

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE FARMACOLOGICHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACOLOGICHE E BIOMOLECOLARI

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE FARMACOTOSSICOLOGICHE, FARMACOGNOSTICHE E  
BIOTECNOLOGIE FARMACOLOGICHE (XXV ciclo)

**CARATTERIZZAZIONE FITOCHIMICA E VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' BIOLOGICA  
DI INGREDIENTI BOTANICI CONTENUTI IN INTEGRATORI ALIMENTARI**

settore scientifico disciplinare 03 D1 (ex CHIM 10)

DOTTORANDA: Chiara Maria Di Lorenzo

TUTOR: Chiar.ma Prof.ssa Patrizia Restani

COORDINATORE DEL DOTTORATO: Chiar.mo Prof. Guido Franceschini



A.A. 2011/2012

## SOMMARIO

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	1
1.1 Aspetti normativi degli integratori alimentari.....	3
1.2 Integratori alimentari a base erboristica.....	7
1.3 Problematiche connesse all'uso degli integratori alimentari a base erboristica.....	11
1.3.1 Problematiche relative alla normativa.....	11
1.3.2 Percezione della sicurezza d'uso degli integratori a base erboristica da parte del consumatore.....	14
1.3.3 Problematiche inerenti alla qualità e la sicurezza degli integratori alimentari a base erboristica.....	15
1.3.4 Problematiche inerenti gli effetti benefici di integratori alimentari a base erboristica.....	19
1.4 Il progetto europeo PlantLIBRA.....	22
1.4.1 Principali attività del progetto europeo PlantLIBRA.....	23
1.4.2 Indagine relativa a ingredienti botanici e integratori alimentari a base vegetale...24	
1.4.3 Valutazione degli effetti avversi ad integratori alimentari a base erboristica.....25	
1.4.4 Il meta-database ePlantLIBRA.....	25
1.4.5 Valutazione degli effetti benefici di integratori alimentari a base erboristica.....26	
1.5 L'inflammatione.....	27
1.5.1 La gastrite.....	27
1.5.2 Le gastriti Hp-correlate.....	28
<b>2. SCOPO DELLA TESI</b> .....	46
<b>3. MATERIALI</b> .....	49
3.1 Campioni.....	49
3.2 Saggio di Folin-Ciocalteu per la determinazione dei polifenoli totali.....	50
3.3 Analisi cromatografica.....	50
3.4 Attività biologica.....	51
3.4.1 Saggi di citotossicità.....	52
3.4.2 Saggio dell'NF-kB.....	52
3.4.3 Determinazione del potere antiossidante.....	53
<b>4. METODI</b> .....	54
<b>I PARTE: RICERCA SISTEMATICA DELLA LETTERATURA</b> .....	54

<b>II PARTE: CARATTERIZZAZIONE FITOCHIMICA E VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' BIOLOGICA DI ESTRATTI DI <i>Camellia sinensis</i> L.....</b>	<b>56</b>
4.1 Preparazione dei campioni .....	56
4.2 Saggio di Folin-Ciocalteu per la determinazione dei polifenoli totali.....	56
4.3 Analisi cromatografica.....	57
4.3.1 Procedure di validazione del metodo in HPLC.....	58
4.3.2 Separazione e idoneità del sistema HPLC.....	58
4.3.3 Limite di determinazione e quantificazione.....	58
4.3.4 Recupero.....	58
4.3.5 Linearità.....	58
4.3.6 Preparazione degli standard.....	59
4.3.7 Analisi cromatografica.....	60
4.3.8 Valutazione della stabilità delle catechine nei campioni.....	61
4.4 Attività biologica.....	62
4.4.1 Colture cellulari.....	62
4.4.2 Saggi di citotossicità.....	62
4.4.3 Trasfezioni cellulari.....	64
4.4.4 Preparazione delle cellule per i saggi.....	65
4.4.5 Saggi per valutare l'effetto sulla trascrizione guidata da NF-kB.....	66
4.4.6 Effetto delle citochine pro-infiammatorie sulla trascrizione mediata da NF-kB in cellule gastriche umane (AGS).....	66
4.4.7 Valutazione dell'attività antiossidante.....	67
<b>5. RISULTATI E DISCUSSIONE.....</b>	<b>70</b>
<b>I PARTE: RICERCA SISTEMATICA DELLA LETTERATURA.....</b>	<b>70</b>
5.1 Risultati generali.....	70
5.2 <i>Vitis vinifera</i> L.....	71
5.2.1 Proteina C reattiva (CRP) .....	72
5.2.2 Malondialdeide (MDA).....	74
5.2.3 Interleuchina-6 (IL-6) .....	74
5.2.4 Interleuchina-8 (IL-8) .....	75

5.2.5 CD-40L .....	76
5.2.6 Tumor Necrosis Factor alfa (TNF- $\alpha$ ) .....	76
5.2.7 E-selectina .....	77
5.2.8 P-selectina .....	78
5.2.9 Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) .....	78
5.2.10 Intercellular Cell Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) .....	79
5.2.11 8-epi-prostaglandina-F2-alfa (8-epi-PG- F2- $\alpha$ ) .....	79
5.2.12 Trombossano B2 (TXB2) .....	80
5.2.13 Ossido Nitrico (NO) .....	80
5.3 <i>Camellia sinensis</i> L.....	84
5.3.1 Tè verde .....	84
5.3.1.1 Proteina C reattiva (CRP) .....	85
5.3.1.2 Malondialdeide (MDA) .....	86
5.3.1.3 Interleuchina-6 (IL-6) .....	87
5.3.1.4 Interleuchina 1- $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) .....	88
5.3.1.5 Tumor Necrosis Factor alfa (TNF- $\alpha$ ) .....	88
5.3.1.6 8-iso-prostaglandina-F2-alfa (8-iso-PG-F2- $\alpha$ ) .....	89
5.3.1.7 Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) .....	89
5.3.1.8 Intercellular Cell Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) .....	89
5.3.2 Tè nero .....	90
5.3.2.1 Proteina C Reattiva (CRP) .....	90
5.3.2.2 P-selectina .....	91
5.3.2.3 Aggregazione piastrinica .....	91
5.3.3 Studi epidemiologici .....	92
5.4 <i>Matricaria recutita</i> L.....	100
5.5 <i>Olea europea</i> L.....	100
5.5.1 Proteina C Reattiva (CRP) .....	101
5.5.2 Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) .....	101
5.5.3 Intercellular Cell Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) .....	102
5.5.4. Interleuchina-6 (IL-6) .....	103
5.5.5 Studi epidemiologici .....	103
5.6 <i>Urtica dioica</i> L.....	108
5.7 <i>Harpagophytum procumbens</i> L.....	110

5.8 <i>Curcuma longa</i> L.....	114
5.8.1 Malondialdeide (MDA) .....	114
5.8.2 Leucotriene C <sub>4</sub> (LCT <sub>4</sub> ) .....	115
5.8.3 Ossido Nitrico (NO) .....	116
5.8.4 Tumor Necrosis Factor-alfa (TNF- $\alpha$ ) .....	116
5.8.5 Interleuchina-6 (IL-6) .....	116
5.9 <i>Boswellia serrata</i> Roxb. Ex Colebr.....	121
5.9.1 Metalloproteinasi-3 (MMP-3) .....	121
5.10 Conclusioni.....	127
<b>II PARTE: CARATTERIZZAZIONE FITOCHIMICA E VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' BIOLOGICA DI ESTRATTI DI <i>Camellia sinensis</i> L.....</b>	<b>129</b>
5.11 Determinazione del contenuto di polifenoli totali .....	129
5.11.1 Retta di calibrazione.....	129
5.11.2 Contenuto di polifenoli totali nei campioni.....	130
5.12 Analisi cromatografica.....	133
5.12.1 Messa a punto e dati di validazione del metodo in HPLC.....	133
5.12.2 Analisi dei campioni.....	149
5.13 Attività biologica.....	160
5.13.1 Saggi di citotossicità.....	160
5.13.2 Effetto delle citochine pro-infiammatorie sulla trascrizione mediata da NF- $\kappa$ B in cellule gastriche umane (AGS).....	160
5.13.3 Effetto degli estratti acquosi di tè verde e nero sulla trascrizione mediata da NF- $\kappa$ B in cellule AGS stimulate con TNF.....	163
5.13.4 Determinazione dell'attività antiossidante .....	172
5.13.4.1 Retta di calibrazione per il dosaggio del potere antiossidante e analisi dei campioni .....	173
5.13.4.2 Attività antiossidante dei campioni .....	174
5.14 Valutazione della stabilità delle catechine .....	175
<b>6. CONCLUSIONI.....</b>	<b>179</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>184</b>



