giorni di 250 mL di succo di mirtillo rosso contenente $0,70 \pm 0,02 \text{ mg}/100\text{g}$ di SA (tabella 5.2) [6].

Tabella 5.2 concentrazioni di SA dopo 15 gg di somministrazione di succo di mirtillo

Somministrazione	Pre-somministrazione		Post-somministrazione	
	settimana -1	0 settimana 0	Settimana +1	Settimana +2
Succo di mirtillo n=11	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01	$0.34 \pm 0.20^*$
Placebo n=9	0.09 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.17 ± 0.06	$0.10 \pm 0.02^*$
media \pm SE *: $p < 0,05$ mirtillo vs placebo				

È interessante notare che le concentrazioni di SA raggiunte nel nostro studio sono simili a quelle trovati da Xu et al [7] per essere efficaci nell'inibire la trascrizione del gene delle ciclossigenasi-2 (COX-2) nelle Human Umbilical Vein Endothelial cellule (HUVE). Queste osservazioni suggeriscono che i livelli circolanti SA trovato nel nostro studio dopo l'assunzione di

frutta potrebbe svolgere in vivo un ruolo biologico in termini di effetto anti-infiammatorio che va oltre all'effetto derivante dall'azione dell'acidoacetilsalicilico.

Il pasto è considerato uno stimolo pro-infiammatorio [8,9]: studi hanno messo in evidenza un effetto pro-infiammatorio di alcune matrici alimentari [10] che producono un incremento sia della traslocazione di NF- κ B nel nucleo sia dell'espressione delle citochine infiammatorie. Nel nostro studio abbiamo analizzato le risposte metaboliche e infiammatorie ad un pasto di carboidrati quando veicolati attraverso una matrice di frutta e una soluzione acquosa. La soluzione acquosa ha determinato un'escursione glicemica maggiore, con una tendenza ad una ipoglicemia reattiva che ha portato ad una soppressione di insulina maggiore e ad un rebound degli FFA già dopo tre ore. Per quanto riguarda la risposta infiammatoria, pur non avendo trovato alcuna differenza nei livelli plasmatici di CRP, abbiamo riscontrato che se una quantità di carboidrati è somministrata attraverso la frutta determina un minor ($p < 0,05$) incremento dell'IL-6 rispetto all'essere somministrata tramite una soluzione acquosa.

Lo scopo della terza parte del presente lavoro è stato quello di studiare se le concentrazioni ematiche degli acidi salicilico e ferulico presenti in frutta, verdura, cereali integrali, e che presentano un'azione antiossidante e antinfiammatoria, varino in funzione del pattern di mediterraneità della dieta, prendendo come composto bioattivo di paragone la Vitamina C. Inoltre, è stato studiato se i livelli di acido salicilico e acido ferulico plasmatici possano rappresentare dei predittori di mediterraneità della dieta e dello stato di nutrizione dei soggetti reclutati.

Le concentrazioni di acido salicilico rilevate dal presente studio ($0,11 \pm 0,07 \mu\text{M}$) sono risultate sovrapponibili a quelle riportate in letteratura in soggetti vegetariani ($0,11 \mu\text{M}$. Range: $0,07$ - $2,47 \mu\text{M}$) [2]. Le concentrazioni riscontrate in coloro che presentano una maggior aderenza alla dieta mediterranea, tuttavia, presentano valori medi significativamente inferiori rispetto a quelle ritrovati in soggetti che assumono quotidianamente basse dosi di aspirina ($10,03 \mu\text{M}$).

L'acido ferulico, pur essendo presente negli alimenti in concentrazioni più elevate rispetto all'acido salicilico, nel plasma dei soggetti analizzati presenta quantità dosabili, ma in quantità sempre inferiori rispetto a quest'ultimo. Basse concentrazioni plasmatiche di acido ferulico, spesso ai limiti di rilevabilità, sono ben documentate in letteratura dagli articoli che ne studiano la biodisponibilità [11-14]. Nella maggior parte dei lavori, le concentrazioni plasmatiche di acido ferulico raggiungono un picco massimo (150 - 210 nM) nelle prime tre ore dall'ingestione di alcuni

alimenti ricchi in questo composto, diminuiscono rapidamente entro le 6 ore e, successivamente, in modo più lento, raggiungono entro le 24 ore successive concentrazioni plasmatiche stabili comprese tra 10 e 40 nM.

La vitamina C è stata ritrovata in concentrazioni plasmatiche più elevate rispetto a quelle dei due composti fenolici, e in seguito all'analisi dei descrittori di mediterraneità si può concludere che un'elevata aderenza alla dieta mediterranea sia in grado di influenzare positivamente le concentrazioni di vitamina C rilevate nel plasma.

I livelli plasmatici di vitamina C presentando una forte correlazione con il consumo di frutta, si rivelano i migliori predittori del consumo di tali alimenti.; quest'ultima, mostrando correlazione con circonferenza vita, tessuto adiposo viscerale e tessuto adiposo sottocutaneo, potrebbe inoltre rappresentare anche un valido predittore dei descrittori dello stato di nutrizione in eccesso ponderale.

Le concentrazioni di acido salicilico risultano invece associate alla quantità di tessuto adiposo sottocutaneo e all'abitudine al fumo, indicando l'opportunità di esplorare ulteriormente il potenziale valore di questo biomarker nella definizione del rischio cardiometabolico.

5.1 Bibliografia

1. Spadafranca A, Bertoli S, Fiorillo G, Testolin G, Battezzati A (2007) Circulating salicylic acid is related to fruit and vegetable consumption in healthy subjects. *Br. J. Nutr.* 98: 802–806.
2. Blacklock CJ, Lawrence JR, Wiles D (2001) Salicylic Acid in the serum of subjects not taking Aspirin. Comparison of salicylic acid concentrations in the serum of vegetarians, Non-vegetarians, and patients taking low dose Aspirin. *J. Clin. Pathol.* 54: 553–555.
3. Craig CR., *Modern Pharmacology With Clinical Applications*. Editore: Lippincott Raven; Sesta edizione (gennaio 2004).
4. Paterson J, Baxter G, Dreyer J (2008) Salicylic acid sans aspirin in animals and man: persistence in fasting and biosynthesis from benzoic acid. *J. Agric Food Chem.* 56: 11648-11652.
5. Paterson J, Srivastava R (2006) Salicylic Acid Content of Spices and Its Implications *J. Agric. Food Chem.*, 54: 2891-2896.
6. Duthie G, Paterson J (2005) Increased Salicylate Concentrations in Urine of Human Volunteers after Consumption of cranberry Juice. *J Agric. Food Chem.* 53: 2897-2900
7. Xu XM, Sansores-Garcia L, Chen XM (1999) Suppression of inducible cyclooxygenase 2 gene transcription by Aspirin and sodium salicylate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 27: 5292–5297.

8. Mohanty P, Hamouda W, Garg R (2000) Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85: 2790-2793.
9. Mohanty P, Ghanim H, Hamouda W (2000) Both lipid and protein intakes stimulate increased generation of reactive oxygen species by polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells. *Am. J. Clin. Nutr.* 77: 767-772.
10. Aljada A, Mohanty P, Ghanim H (2004) Increase in intranuclear nuclear factor kB and decrease in inhibitor kB in mononuclear cells after a mixed meal: evidence for a proinflammatory effect. *Am. J. Clin. Nutr.* 79: 682-690.
11. Mattila P, Hellstrom J, Torronen R (2006) Phenolic acid in berries fruits and beverages. *J Agric Food Chem.* 54: 7193-7199.
12. Clifford MN (1999) Chlorogenic acids and other cinnamates: Nature, occurrence and dietary burden. *J Sc Food and Agric.* 79: 362-72.
13. Zhang ZE (1997) Mechanism of reaction of nitrogen dioxide radical with hydroxycinnamic acid derivatives: a pulse radiolysis study. *Free Radical Research* 29:13-16.
14. Graf E (2000) Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radical Biology and Medicine* 28: 1249-56.

6 Allegati

6.1 Allegato 1: Questionario di mediterraneità della dieta

01) Usa principalmente olio d'oliva/olio d'oliva extra-vergine come grasso da condimento?