## 1. INTRODUZIONE

Nei nuovi scenari che hanno caratterizzato l'evoluzione del settore salutistico e del benessere nella società moderna, emerge con sempre maggior consapevolezza l'esigenza di ricercare in un'alimentazione corretta ed equilibrata le risposte adeguate alla ricerca del benessere psico-fisico finalizzato al mantenimento della salute. Una condizione che non si identifica più solo con l'assenza di malattia, bensì con un'esigenza di prevenzione e di riequilibrio, capace di migliorare la qualità della vita e assicurare, possibilmente, il massimo grado di vitalità e benessere. Il concetto stesso di alimento sta subendo una profonda trasformazione: dal soddisfacimento di un bisogno primario siamo giunti ad un concetto di cibo come promessa di salute intesa come prevenzione e assenza di malattia. Basti pensare che a partire dagli anni '90 si è verificata una progressiva contrazione dei consumi di alcuni comparti storici dell'alimentazione nazionale (come vino, zucchero, burro e grassi animali) in favore di un aumento generalizzato di pesce, frutta, bevande analcoliche, yogurt, cereali e prodotti caratterizzati, nell'immaginario collettivo, da valenze salutistiche. Oggi i consumi sono orientati in modo sempre più attento alla qualità degli alimenti, non solo ai loro contenuti nutrizionali ma anche alla presenza di additivi, contaminanti e residui. Ma tale consapevolezza, radicata grazie ad una educazione alimentare spinta da parte del Ministero della salute con l'attuazione di campagne informative e di prevenzione, oltre che da una coscienza sempre più diffusa tra le persone grazie anche ai nuovi e sempre aggiornati canali di informazione specializzati, va spesso a contrastare con stili di vita non corretti soprattutto nei Paesi e nelle città più industrializzate. La sedentarietà, legata alla progressiva diffusione di presidi in grado di ridurre costantemente il lavoro muscolare dell'uomo, la tendenza a nutrirsi più del necessario, scelte alimentari affrettate imposte dal ritmo lavorativo quotidiano, lo stress accumulato e l'inquinamento sono tutti fattori che insieme portano ad essere esposti, più che in passato, a patologie croniche quali, tra le altre,

l'ipertensione, l'obesità e il diabete. E se da un lato la prevenzione, sostenuta da una maggior ricerca del benessere, la quale da condizione di assenza di patologie, ha assunto nel tempo un'accezione più ampia, arrivando a coinvolgere tutti gli aspetti dell'essere (fisico, emotivo, mentale, sociale, spirituale e alimentare) gioca un ruolo primario, dall'altro i ritmi di vita frenetici spesso non consentono di prendersi cura di se stessi quanto si vorrebbe. Senza contare diversi altri fattori di valenza strettamente socio-economica e tecnologica che hanno determinato, nei Paesi più sviluppati, un impoverimento di importanti nutrienti dai cibi più comuni; in particolar modo i processi di raffinazione, i metodi di conservazione e la cottura possono compromettere il patrimonio nutrizionale degli alimenti. In questo contesto, gli integratori alimentari hanno trovato il substrato ideale in un'ampia fascia di popolazione, tanto che il mercato di questi prodotti ha subito, nell'ultimo decennio, una forte espansione (Romagnoli e Franchini, 2011). In generale, l'uso degli integratori è associato a:

- modulazione dei processi fisiologici, modificati nel tempo da fattori endogeni ed esogeni;
- mantenimento un buono stato di salute;
- miglioramento delle prestazioni fisiche e psichiche;
- riduzione dei fattori di rischio di condizioni patologiche;
- rafforzamento del sistema immunitario

Il mercato degli integratori alimentari è in crescita esponenziale, tanto che dai 150 milioni di euro (fonte: Associazione Produttori Farmaci da Banco, Bruxelles, 2000) spesi dagli italiani nel 1999 per comprare integratori a base di vitamine, minerali, fibre ed estratti vegetali, si è attestato nel 2009 si 1.453 milioni di euro (Fonte: Federsalus). Solo nel canale farmacia, dal 2007 al 2008. l'incremento delle confezioni vendute è stato del 4.8%, ed un ulteriore 6.0% si è registrato tra il 2008 e il 2009. Questi dati confermano quanto i consumatori investano nel settore "salutistico", non più considerato superfluo ma parte integrante della vita quotidiana. Certamente, tra i punti di forza del settore c'è un ampio sviluppo



dell'offerta e della novità dovuto in larga parte a fattori quali le norme che hanno inquadrato la funzione di questi prodotti; l'incremento della commercializzazione di integratori da parte delle aziende farmaceutiche, nel tentativo di contrastare le contrazioni del mercato tradizionale; l'aumento dell'offerta di prodotti disponibili; la possibilità di acquistare tali prodotti nella grande distribuzione e in internet; la pubblicità.

Per quanto riguarda la percezione degli integratori alimentari da parte del consumatore, secondo un'indagine demoscopica commissionata dall'AIIPA (Associazione Italiana Industrie Prodotti Alimentari) all'Istituto Astra Ricerche, su un campione rappresentativo della popolazione italiana nella fascia di età 25-64 anni. Oltre un terzo degli intervistati ha affermato di far uso regolare di integratori alimentari; il profilo del consumatore-tipo di questo tipo di prodotti è quello di un consumatore colto, abitante nelle regioni del centro-nord, con una prevalenza di adulti (45-54 anni) e di senior (55-69 anni), con uno stile di vita alimentare buono. Rispetto al 2006, dove il 30% degli intervistati avevano consumato integratori nel triennio precedente, nel 2010, coloro che hanno dichiarato di aver integrato la propria dieta è più che raddoppiato. Inoltre, la conoscenza dell'integrazione alimentare è aumentata rispetto al passato; le categorie maggiormente conosciute sono gli integratori a base di vitamine (88.5%), sali minerali (77.2%), integratori a base di fibre (59.6%), gli integratori di probiotici (39.7%), integratori a base di piante e loro derivati (37.5%) (AIIPA, 2011).

### **1.1 Aspetti normativi degli integratori alimentari**

Il crescente interesse e utilizzo da parte dei consumatori di prodotti salutistici e la forte espansione del mercato hanno reso necessaria, sia per il consumatore che per le aziende produttrici, la definizione, anche dal punto di vista normativo, di prodotti alimentari e altri prodotti, diversi dagli alimenti, con valenza salutistica.

La legislazione comunitaria, con normativa parzialmente armonizzata, ha disciplinato in diverse tipologie la produzione e la commercializzazione di alcuni

alimenti e prodotti, diversi dagli alimenti, che producono determinati effetti positivi sulla salute dovuti a componenti presenti in essi in modo naturale, o aggiunti:

1) Gli alimenti o prodotti dietetici, ovvero quei prodotti che per la loro particolare composizione o per il particolare processo di produzione si distinguono nettamente dai prodotti alimentari di uso corrente, sono adatti all'obiettivo nutritivo indicato e sono commercializzati in modo tale da indicare che sono conformi all'obiettivo. In questa categoria sono compresi:

- Alimenti a fini medici speciali (DPR n. 57/02) finalizzati a supportare le esigenze nutrizionali di pazienti che si trovano in condizioni cliniche peculiari e nettamente diversi da quelli per il consumo corrente in quanto indirizzati a un obiettivo nutrizionale ben specifico. Alimenti dietetici per la prima infanzia, ovvero alimenti per lattanti e alimenti di proseguimento (DM 9 aprile 2009, n.82) e alimenti a base di cereali e altri alimenti per bambini (DPR n.128/99, modificato dal DM 14 marzo 2005)
- Alimenti dietetici destinati a diete ipocaloriche volte alla riduzione del peso (DM n. 519/98), ovvero prodotti presentati come sostitutivi dell'intera razione alimentare giornaliera, oppure di uno o più pasti, la cui composizione ed etichettatura devono rispondere ai criteri riportati nel decreto stesso.

Questi prodotti sono stati tra i primi ad essere regolamentati; per tali alimenti il processo di ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri è iniziato con la direttiva 77/94/CEE, abrogata dalla direttiva 89/398/CEE, attuata con decreto legislativo n. 111 del 27 gennaio 1992. La categoria degli alimenti dietetici verrà probabilmente cancellata dal legislatore comunitario (è in fase di discussione a Bruxelles una proposta di norma), mentre rimarranno le categorie di alimenti a fini medici speciali e per la prima infanzia.

2) Gli alimenti addizionati, disciplinati dal regolamento 1925/2006, per i quali si intendono alimenti ai cui sono stati aggiunti vitamine e minerali e di talune altre sostanze che hanno un effetto nutrizionale o fisiologico in condizioni tali da comportare un'ingestione di quantità ampiamente superiori a quelle che ci si può

ragionevolmente aspettare di ingerire in condizioni normali di consumo nell'ambito di una dieta equilibrata e variata.

- 3) Gli alimenti funzionali, ovvero una tipologia di alimenti naturali che hanno finalità salutistiche destinati a soggetti sani che desiderano mantenere il proprio stato di salute e benessere. Il concetto di alimento funzionale fu sviluppato in Giappone intorno agli anni Ottanta; successivamente, nel 1991, gli alimenti funzionali vennero definiti con l'acronimo FOSHU, Foods for Specified Health Use, delineando, così, cibi aventi proprietà benefiche sulla salute umana per la presenza di particolari elementi benefici o perché privati di costituenti allergenici. In seguito, nel 2002, l'International Life Sciences Institute (ILSI), definì "funzionali" gli alimenti aventi capacità di influire positivamente su una o più funzioni fisiologiche dell'organismo, che vadano oltre gli effetti nutrizionali normali, contribuendo a preservare o migliorare lo stato di salute e di benessere e a ridurre il rischio di insorgenza di malattia (Wildman et al.,2007). Un alimento, per essere definito "funzionale", deve possedere alcuni requisiti essenziali quali:

- La sicurezza e la base scientifica dell'effetto salutistico esplicito;
- L'aspetto, l'odore e il sapore devono essere simili a quelli degli alimenti tradizionali;
- Non devono presentarsi in forma farmaceutica.

Si tratta quindi di alimenti veri e propri in grado di mostrare la loro efficacia nel contesto dell'abituale alimentazione giornaliera.

Un alimento funzionale può essere:

- Un alimento naturale;
- Un alimento in cui è stato aggiunto modificato o eliminato uno o più componenti con mezzi tecnologici o biotecnologici;
- Un alimento in cui è stata modificata la natura o la biodisponibilità di uno o più elementi;
- Un *novel food*;

Per questi alimenti non è ancora stata ottenuta una chiara definizione dalla legislazione comunitaria.

Gli integratori alimentari, la cui parziale armonizzazione comunitaria è stata realizzata con la Direttiva 2002/46/CE. Secondo la definizione di tale Direttiva essi sono “prodotti alimentari destinati ad integrare la comune dieta e che costituiscono una fonte concentrata di sostanze nutritive, quali le vitamine e i minerali, o di altre sostanze aventi un effetto nutritivo o fisiologico, in particolare ma non in via esclusiva, aminoacidi, acidi grassi essenziali, fibre ed estratti di origine vegetale, sia monocomposti che pluricomposti, in forme predosate, vale a dire in forme di commercializzazione quali capsule, pastiglie, compresse, pillole e simili, polveri in bustina, liquidi contenuti in fiale” (Direttiva EC 2002/46).

Si differenziano, quindi, dagli alimenti funzionali, in quanto non sono un alimento, non forniscono calorie, non sono impiegati come unico componente di una dieta o di un pasto, e hanno una presentazione simil-farmaceutica. Questa categoria di prodotti, rappresenta la forma preferita per l’assunzione di sostanze con effetti positivi sulla salute.

L’aspetto fondamentale di questa categoria di prodotti è che, a differenza dei farmaci, essi possono vantare esclusivamente un effetto fisiologico sull’organismo. Ciò significa che essi possono quindi esclusivamente coadiuvare o favorire particolari funzioni organiche o contrastare processi sfavorevoli per l’organismo.

La finalità comune di produrre un effetto positivo sulla salute è elemento necessario e sufficiente a configurare una specifica categoria di prodotti alimentari che, per le loro proprietà, si possono definire prodotti alimentari della salute. La funzione salutistica, intesa quale idoneità dell’alimento a realizzare in condizioni normali d’uso effetti positivi sull’organismo umano dovuti al vantaggio nutrizionale e/o fisiologico, si configura come un vero e proprio requisito di qualità che identifica non più lo specifico alimento, bensì determinate caratteristiche comuni alla categoria, veicolate tramite etichettatura e pubblicità al consumatore finale, e determinanti dell’acquisto. Tuttavia, non essendo la categoria dei prodotti alimentari della salute configurata dall’ordinamento giuridico comunitario la sua

elaborazione è possibile soltanto in via interpretativa. Sebbene l'Unione Europea abbia normalmente introdotto discipline specifiche per regolamentare aspetti legati alla denominazione, alla composizione, alla produzione, ai controlli, alle autorizzazioni ed al regime di etichettatura/pubblicità relativamente alle diverse tipologie di prodotti alimentari ad effetti salutistici, ogni qual volta tali prodotti utilizzino sostanze responsabili dell'effetto fisiologico in assenza di una disciplina comunitaria armonizzata concernente il loro uso, il riconoscimento della qualità salutistica può ingenerare ostacoli alla loro libera circolazione nel mercato comune sotto forma ad esempio di autorizzazioni richieste da uno Stato membro prima della loro immissione in commercio giustificabili sulla base della tutela della salute e, finanche, il rischio di divergenti qualificazioni negli Stati membri che potrebbero ritenere appartenere il prodotto con effetti sulla salute alternativamente alla categoria degli alimenti o dei medicinali.

La Direttiva 46/2002/CE è stata attuata in Italia con il decreto legislativo n.169 del 2004, che ha normalizzato il ruolo e le finalità di tali prodotti conformemente alla profonda evoluzione concettuale che si è andata affermando a riguardo. Tale direttiva, infatti, pur prevedendo al momento disposizioni specifiche solo per vitamine e minerali (essendo stata inizialmente proposta dalla Commissione Europea per disciplinare solo gli integratori a base di questi nutrienti), ha incluso nel suo campo di applicazione anche prodotti a base di sostanze naturali non nutritive con finalità salutistiche, dato il loro crescente utilizzo come ingredienti di integratori alimentari.

## **1.2 Integratori alimentari a base erboristica**

Gli integratori alimentari a base erboristica (Plant Food Supplement, PFS) sono preparazioni a base di piante le quali vengono sottoposte a vari trattamenti quali estrazione, distillazione, frazionamento o concentrazione e successivamente al fine di ottenere il prodotto finito che si presenterà, come prevede la definizione legislativa degli integratori (46/2002/CE), in forme orali predosate (capsule,

compresse, tavolette, gocce...). Molte di queste piante, oggi utilizzate come ingredienti di integratori alimentari, vantano una lunga tradizione d'uso come tali al fine di ottenere effetti fisiologici positivi o mantenere lo stato di salute. Ne costituiscono un esempio piante come l'echinacea, il ginkgo biloba, il ginseng, il tè verde e l'iperico. Il mercato di questa tipologia di prodotti è in forte espansione, tanto che la Global Industry Analysts (GIA) ha stimato che raggiungerà, entro il 2015, circa 93 bilioni di dollari. L'Europa rappresenta ancora la regione mondiale dove il mercato risulta essere più ampio, seguita dalla Cina e dall'India, le quali, entro il 2015, possiederanno circa il 10.7% del mercato mondiale. A livello europeo, l'Italia risulta essere il primo Paese in termini di vendite, seguita da Germania, Inghilterra e Francia. Il mercato degli integratori alimentari a base erboristica varia a seconda dei diversi Paesi in relazione a fattori quali la consapevolezza dei consumatori, disponibilità e modalità di distribuzione, percezione e accettazione del prodotto e regolamentazione. Nonostante i dati di mercato attestino una rapida crescita del mercato dei PFS, estrapolare dati circa il consumo di questo prodotti a livello mondiale risulta ancora difficile, in quanto la maggior parte degli studi volti a tale valutazione non sono espressamente focalizzati sui PFS ma piuttosto sui prodotti appartenenti alla cosiddetta "medicina alternativa" (CAM), che comprende la medicina naturale, la naturopatia e l'omeopatia. L'ambiguità di tali categorie, nelle quali molto spesso vengono erroneamente inseriti i PFS, rende difficile la stima reale del consumo di integratori alimentari a base vegetale. Le informazioni riguardanti il consumo di integratori alimentari in generale e di integratori alimentari a base erboristica in particolare, provengono principalmente dagli Stati Uniti, dove gli studi riguardanti i consumi derivano da fonti quali il National Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES) e dal National Health Interview Surveys (NHIS). Un rapporto basato sui dati provenienti dal NHANES riguardanti gli anni 2003-2004 e 2005-2006 ha riportato che il 49% (44% maschi e 53% femmine) della popolazione degli Stati Uniti utilizza integratori alimentari, di cui il 14% è rappresentato da PFS (Bailey et al., 2011). Inoltre, dati provenienti dal NHIS, indicano che l'utilizzo di PFS è la più comune terapia

alternativa tra gli adulti, che ne ha riportato l'utilizzo negli ultimi 30 giorni nel 17.7% dei casi (NHIS, 2007). Tra i prodotti naturali maggiormente utilizzati si possono annoverare quelli a base di echinacea, il ginseng, il ginkgo e l'aglio. Per quanto riguarda l'Europa, numerosi sono i dati che attestano il crescente utilizzo di integratori alimentari, ma meno informazioni riguardanti la tipologia. Tali dati sono stati riportati principalmente dall'European Prospective Investigation into Cancer (EPIC) (Skeie et al., 2009), che ha incluso più di un milione di partecipanti in 10 Stati Europei quali Danimarca, Francia, Germania, Grecia, Italia, Olanda Norvegia, Spagna, Svezia e Inghilterra (Riboli et al., 2002). La media di consumatori di integratori alimentari varia in questi Paesi tra il 2% e il 51.8% per quanto riguarda gli uomini e tra il 6.7% e il 65.8% per quanto riguarda le donne. Si assiste, inoltre, ad un evidente gradiente Nord-Sud con un più elevato consumo di questi prodotti nelle regioni scandinave e più basso, invece, nelle regioni mediterranee. Anche se gli integratori a base di vitamine-minerali rappresentano la categoria maggiormente utilizzata, i PFS costituiscono comunque l'8-17% del totale (Tabella 1.1).