Sì No

02) Quanto olio d'oliva consuma nella giornata? (incluso l'olio usato per cucinare, per condire le insalate, nei pasti fuori casa, etc; vedi immagine allegata)

<1 cucchiaino 1 - 3 cucchiaini 4 - 6 cucchiaini ≥ 6 cucchiaini

03) Quante porzioni di verdura consuma al giorno? (per porzione si intendono 200g, vedi immagini allegate, nel caso venisse consumata come contorno o condimento del primo piatto, va considerata come mezza porzione).

<1 1 ≥2

Specificare inoltre, se la si consuma prevalentemente cruda o cotta facendo riferimento alla modalità che si consuma prevalentemente. (NON rispondere se il consumo di verdura è <1).

cruda cotta

04) Quanti frutti e/o bicchieri di succo di frutta senza zucchero, consuma al giorno?

0 <1 1 2 ≥3

05) Quante porzioni di carne rossa, hamburger, o insaccati (prosciutto, salame, etc.) consuma al giorno? (per porzione si intendono 100 – 150g, vedi immagini allegate)

0 <1 ≥1

06) Quanto burro, margarina, o panna utilizza al giorno? (una porzione è equivalente a 12g)

0 <1 ≥1

07) Quante bicchieri di bevande zuccherate beve nell'arco della giornata?

0 bicchieri <1 bicchiere ≥1 bicchiere

08) Quanti bicchieri di vino beve durante la settimana? (un bicchiere equivale a 125ml, vedi immagine allegata)

0 bicchieri tra 1 e 2 bicchieri tra 3 e 7 bicchieri >7 bicchieri

09) Quante porzioni di legumi consuma alla settimana? (per porzione si intendono 150g, vedi immagine allegata)

0 <1 1 2 ≥3

10) Quante porzioni di pesce o molluschi e crostacei consuma alla settimana? (per porzione di pesce si intendono 100 – 150g, mentre per i molluschi e i crostacei si intendono 4 – 5 unità oppure 200g, vedi immagini allegate)

0 <1 1 2 ≥3

11) Quante volte alla settimana consuma prodotti da forno, sia commerciali che di pasticceria, come torte, biscotti, brioches, creme? (sono da escludere i prodotti fatti in casa)

0 <1 1 2 ≥3

12) Quante porzioni di noci, nocciole e arachidi consuma alla settimana? (per porzione si intendono 30g, vedi immagine allegata)

0 <1 ≥1

13) Consuma prevalentemente carne di pollo, tacchino, o coniglio, rispetto al vitello, manzo, maiale, o insaccati in genere? (se si è vegetariani rispondere no)

Sì No

14) Quante volte alla settimana consuma verdure, pasta, riso, o altri piatti preparati con soffritto (condimento preparato con pomodoro e cipolla, porro, o aglio e cotto con olio d'oliva)?

0 <1 1 ≥

6.2 Allegato 2

15) Quanti bicchieri o tazze di latte beve alla settimana? (un bicchiere/tazza equivale 150ml, vedi immagine allegata)

0 bicchieri <1 bicchiere da 1 a 3 bicchieri da 4 a 7 bicchieri > 7 bicchieri

Specificare inoltre quale tipologia di latte si consuma (NON rispondere se non si consuma latte)

intero parzialmente scremato scremato

16) Quante porzioni di yogurt consuma alla settimana? (una porzione equivale a un vasetto da 125ml, vedi immagine allegata)

0 vasetti <1 vasetto da 1 a 3 vasetti da 4 a 7 vasetti > 7 vasetti

Specificare inoltre quale tipologia di yogurt si consuma (NON rispondere se non si consuma yogurt)

intero parzialmente scremato scremato

17) Quante porzioni di formaggio consuma durante la settimana? (una porzione di formaggi stagionati equivale a 40g, mentre per i formaggi magri una porzione è uguale a 100g, vedi immagini allegate).

0 <1 da 1 a 3 da 4 a 7 >7

Utilizza parmigiano/grana grattugiato?