**Tabella 1.1** - Percentuale (%) di consumatori che hanno dichiarato di aver utilizzato integratori alimentari il giorno precedente nello studio EPIC e percentuale (%) di integratori a base erboristica (PFS) utilizzati suddivisi per Stato e sesso

Stato	Uomini			Donne		
	N	%	% PFS	N	%	% PFS
Grecia	1311	2.0	0	1373	6.7	0
Spagna	1777	5.9	15.0	1443	12.1	11.0
Italia	1442	6.8	8.0	2511	12.6	8.0
Francia				4735	32.4	7.0
Germania	2267	20.7	16.0	2148	27.0	12.0
Olanda	1024	16.0	17.0	2956	32.1	18.0
Inghilterra	4.0	36.3	10.0	570	47.5	10.0
Danimarca	1932	51.0	10.0	1994	65.8	10.0
Svezia	2765	30.5	16.0	3285	42.4	15.0
Norvegia				1797	60.6	8.0

Per quanto riguarda le caratteristiche degli utilizzatori, in generale si può osservare che il maggiore utilizzo di integratori alimentari è associato ad alcune caratteristiche demografiche quali: il sesso femminile, l'elevato livello culturale, l'elevato tenore di vita, la razza bianca e l'età oltre i 50 anni. L'analisi di dati

provenienti dal NHIS (2000) ha inoltre fornito ulteriori caratteristiche che possono variare a seconda della tipologia di integratori alimentari. Ad esempio, i soggetti in sovrappeso od obesi tendono ad utilizzare in misura inferiore integratori a base di vitamine e minerali (rispetto ai soggetti normo-peso), ma questa differenza non sembra verificarsi per i prodotti a base vegetale (Fennel, 2004). In particolare, per quanto riguarda questi ultimi prodotti, secondo un'indagine condotta nel 2002 dal NHIS, lo status socio-economico risulta essere positivamente correlato all'uso di prodotti a base vegetale, con una maggior frequenza di utilizzo tra le donne e adulti intorno ai 50 anni (NHIS, 2002). Il consumo di questi prodotti è in generale associato a comportamenti più salutarci quali il regolare esercizio fisico e il non essere fumatori. Inoltre, è stata rilevata un'associazione positiva tra l'uso di integratori a base erboristica e farmaci da banco (OTC), suggerendo il ruolo di complemento piuttosto che alternativa ai farmaci convenzionali.

Numerosi sono i motivi dell'utilizzo di integratori alimentari. Uno studio qualitativo condotto nella zona meridionale degli Stati Uniti, basato sull'intervista di soggetti tra i 18 e gli 83 anni, ha rivelato che esistono sia fattori fisici che psicologici alla base della scelta del consumo di integratori alimentari (Peters et al., 2003); tra queste le principali riportate sono la cura di lievi disturbi, la prevenzione di patologie croniche, il raggiungimento della "pace interiore", l'integrazione di una dieta considerata scarsa, uno stile di vita non salutare e il risparmio sulle cure mediche. In sostanza i consumatori hanno la percezione che gli integratori garantiscano loro un certo grado di controllo sulla propria salute. I risultati dell'indagine hanno messo in luce le differenze di comportamento in relazione al tipo di integratore utilizzato. Coloro che consumano diverse tipologie di prodotti hanno generalmente una più ferma convinzione nei benefici degli integratori alimentari, percepiscono maggiormente il rischio legato al consumo di vitamine e sono più fortemente influenzati dai media. Alcuni degli aspetti inerenti alla salute per i quali i consumatori ritengono gli integratori a base erboristica una valida alternativa includono la terapia ormonale sostitutiva, il mantenimento della funzione



prostatica, il miglioramento delle funzioni cognitive e dell'apparato muscolo-scheletrico.

Inoltre, un'indagine telefonica condotta su un campione casuale della popolazione statunitense ha rivelato che il 14% aveva assunto almeno un integratore a base vegetale nella settimana precedente, e quelli a base di ginseng e di ginkgo biloba sono stati i più utilizzati. Le ragioni maggiormente addotte sono state "miglioramento della salute", l'artrite, il miglioramento della memoria e delle difese immunitarie (Kaufman et al., 2002).

### **1.3 Problematiche connesse all'uso degli integratori alimentari a base erboristica**

#### **1.3.1 Problematiche relative alla normativa**

L'inclusione degli integratori alimentari a base vegetale nella categoria degli integratori deriva dal fatto che la legislazione comunitaria non lascia spazi per una via normativa intermedia tra alimenti e farmaci. Nella direttiva 2002/46/CE, recepita in Italia con il Decreto n.169/2004, nei primi *consideranda* si è precisato che, potendo essere diverse le sostanze da aggiungere negli integratori, quindi non solo vitamine e minerali ma anche aminoacidi, acidi grassi essenziali, fibre ed estratti vegetali, fosse opportuno suddividere in due fasi la disciplina di queste aggiunte. Il legislatore comunitario, in una prima fase, e quindi tramite la direttiva stessa, ha disciplinato l'aggiunta di vitamine e minerali. Ad una successiva fase sono state rimandate le disposizioni sull'aggiunta di nutrienti diversi dalle vitamine e minerali o altre sostanze aventi un ruolo nutritivo o fisiologico utilizzati come ingredienti di integratori alimentari. In questo modo, quindi, e nell'attesa di completamento della disciplina, il legislatore comunitario ha lasciato alla discrezionalità dei legislatori nazionali questa parte della normativa degli integratori, richiedendo comunque il rispetto del principio della libera circolazione delle merci e la conseguente previsione e applicazione della clausola di mutuo

riconoscimento (Scarpa, 2006). Per quanto riguarda l'aggiunta di vitamine e minerali, questa è prevista espressamente dal Decreto Legislativo 169/2004. Nell'allegato I, infatti, è presente l'elenco delle sole vitamine e minerali consentiti e nell'Allegato II quello delle sostanze vitaminiche e minerali ammesse. Con riferimento, invece, alle sostanze diverse da quelle già disciplinate, è opportuno evidenziare i recenti sviluppi in ambito prettamente nazionale. Infatti, le ultime pubblicazioni riguardano altri nutrienti e altre sostanze ad effetto nutritivo e fisiologico, e i preparati vegetali. Nel Luglio 2012 il Ministero della Salute ha aggiornato le Linee guida sugli integratori per quanto concerne i nutrienti e le altre sostanze diverse da vitamine e minerali e nello stesso periodo è stato pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale il Decreto Ministeriale 9 Luglio 2012, recante la "Disciplina dell'impiego negli integratori alimentari di sostanze e preparati vegetali". L'elenco del D.M. 9 Luglio 2012 riguarda le sostanze e i preparati vegetali, i quali vengono definiti con il nome comune della pianta seguito quello botanico. Questo decreto, tuttavia, ha valenza prettamente nazionale. In ambito comunitario, infatti, per quanto riguarda tali sostanze, il regolamento è ancora in via sviluppo. Potendo gli integratori vantare esclusivamente effetti fisiologici, l'etichettatura, la presentazione e la pubblicità non devono attribuire agli stessi proprietà terapeutiche o preventive delle malattie umane. In Italia, in particolare, in etichetta, oltre agli elementi obbligatori quali il nome delle categorie di sostanze nutritive e la dose raccomandata, può essere presente l'effetto nutritivo o fisiologico attribuito al prodotto sulla base dei suoi costituenti in modo idoneo da orientare correttamente le scelte dei consumatori. L'effetto fisiologico, seppur non chiaramente definito nella Direttiva 2002/46/CEE, viene anche denominato "claim", ovvero "ogni messaggio o rappresentazione che non è obbligatorio secondo la legislazione comunitaria o nazionale, incluse rappresentazioni illustrate, grafiche o simboliche, in qualsiasi forma, che attestino, suggeriscano o implicino che un alimento presenta caratteristiche particolari". Oltre ai claims nutrizionali previsti dalla direttiva 90/496/CEE sull'etichettatura nutrizionale, sono definiti come:

- “health claim” (indicazioni sulla salute) qualunque indicazione che affermi, suggerisca o sottintenda l’esistenza di un rapporto tra una categoria di alimenti, un alimento o uno dei suoi componenti e la salute;
- “reduction of disease risk claim” (indicazioni relative alla riduzione di un rischio di malattia) qualunque indicazione sulla salute che affermi, suggerisca o sottintenda che il consumo di una categoria di alimenti, di un alimento o di uno dei suoi componenti riduca significativamente un fattore di rischio di sviluppo di una malattia umana.

A tal proposito, è stato emanato il regolamento CE 432/2012, con il quale è stato pubblicato l’elenco dei claims salutistici in base al Regolamento CE 1924/2006 (regolamento claims). Con riguardo ai claims salutistici per le sostanze botaniche, la Commissione europea e l’EFSA (European Food Safety Authority) hanno rimandato la valutazione e le considerazioni su questi, in quanto ritengono necessario approfondire l’esame anche in merito alla corretta individuazione di questi particolari prodotti. Pertanto, sotto il profilo dei claims salutistici, ancora non ci sono disposizioni precise. Considerando che il regolamento claims si applica anche agli integratori, questa situazione di stallo normativo pare estendersi anche agli integratori alimentari. La disciplina sull’aggiunta di preparati vegetali negli integratori al momento rientra solo in ambito nazionale. Infatti, il Ministero della Salute ha pubblicato sul proprio sito l’elenco di cui all’Allegato 1 D.M. 9 Luglio 2012 sulle “sostanze e preparati vegetali ammessi” e, a fianco di ciascuna pianta, ha proposto quanto presente nelle “Linee guida ministeriali di riferimento per gli effetti fisiologici”. Nel documento, si specifica chiaramente che quanto inserito non fa parte integrante del decreto, e che è applicabile in attesa della definizione dei claims sulle preparazioni a base vegetale a livello comunitario.

Anche gli aspetti relativi alla sicurezza ed efficacia dei integratori alimentari a base erboristica rimangono di competenza legislativa nazionale. Ciò significa che le conclusioni inerenti l’uso di questo tipo di integratori possono differire nei diversi Stati Membri, causando una frammentazione del mercato. Infatti, le autorità competenti nazionali tendono generalmente a valutare un integratore a base vegetale

sulla base della propria esperienza d'uso. Non sorprende, quindi, che delle 1900 specie vegetali, diverse centinaia sono diversamente inquadrare nei 20 Stati Membri (oltre alla Croazia e alla Svizzera): alcune, infatti, sono proibite in alcune Stati Membri e permesse in altri; altre non sono regolamentate in alcuni Stati e sono, invece, permesse in altri; viceversa, altre ancora non sono ancora regolamentate in alcuni Stati e risultano proibite in altri. Al fine di aiutare le Autorità Competenti degli Stati Membri e le aziende, l'EFSA (European Food Safety Authority) ha provveduto alla pubblicazione di linee guida per la valutazione della sicurezza d'uso delle preparazioni a base vegetale, includendo dati scientifici e criteri necessari per la valutazione. Inoltre, l'EFSA ha sviluppato un "Compendium", ovvero una lista di sostanze, presenti in numerose specie vegetali, che presentano un potenziale rischio per la salute.

### **1.3.2 Percezione della sicurezza d'uso degli integratori a base erboristica da parte del consumatore**

La popolarità e la sempre più ampia diffusione degli integratori ha posto in evidenza diverse problematiche circa la sicurezza d'uso e i possibili rischi per la salute, soprattutto perchè la maggior parte dei consumatori tende a non informare nè il medico nè il farmacista circa l'utilizzo di questi prodotti (Eisenberg et al., 1998; Elder et al., 1997). A tal proposito, un'indagine sulle modalità d'uso degli integratori alimentari a base erboristica ha mostrato che il 69% di coloro che avevano dichiarato di utilizzare tali prodotti (21%), non ne aveva informato il proprio medico. Oltre a ciò, le problematiche relative all'utilizzo di integratori alimentari a base erboristica includono l'uso improprio, la scarsa qualità del prodotto, la presenza di più ingredienti vegetali che potenzialmente possono interagire tra loro o con altri farmaci. In questo senso, infatti, i PFS sono molto spesso stati criticati per la mancanza di evidenze scientifiche circa benefici e i rischi connessi al loro utilizzo, la mancanza di standardizzazione, di riferimenti qualitativi e la possibilità di interazioni con i farmaci. Inoltre, in molti Paesi sia europei che

extra-europei, gli integratori possono essere venduti senza particolari restrizioni, come la ricetta medica, e commercializzati liberamente, senza la presenza di claims salutistici (ovvero di messaggi che ne indichino l'effetto benefico sulla salute). Di conseguenza, l'utilizzo dei PFS può essere inadeguato a causa delle scarse informazioni che il consumatore riceve, dovuto anche alla possibilità di acquisto presso supermercati e via internet, dove non può contare sulle indicazioni circa il corretto utilizzo di tali prodotti; oltre a ciò, la presenza di ingredienti vegetali e quindi naturali rende i PFS innocui agli occhi del consumatore, senza la percezione della possibilità di interazioni con farmaci o nutrienti. Infine, le insufficienti informazioni ricevute possono causare un uso inadeguato del prodotto, con possibili effetti negativi sulla salute. Tali considerazioni sono supportate da dati provenienti dalla Health and Diet Survey (2002) hanno rivelato che del 73% di consumatori statunitensi che aveva dichiarato di utilizzare integratori nell'anno precedente, il 4% ha riportato di aver sviluppato effetti avversi (Timbo et al., 2006). In particolare, è stata riscontrata un elevato utilizzo concomitante di integratori e di farmaci in coloro che avevano sperimentato effetti avversi rispetto a coloro che usavano solo integratori. Ulteriori informazioni provenienti dal NHIS (2002), hanno mostrato che circa i due terzi degli utilizzatori di PFS non rispettano le indicazioni d'uso fornite dalle evidenze cliniche (Bardia et al., 2007). Inoltre, i consumatori hanno spesso la percezione che tali integratori siano sempre sicuri e testati dalle autorità regolatorie.

### **1.3.3 Problematiche inerenti alla qualità e la sicurezza degli integratori alimentari a base erboristica**

Per il consumatore, la qualità di un prodotto significa avere garanzia, affidabilità e soprattutto sicurezza nell'utilizzo. L'analisi della percezione che i consumatori hanno dei PFS ha messo come essi spesso considerino i PFS innocui in quanto "naturali". Basti pensare, per esempio, ai casi di epatotossicità causati dal consumo di piante come la kava (*Piper methysticum*) o la consolida (*Symphytum officinale*) per comprendere quanto questa percezione sia in molti casi errata. Esistono diversi

fattori che possono influire sulla qualità e quindi sulla sicurezza di un integratore a base erboristica; alcuni sono relativi alla pianta stessa, altri, invece, riguardano il tipo di preparazione, la modalità d'uso e il consumatore (Capasso et al., 2006). Per quanto concerne i fattori relativi alla pianta, occorre innanzitutto dire che esistono piante tossiche in assoluto, il cui utilizzo è ovviamente vietato all'interno di integratori alimentari, in quanto contengono sostanze come gli alcaloidi pirrolizidinici (es. *Symphytum officinale*) o aristolochici (es. *Aristolochia fangchi*) responsabili di tossicità epatica e renale. In altri casi, la tossicità dipende da altri fattori, quali la parte della pianta utilizzata (es. radici, foglie, fiori, frutti), le condizioni ambientali (clima e terreno) e le modalità di coltivazione (es. osservanza o meno delle pratiche di buona agricoltura, uso di pesticidi) e conservazione (umidità, temperatura). Per esempio, il *Conium maculatum* è tossico se raccolto nell'area mediterranea, mentre risulta innocuo nella zona della Siberia (Capasso et al., 2006); la tossicità della *Taxus baccata* dipende dalla parte della pianta considerata: è massima nelle foglie aghiformi, minima nella corteccia e nei coni maschili maturi; alcuni frutti (es. *Ginkgo biloba*, *Aesculus hippocastanum*), sono, a differenza delle foglie, molto tossici la cascara (*Rhamnus cascara*) è potenzialmente tossica appena raccolta, molto meno attiva dopo un anno di conservazione. Anche il tipo di estrazione o preparazione utilizzato può influenzare il contenuto e la concentrazione dei principi attivi e di conseguenza la sicurezza del PFS finale. Ad esempio, numerosi sono i casi di eventi avversi, descritti in letteratura, che riportano la tossicità epatica di estratti idroalcolici di tè verde (es. Exolise), probabilmente causata da una maggiore estrazione di principi attivi rispetto all'estratto acquoso (infuso). Anche la forma farmaceutica può essere causa di effetti negativi: per esempio, l'infuso di senna (*Cassia angustifolia*) può provocare crampi addominali e flatulenza, mentre il macerato glicerico, privo di sostanze resinose, non causa disturbi addominali (Capasso et al., 2006). In altri casi, gli eventi avversi possono verificarsi per la presenza, nel prodotto finito, di contaminanti botanici (es. parti di altre piante non menzionate nell'etichetta) o chimici (es. pesticidi, metalli pesanti) e microbiologici (presenza di batteri o tossine) o ancora la sostituzione volontaria di

una pianta con un'altra di minor costo o con un farmaco. Numerosi sono gli strumenti messi a disposizione dagli organismi internazionali al fine di consentire la produzione di PFS di qualità. Ad esempio, nelle norme di buona coltivazione presenti nelle linee guida del Programma sui medicinali tradizionali dell'Organizzazione Mondiale della Salute sono elencate le modalità per una corretta identificazione del materiale botanico di partenza e i metodi per una corretta valutazione macro/microscopica, caratterizzazione di marker molecolari e identificazione di proteine specie specifiche. Ciò si rende ancor più necessario dal momento che molte piante utilizzate in prodotti botanici sono di origine selvatica e non coltivate su larga scala. Di conseguenza, grande attenzione deve essere prestata a quei fattori meno controllabili associati a tali condizioni. I contaminanti principali del materia vegetale sono i pesticidi, i metalli pesanti, le micotossine, batteri, muffe e i lieviti. Il regolamento europeo n. 396/2005 stabilisce, i livelli e le modalità di controllo di residui massimi di pesticidi negli alimenti e mangimi. Non esiste ancora una categoria specifica per gli integratori alimentari a base erboristica, ma la matrice vegetale può essere ricondotta a una delle categorie "vegetali, freschi o congelati", "Tè, infusi" o "spezie". Attualmente, il limite massimo per quei prodotti per i quali non sono ancora stati stabilite specifiche, è di 0.01 mg/kg. Per quanto riguarda i metalli pesanti, c'è da sottolineare che in questi ultimi anni sono state ripetutamente accertate contaminazioni da piombo, cadmio, mercurio ed arsenico. E' stato accertato che circa il 25% di 260 prodotti botanici provenienti da alcuni Stati asiatici conteneva livelli elevati di piombo (tra i 10 e 319 ppm), mercurio (tra i 22 e i 5070 ppm) e arsenico (24-114 ppm). La presenza di elevati livelli di metalli pesanti è stata associata a numerosi effetti avversi quali ad esempio l'encefalopatia manifestata da un bambino di Hong Kong che aveva assunto un preparato cinese contenente alti livelli di piombo. Il regolamento EC n. 629/2008 ha stabilito i livelli massimi per gli integratori alimentari (appendice A) (EC, 2008). Il rischio di contaminazione batterica è un elemento da non sottovalutare, in quanto funghi e batteri possono produrre tossine estremamente tossiche. Le micotossine ad esempio, sono composti prodotti dalle muffe le cui spore possono germinare in particolari