Sì No

Se sì quanti cucchiaini al giorno? (un cucchiaino equivale a 5g)

0 1 cucchiaino 2 cucchiaini ≥ 3 cucchiaini

18) Quanti bicchieri di birra beve durante la settimana? (un bicchiere equivale a 200ml, vedi immagine allegata)

0 bicchieri tra 1 e 2 bicchieri tra 3 e 7 bicchieri >7 bicchieri

19) Quante uova consuma alla settimana?

0 <1 1 2 ≥ 3

20) Quante volte consuma prodotti contenenti uova alla settimana (es. pasta all'uovo, pasta sfoglia...)?

0 <1 da 1 a 3 da 4 a 7 >7

21) Quante tazzine di caffè beve nell'arco della giornata? (vedi immagine allegata)

0 tazzine <1 tazzina 1 tazzina 2 tazzine ≥ 3 tazzine

22) Quante tazze di tè beve nell'arco della giornata? (una tazza equivale a 150ml, vedi immagine allegata)

0 tazze <1 tazza 1 tazza 2 tazze ≥ 3 tazze

23) Quanti cucchiaini di zucchero, zucchero di canna, fruttosio, miele o marmellata utilizza al giorno? (un cucchiaino equivale a 5g, vedi immagine allegata, per la marmellata 10 g)

0 cucchiaini <1 cucchiaino 1 cucchiaino 2 cucchiaini ≥ 3 cucchiaini

24) Quante volte alla settimana consuma pizza, pizza al trancio, focacce?

0 <1 1 2 ≥ 3

25) Quante volte alla settimana consuma cibo da fast food (tipo Mc Donald's)?

0 <1 1 2 ≥ 3

26) Quante volte alla settimana consuma prodotti da forno preparati in casa come torte, biscotti, brioche, creme (sono da escludere i prodotti commerciali e di pasticceria)?

0 <1 1 2 ≥3

27) Quante porzioni di pane, cracker o grissini consuma quotidianamente? (una porzione di pane equivale a 70g, vedi immagini allegate)

0 1-2 3-5 ≥6

Specificare inoltre quale tipologia di pane prevalentemente si consuma :

integrali raffinati

28) Quante porzioni di pasta o riso consuma quotidianamente? (una porzione di pasta/riso equivale a 80g, vedi immagini allegate)

0 1-2 3-5 ≥6

Specificare inoltre quale tipologia di pasta/riso prevalentemente si consuma :

integrali raffinati

29) Quante porzioni di patate consuma durante la settimana (per porzione si intendono 300g, vedi immagini allegate)?

0 1-2 3-4 ≥5

Specificare inoltre quale tipologia di cottura si predilige per la preparazione della patate :

frittura bollitura forno/microonde al vapore padella

30) Quante volte alla settimana consuma cioccolato o bevande a base di cioccolato (cioccolata calda, mocaccino...)?

0 1 2 ≥3

31) Le capita di consumare insaccati, formaggi o snack in attesa o durante la preparazione di un pasto ?

Sì No

Se sì, quante volte a settimana?

- 0 1 da 2 a 4 da 5 a 7 >7

32) Quanti bicchieri di superalcolici beve durante la settimana? (un bicchiere equivale a 40ml)

- 0 bicchieri tra 1 e 2 bicchieri tra 3 e 7 bicchieri >7
bicchieri

33) Quante volte a settimana consuma il pasto fuori casa?

- 0 1-3 4-6 ≥ 7

Specificare inoltre dove abitualmente si consumano i pasti fuori casa (NON rispondere se non si consumano pasti fuori casa) :

- bar ristorante fast food mensa

6.3 Allegato 3: Abstracts of a research article submitted to *Plant Foods for Human Nutrition*

Circulating salicylic acid and metabolic and inflammatory responses after fruit ingestion

Samuele Rinelli^{1*}, Angela Spadafranca¹, Giovanni Fiorillo¹, Maurizio Cocucci³, Simona Bertoli¹, Alberto Battezzati¹.

1. Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche (DiSTAM), International Center for the Assessment of Nutritional Status (ICANS), Università degli Studi di Milano, Via G. Celoria, 2. 20133 Milan, Italy.
2. Dipartimento di Produzione Vegetale (Di.Pro.Ve), Università degli Studi di Milano, Via G. Celoria, 2. 20133 Milan, Italy.