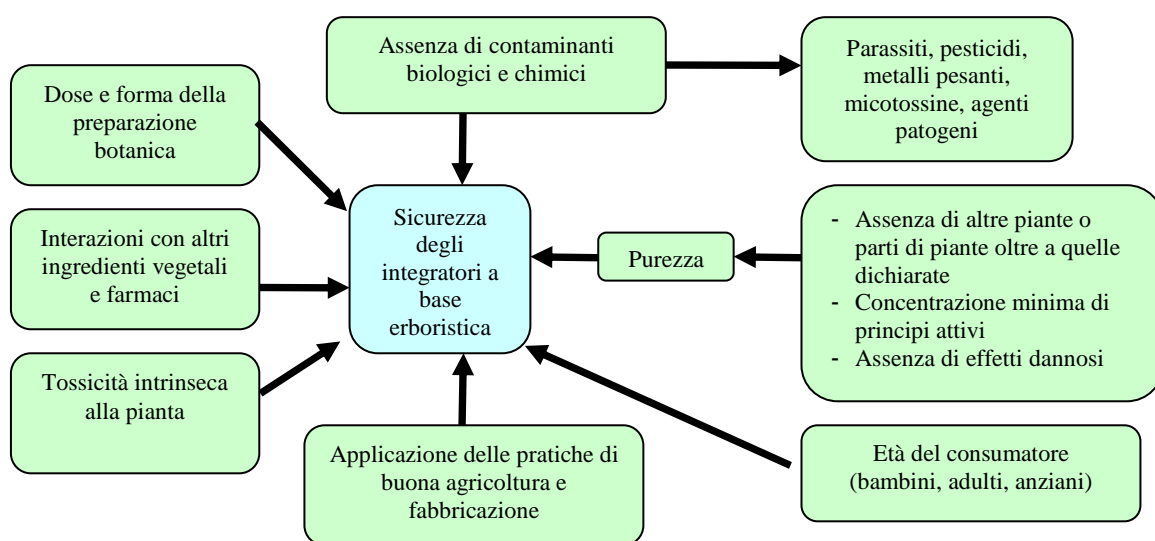
condizioni di umidità, luce e temperatura. Le micotossine più comunemente presenti in matrici alimentari e vegetali sono le aflatossine, per 14 delle quali la Comunità Europea ha stabilito i livelli massimi ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) in alcune matrici vegetali (*Zingiber officinale*, *Curcuma petiolata*, *Glycyrrhiza glabra* e *Capsicum spp.*).

Diversi studi hanno anche dimostrato che alcuni integratori possono contenere componenti attivi non dichiarati inclusi anticoagulanti (es. warfarin), anticonvulsivanti (es. fenitoina), statine, inibitori della 5-fosfodiesterasi (es. sildenafil), farmaci antiinfiammatori non steroidei (es. nimesulide), betabloccanti (es. propranololo), anoressizzanti (es. fenfluramina). Un report relativo ai farmaci vegetali cinesi ha riportato che di 260 prodotti medicinali raccolti in diversi punti vendita californiani, circa il 7% conteneva farmaci non dichiarati. E' facile comprendere come questo tipo di adulterazione possa avere serie conseguenze sulla salute del consumatore (Ko, 1998). Una revisione sistematica della letteratura ha evidenziato che almeno un evento fatale e altri sei molto gravi sono stati causati da adulterazioni con farmaci (antidiabetici orali, anticonvulsivanti, anti-infiammatori, farmaci contro l'impotenza maschile sono stati quelli maggiormente associati agli effetti avversi più gravi). Tali prodotti erano liberamente acquistabili nei negozi e su siti internet o via e-mail (Ko, 1998).

Infine, occorre aggiungere che la sicurezza degli integratori alimentari a base vegetale è connessa non solo a fattori riguardanti la qualità del prodotto, ma anche alle condizioni d'uso (es. durata dell'assunzione) da parte del consumatore. Per esempio, alcuni integratori dovrebbero usati per brevi periodi di tempo, come quelli per il controllo del peso o quelli usati per stimolare il sistema immunitario nei periodi freddi dell'anno (es. Echinacea). In questi casi, infatti, si assiste a livelli di assunzione dei principi attivi troppo elevati che possono causare effetti negativi per la salute. In altri casi, non si tiene conto delle possibili interazioni dei componenti attivi con farmaci o nutrienti (Sanzini et al., 2011) o dell'età del consumatore a cui è destinato il prodotto. Ad esempio, il bambino, se confrontato con l'adulto, può essere particolarmente sensibile agli effetti di piccole variazioni di dose per la diversa capacità di metabolizzazione. Allo stesso modo, anche gli anziani



presentano un elevato rischio di sviluppare effetti avversi per diverse ragioni: la necessità di assumere più farmaci, che aumentano la possibilità di incorrere in interazioni (es. elevato rischio di sanguinamento per concomitante uso di anticoagulanti e *Ginkgo biloba*); la ridotta capacità di metabolizzazione epatica ed escretiva renale; la disidratazione e la malnutrizione. Ad oggi, non esistono studi a lungo termine che permettano di stabilire la sicurezza relativa all'esposizione a lungo termine a ingredienti vegetali, e pochi studi clinici controllati e randomizzati sono stati effettuati al fine di verificarne gli effetti avversi. I consigli circa il corretto uso degli integratori alimentari a base erboristica sono basati quindi solo sui case reports e sulle segnalazioni spontanee (Cohen and Ernst, 2010). In Figura 1 sono riassunti i fattori che contribuiscono alla sicurezza ed efficacia degli integratori alimentari a base erboristica.



**Figura 1.1** – Fattori che contribuiscono alla sicurezza e qualità degli integratori a base erboristica

### 1.3.4 Problematiche inerenti gli effetti benefici di integratori alimentari a base erboristica

Come già ricordato in precedenza, gli integratori alimentari, a differenza dei medicinali, possono vantare esclusivamente proprietà benefiche come adiuvanti nei

processi fisiologici dell'organismo oppure nella riduzione di fattori di rischio per alcune patologie. Nella regolamentazione europea, dal 2002, gli integratori alimentari sono considerati alimenti e devono quindi rispettare i requisiti di sicurezza, composizione, etichettatura e confezionamento richiesti dalla legislazione alimentare. Oltre a ciò, si aggiungono specifiche regole circa la nutrizione i claims salutistici (Coppens et al., 2006). A partire dal 2007, la valutazione dell'efficacia dei prodotti alimentari, inclusi i PFS, è stata inclusa nei provvedimenti dell'European Nutrition and Health Claims Regulation (NHCR) (Regolamento EC n. 1924/2006). Questa valutazione è stata affidata all'European Food Safety Authority (EFSA). I criteri utilizzati dall'EFSA sono basati largamente sul lavoro sviluppato nell'ambito dei progetti FUFOSSE e PASSCLAIM, finanziati dall'Unione Europea, che affidano agli studi clinici randomizzati e controllati un ruolo cruciale per stabilire la relazione causa-effetto tra assunzione di un componente alimentare e l'effetto sulla salute (Bellisle et al., 1999). Questo approccio è applicato in maniera molto rigorosa, tanto che l'EFSA ha dato parere negativo su quasi la totalità di circa 2000 richieste di claims salutistici, indicando che l'effetto sulla salute indicato non è sufficientemente supportato dalle evidenze fornite. Alcuni claims, ad esempio quelli relativi all'abbassamento dei livelli di colesterolo, mineralizzazione ossea e carie dentale e quelli inerenti vitamine e minerali, il cui ruolo nell'organismo è ben conosciuto, sono stati accettati, mentre la maggior parte degli ingredienti vegetali, ad oggi, non ha ottenuto parere positivo. I medicinali vegetali tradizionali possono essere commercializzati tramite procedura semplificata se è dimostrato, tramite dati di letteratura, che il prodotto è stato utilizzato come medicinale per almeno 30 anni, di cui almeno 15 nella Comunità Europea (Direttiva n. 2004/24/EC). Tale procedura semplificata non necessita quindi di dati relativi all'efficacia poiché la tradizione d'uso è sufficiente per dimostrare l'assenza di pericolosità nelle condizioni d'uso specificate e gli effetti benefici. Tali considerazioni non vengono applicate, invece, nel caso di ingredienti vegetali di integratori alimentari o alimenti, poiché è l'NHCR ad occuparsi della dimostrazione di efficacia di tutti i componenti alimentari. Ciò crea una situazione nella quale non sono richieste prove di efficacia

se una pianta è utilizzata per le sue proprietà medicinali, ma nel momento si intende impiegarla per effetti salutistici/fisiologici sono richiesti studi clinici randomizzati e controllati nell'uomo. Tale discrepanza ha portato la Comunità Europea a non prendere alcuna decisione in merito alla valutazione dell'efficacia di prodotti a base vegetale (EU Food Commission, 2010). I criteri PASSCLAIM applicati dall'EFSA per la valutazione degli effetti benefici di componenti alimentari necessitano di una ben definita caratterizzazione dell'ingrediente e di biomarkers validati e misurabili. Inoltre, possono essere applicati ad estratti ben definiti o a composti puri isolati dalla matrice vegetale. L'applicazione a preparati vegetali è abbastanza limitata poiché spesso i composti responsabili dell'effetto benefico non sono stati identificati e possono anche non essere associati ad uno specifico marker (Biesalski et al., 2011). Di conseguenza, si pone la necessità di stabilire criteri per l'uso tradizionale che possano essere utilizzati anche per gli effetti salutistici di integratori alimentari a base erboristica. Gli effetti sulla salute di tali prodotti sono meno marcati rispetto a quelli dei farmaci e richiedono quindi studi clinici *ad hoc*, effettuati ad esempio, su un numero significativo di soggetti sani, utilizzando integratori standardizzati dotati di un'elevata biodisponibilità e biomarkers validati. Sono stati proposti diversi criteri relativi alla valutazione delle diverse fonti di documentazione per l'uso tradizionale. Tali criteri includono:

- Disponibilità di un'abbondante documentazione che dimostri una lunga storia di osservazione dell'effetto benefico;
- Utilizzo documentato della preparazione erboristica in diversi stati, regioni e continenti nelle medesime condizioni d'uso.
- Informazioni documentate sulla natura della preparazione erboristica e modalità d'uso (forme di dosaggio tradizionali, frequenza d'uso...)
- Evidenze di carattere osservazionale nell'uomo
- Disponibilità di monografie riguardanti gli effetti sulla salute tradizionalmente riscontrati.

## **1.4 Il progetto europeo PlantLIBRA**

Dalle considerazioni riportate in precedenza appare chiaro come siano presenti ancora numerose lacune nel modo in cui gli integratori a base vegetale sono valutati in termini di efficacia e sicurezza. Inoltre, come già accennato, un approccio condiviso in ambito europeo nella valutazione dei rischi e dei benefici associati all'uso dei PFS, contribuirebbe all'armonizzazione internazionale cui ancora non si è giunti. L'EFSA ha già iniziato a lavorare in questo senso tramite l'elaborazione di linee guida per la valutazione della sicurezza di preparati a base vegetale (EFSA, 2011) e la stesura del "Compendium of botanicals" ove sono riportate le piante che hanno lunga tradizione d'uso e i rispettivi componenti implicati in problematiche relative alla sicurezza. Numerosi progetti (es. EuroFir, MoniQa, Eurreca...), inoltre, sono stati finanziati dalla Comunità Europea al fine di stabilire approcci metodologici e sviluppare strumenti di monitoraggio della qualità e sicurezza degli alimenti, ma non dei PFS.

In questo panorama di mancanza di armonizzazione dal punto di vista legislativo e di "vuoto" circa la valutazione del rischio e beneficio di numerose piante impiegate come ingredienti di botanicals, è stato creato e successivamente finanziato il progetto europeo PlantLIBRA (acronimo di PLANT food supplements: Levels of Intake, Benefit and Risk Assessment) nell'ambito del 7° Programma Quadro. Il progetto ha avuto inizio nel giugno 2010 e terminerà alla fine di maggio 2014.

L'obiettivo generale del progetto PlantLIBRA è quello di implementare le conoscenze scientifiche sui PFS per meglio valutare i rischi e benefici connessi al loro utilizzo e in ultima analisi garantirne l'utilizzo in sicurezza. In particolare, gli obiettivi di PlantLIBRA sono:

- 1- ampliare la conoscenza relativa ai PFS attraverso la revisione sistematica della letteratura inerenti dati già pubblicati e tramite la realizzazione di nuovi studi per indagare rischi, benefici e nuovi approcci analitici. Ciò sarà integrato da una ricerca specifica sulle piante impiegate come ingredienti di PFS, sulla loro composizione fitochimica, caratteristiche botaniche, attività

biologica e componenti tossici. Questi dati verranno in seguito trasferiti in un meta- database utile non solo agli scopi propri del progetto, ma anche ad aziende e consumatori.

- 2- Supportare gli enti regolatori dell'Unione Europea nella valutazione dei rischi e dei benefici connessi all'uso dei PFS, integrando e implementando gli strumenti già in uso per questo scopo (es. EFSA e altre linee guida internazionali), Ciò contribuirà al raggiungimento da parte delle autorità regolatorie di un quadro decisionale più ampio e basato su dati scientifici, oltre a consentire informazioni sempre più accessibili a consumatori e aziende nell'ambito europeo.
- 3- Contribuire ad una migliore comprensione delle attitudini dei consumatori attraverso la prima indagine europea sull'assunzione dei PFS. I risultati di tale indagine, oltre agli studi inerenti alle abitudini dei consumatori e alla diretta collaborazione con le autorità regolatorie, potranno fornire utili informazioni alle aziende e ai legislatori al fine di accrescere nel consumatore l'uso consapevole e sicuro degli integratori alimentari.

#### **1.4.1 Principali attività del progetto europeo PlantLIBRA**

Le attività del progetto sono suddivise in diverse aree di lavoro (work-packages, WP), ciascuna incentrata su obiettivi specifici del progetto. Tali obiettivi includono la stima dell'assunzione di PFS tra i consumatori, la qualità e la composizione, l'efficacia, le attitudini dei consumatori, aspetti di sicurezza ed effetti avversi, valutazione rischio-beneficio e implicazioni politiche (fig. 2).

Il consumo di PFS è stato stimato in Paesi chiave della Comunità Europea (Finlandia, Germania, Italia, Spagna e Regno Unito) sulla base dei dati provenienti dalla letteratura, dalle aziende e da pubbliche istituzioni, e riguardanti le tendenze di mercato, i luoghi e le motivazioni dell'acquisto dei PFS da parte dei consumatori. Successivamente è stata avviata l'indagine sul consumo dei PFS nei Paesi europei sopra citati, i cui risultati definitivi

forniranno dati sulle modalità di consumo, sui fattori correlati all'utilizzo (es. stili di vita, fumo, alcol, status socio-economico, utilizzo concomitante di altri farmaci), sull'aderenza alle raccomandazioni d'uso e sulle motivazioni determinanti l'acquisto. Inoltre, tale indagine consentirà l'armonizzazione della terminologia relativa ai PFS e la loro classificazione. Per ottenere risultati attendibili e considerando le importanti differenze esistenti nel mercato europeo dei PFS, i questionari dell'indagine sono stati attentamente formulati per riflettere la variabilità tra i prodotti e distinguere i PFS dai fitofarmaci.

#### **1.4.2 Indagine relativa a ingredienti botanici e integratori alimentari a base vegetale**

In quest'ambito, l'obiettivo del progetto è quello di fornire nuovi dati sperimentali sui metodi più appropriati al fine di:

- 1-Identificare la matrice vegetale;
- 2-Analizzare i composti attivi dotati di effetti positivi o negativi sulla salute;
- 3-Rilevare contaminanti ambientali o residui derivanti dalle pratiche agricole;
- 4-Identificare markers biologici utili per valutare i livelli di esposizione, il ruolo fisiologico e/o gli errori di identificazione delle piante.

I metodi principali utilizzati per la determinazione di composti attivi, contaminanti, pesticidi e biomarkers di esposizione relativi ai PFS sono stati identificati nelle prime fasi del progetto e ad oggi sono in fase di valutazione e validazione. A questo fine è stata identificate alcune liste di classi di composti e piante in base alla loro rilevanza, tossicità, benefici e rischi. Un tale approccio include anche la messa a punto di nuovi metodi per quantificare i composti utili per l'identificazione e per verificarne l'attività fisiologica/tossicologica. Inoltre, è in fase di organizzazione un network internazionale di laboratori con comprovata esperienza in test analitici specifici per i PFS. Tale network ha lo scopo di promuovere ulteriori indagini nel settore dei prodotti a base vegetale e di fornire alle autorità regolatorie la possibilità di avvalersi di laboratori di

riferimento per questioni riguardanti la qualità e la sicurezza dei PFS (Bucchini et al., 2011).

### **1.4.3 Valutazione degli effetti avversi ad integratori alimentari a base erboristica**

Un altro importante obiettivo del progetto PlantLIBRA è quello riguardante l'individuazione degli effetti avversi, avvenuti nell'uomo, a ingredienti vegetali. A tale scopo, è stata effettuata una raccolta di effetti avversi ben documentati a piante consumate come alimento o come ingredienti di integratori alimentari a base vegetale, corredati da informazioni e caratterizzazione della componente vegetale, il suo ruolo negli eventi avversi o eventuali errori di riconoscimento (tali dati verranno integrati da quelli provenienti dai Centri Antiveneni Europei). Per implementare la conoscenza relativa agli effetti avversi a piante utilizzate come ingredienti di integratori alimentari, attività fondamentali del progetto saranno i markers biologici di effetti avversi, valutare le fonti di possibili errori di identificazione delle piante, raccogliere dati sulle interazioni tra ingredienti vegetali e nutrienti o tra ingredienti vegetali e farmaci, in collaborazione con la rete internazionale di vigilanza (attraverso l'Associazione Europea dei Centri Antiveneno e Tossicologi Clinici – EAPCCT).

### **1.4.4 Il meta-database ePlantLIBRA**

I dati prodotti dalle attività precedentemente descritte saranno raccolte in un meta-database che consentirà di indirizzare le necessità delle autorità regolatorie e delle industrie, che richiedono una maggiore conoscenza relativa alla piante utilizzate nei PFS, in merito alla composizione, tipologia di composti attivi, sicurezza, residui e contaminanti. Infatti, il meta-database creato nell'ambito del progetto integra i database (eBASIS, sviluppato da EuroFIR e MoniQA) relativi ai composti ed

estratti vegetali, metodi analitici, case-reports di eventi avversi, dati di letteratura riguardanti i rischi e i benefici, potenziali contaminanti, avvertenze da parte delle autorità, in modo da rendere possibile la valutazione del rischio e del beneficio sulla base di informazioni scientifiche verificate e attendibili.