We hypothesized that fruit ingestion provides measurable amounts of salicylic acid (SA) and produces different metabolic and inflammatory responses compared to mere fruit sugars. In a randomized-crossover study, 26 healthy subjects received a peach shake PSM (SA: $0,06 \pm 0,001$ mg/100g) and an aqueous solution (MSM) with the same peach sugars. Since SA has a half-life longer than six hours, 16 subjects (group1) abstained from fruits and vegetables consumption the evening before trials, and 10 subjects (group2) maintained their usual diet. Circulating SA, glucose, insulin, FFA, IL-6 were determined. Basal SA was lower in Group1 than in Group2 ($0,09 \pm 0,02$ $\mu\text{mol/L}$) vs $0,30 \pm 0,03$ $\mu\text{mol/L}$), peaked at 90 min in both group ($0,18 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/L}$) vs $0,38 \pm 0,02$ $\mu\text{mol/L}$) and remained above baseline ($p < 0,05$) up to 3 hours. Glycemia increased more slowly after PSM than MSM at 15 min ($p < 0,01$) with a lower average glucose excursion ($p < 0,05$). Insulin peaked at 45 min with PSM and MSM but decrease less rapidly with PSM. FFA were percentually more suppressed ($p < 0,01$) after PSM, and IL-6 increased less ($p < 0,05$) with PSM than MSM.

Dietary fruit intake contributes to increases circulating SA in vivo, and non-nutrients of fruits may modulate the inflammatory and metabolic responses to the sugars ingestion.

List of abbreviations used in the paper:

- FV: fruit and vegetables
- MSM: aqueous solution With the same sugars found in fruit
- PSM: peach shake
- SA: Salicylic acid

6.4 Allegato 4: Abstracts of a research article submitted to *British Journal Of Nutrition*

Effects on satiety and glucose control of a *phaseolus vulgaris* extract when employed as supplement of a mediterranean balanced meal.

Samuele Rinelli^{*}, Angela Spadafranca¹, Paolo Morazzoni², Simona Bertoli¹, Alberto Battezzati¹

- 1) Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche (DiSTAM), International Center for the Assessment of Nutritional Status (ICANS), Università degli Studi di Milano, Via G. Celoria, 2. 20133 Milan, Italy.
- 2) Indena S.p.A., Viale Ortles 12, I-20139, Milan, Italy

Background: A novel *Phaseolus vulgaris* extract (PVE), through the synergy of α -amylase inhibitory activity and the modulation of gut hormones secretion, is capable to decrease body weight, postprandial blood glucose and food intake in rats.

Objective: The objective of this study was to evaluate the effects on satiety and glucose control of this recent PVE in humans when employed as supplement of a Mediterranean balanced meal.

Design: Glucose control, ghrelin and appetite profile were measured in 12 lean subjects before and 3 hours after consumption of a balanced meal with 100 mg of PVE or placebo in a randomized, double-blind, controlled trial. Meal (40% of individual total energy expenditure) consisted of 60% carbohydrates, 25% lipids, 15% protein, 10g of dietary fiber.

Results: Postprandial blood glucose was markedly reduced with VPE compared to Placebo ($+15,4\pm 5,4\%$ vs $+26,1\pm 7,3\%$ of basal, $p<0,05$) in the first 30 minutes, followed by a lower insulin increment ($+1112,9\pm 171,3\%$ vs $1507,3\pm 257,4\%$ $p<0,05$) in the first hour. Ghrelin levels were suppressed after mixed meals but less with VPE compared to Placebo ($-13,9\pm 3,1\%$ vs -

22,0±3.3% p = 0.01) at 60 minutes, without rebounding (-1.4 ± 4.1% vs +7.7 ± 3,5%, p =0.04) within three hours. Moreover, desire to eat AUC was more suppressed with PVE compared to Placebo (-12689,8±10915,7 vs -10915,6±935,9 p = 0.04).

Conclusion: These results suggest a potential role of PVE in improving postprandial glucose responses and in the appetite control, whose defect is a limiting factor in overweight patients management.