#### **1.4.5 Valutazione degli effetti benefici di integratori alimentari a base erboristica**

Al fine di consentire una corretta valutazione del rischio e del beneficio connesso all'uso dei PFS da parte delle autorità regolatorie, oltre ad una maggiore conoscenza di tali prodotti da parte di consumatori e aziende, un'importante parte del progetto sarà dedicata all'identificazione, applicazione e validazione di metodologie per valutare gli effetti benefici associati al consumo dei PFS. A tal fine, il progetto si propone di rivedere e validare in studi nell'uomo i biomarkers di esposizione specifici per i PFS più comunemente utilizzati. Occorre inoltre osservare che i biomarkers di esposizione hanno notevole importanza sia per la valutazione del rischio che del beneficio, dal momento che l'effetto fisiologico dei PFS dipende strettamente dalla dose di assunzione. In tal contesto, il beneficio ottenibile dal consumo di integratori alimentari a base vegetale può essere definito come "l'ottenimento di specifici effetti fisiologici quali la riduzione di fattori di rischio per patologie croniche e il mantenimento dell'omeostasi dell'organismo umano, ovvero la capacità di mantenere lo stato di benessere e di equilibrio in risposta a cambiamenti nell'ambiente circostante". Tale definizione è insita nella definizione di integratore alimentare e definisce il ruolo di tale categoria di prodotti sulla salute umana. Per l'identificazione dei biomarkers di esposizione e, di conseguenza, dell'effetto benefico, PlantLIBRA prevede di effettuare alcuni studi di breve durata nell'uomo. In particolare, la ricerca verrà effettuata nelle urine, che costituiscono, generalmente, la fonte migliore dei biomarkers di esposizione e richiede un intervento meno invasivo rispetto, ad esempio, al prelievo di campioni ematici. Prima dello svolgimento degli studi *in vivo* nell'uomo, il progetto ha previsto un



primo screening tramite metodologie *in vitro*, opportunamente selezionate, per verificare nella maniera più efficiente il potenziale effetto benefico dei PFS. Una delle aree di ricerca identificate nel progetto PlantLIBRA per la valutazione dei benefici connessi all'uso di PFS è quella infiammatoria, trattata nei paragrafi successivi.

## **1.5 L'infiammazione**

L'infiammazione è un meccanismo di difesa aspecifico che l'organismo mette in atto in risposta a vari stimoli dannosi quali, ad esempio, un danno tissutale, infezioni e risposte immunitarie. Il processo flogistico (dal greco *phlógōsis*, combustione) è composto da una sequenza di eventi a livello vascolare e cellulare che hanno lo scopo di favorire l'eliminazione dell'agente dannoso nonché la riparazione o la sostituzione del tessuto danneggiato. Il processo infiammatorio è di essenziale importanza per la difesa dell'organismo: esso si comporta, infatti, sia come una prima linea di difesa, in risposta a traumi o agenti patogeni, sia come innesco e "forza lavoro" ausiliaria per la risposta immunitaria specifica. Nonostante ciò le risposte infiammatorie, se eccessivamente reiterate nel tempo, sono di per sé capaci di causare un danno tissutale, contribuendo così all'insorgenza ed alla progressione di numerose patologie. Tutti i distretti corporei sono potenzialmente soggetti al processo infiammatorio; nei paragrafi successivi è discussa in maniera approfondita l'infiammazione a livello gastrico poiché su questo aspetto si basa la valutazione dell'attività biologica dello studio sperimentale presentato in questa tesi.

### **1.5.1 La gastrite**

La gastrite è definita come l'infiammazione della mucosa gastrica confermata, su base istologica, dalla presenza di un infiltrato infiammatorio costituito da neutrofili e cellule mononucleari (Rugge et al., 2011). L'attuale classificazione delle gastriti è basata sulla eziologia e ne distingue due tipologie principali: le gastriti Hp-correlate,

in cui il processo infiammatorio è scatenato dall'infezione da parte dell'*Helicobacter pylori* e le gastriti non Hp-correlate, in cui il processo infiammatorio è scatenato da altri agenti, prevalentemente agenti chimici o malattie a carattere autoimmunitario.

### **1.5.2 Le gastriti Hp-correlate**

#### Epidemiologia delle gastriti Hp-correlate

L'*Helicobacter pylori* rappresenta il più comune agente eziologico della gastrite. Esso è un batterio microaerofilo, acidofilo, gram-negativo e flagellato in grado di colonizzare la mucosa gastrica e recentemente classificato come cancerogeno di tipo I. L'infezione da *Helicobacter pylori* è particolarmente diffusa ed interessa più del 50% della popolazione mondiale, con una maggiore prevalenza nei bambini e nei Paesi in via di sviluppo. In particolare si stima che l'infezione da *Helicobacter pylori* abbia una prevalenza del 25-50% nei Paesi industrializzati e del 70-90% nei Paesi in via di sviluppo (Smith et al., 2003). L'infezione da *Helicobacter pylori* avviene normalmente durante l'infanzia, è rara in età adulta, anche se vi possono essere notevoli differenze nelle tempistiche dell'infezione in funzione della condizione socio-economica dei soggetti (a sua volta strettamente correlata al livello di igiene domestica ed al numero di individui conviventi nella stessa unità abitativa) e del paese di origine: i bambini residenti nei Paesi in via di sviluppo contraggono l'infezione tipicamente prima dei 10 anni di età mentre nei Paesi industrializzati vi è un aumento della prevalenza di questa infezione correlato all'età (Tan e Wong, 2011). La modalità di trasmissione dell'infezione tra i soggetti rimane ancora da chiarire: la via di trasmissione più probabile sembra essere quella oro-fecale, mentre la trasmissione orale-orale sembra essere poco probabile, sebbene il batterio sia stato riscontrato anche a livello della saliva e della placca dentaria. Nonostante l'elevata prevalenza dell'infezione da *Helicobacter pylori*, la maggior parte dei soggetti infetti (80-90%) risultano essere del tutto asintomatici (con una moderata infiammazione individuabile solamente attraverso biopsia e successiva analisi istologica) mentre solo il rimanente 10-20% va incontro allo sviluppo di

alcune patologie quali la gastrite atrofica, l'ulcera peptica, l'adenocarcinoma gastrico ed il linfoma associato alle mucose (MALT). Circa il 3% dei soggetti sviluppa inoltre tumore gastrico (Correa et al., 2006). Le differenze inter individuali nella risposta patologica possono essere ascrivibili a numerosi fattori, tra cui si ricordano: fattori di virulenza del batterio, la predisposizione genetica del soggetto-ospite (Malaty et al., 1994), la risposta immunitaria dell'ospite e fattori ambientali come lo stile di vita (in particolare il fumo e lo stress) (Dorer et al., 2009). Tra i fattori di virulenza, termine con il quale si identificano tutti gli effettori che consentono al microrganismo di invadere ed infettare l'organismo-ospite, si ricordano: l'apparato flagellare, le molecole di adesione, l'ureasi e le tossine batteriche (quali l'LPS ed il CagA).

#### I fattori di virulenza dell' *Helicobacter pylori*

- L'apparato flagellare: *Helicobacter pylori* è dotato di un apparato flagellare, costituito da 4 a 7 flagelli unipolari, codificati da più di 40 geni sparsi nel genoma. Ciascun flagello è costituito da un filamento proteico, composto da un co-polimero di flagellina A (FlaA) e flagellina B (FlaB), circondato da uno strato membranoso che lo protegge dall'acidità tipica dello stomaco (Kostrzynska et al., 1991; Suerbaum, 1995) e connesso al corpo basale dall'uncino (o *flagellar hook*), codificato dal gene flgE. L'apparato flagellare è di vitale importanza per la capacità di colonizzazione: i flagelli permettono infatti al microrganismo di muoversi rapidamente nel lume gastrico ed attraverso lo strato di muco che ricopre e protegge le cellule epiteliali. L'importanza dell'apparato flagellare per la colonizzazione dell'ospite è dimostrata dal fatto che la mutazione di uno qualsiasi dei geni coinvolti nella motilità è in grado di rendere il patogeno incapace di colonizzare l'ospite (Foyne et al., 2000; Kavermann et al., 2003; Kim et al., 1999; Ottemann e Lowenthal, 2002).
- Le molecole di adesione: *Helicobacter pylori*, una volta all'interno dello strato mucoso che riveste l'epitelio gastrico, deve, per poter mettere in atto

una infezione persistente, aderire alle cellule epiteliali. Per fare ciò, si avvale di una serie di proteine, note complessivamente come adesine, le quali, interagendo con recettori presenti sulle cellule epiteliali dello stomaco umano, consentono al patogeno di ancorarvisi stabilmente. Tra le principali molecole di adesione espresse dall'*Helicobacter pylori* si ricordano: l'HpaH, una proteina legante l'N-acetilneuroaminil-lattosio, BabA, AlpA e AlpB e KatA, la catalasi di *H. pylori*, la quale sembra mediare l'attacco a residui di fosfatidiletanolamina sulla superficie delle cellule epiteliali. E' importante ricordare, comunque, che solo circa il 20% della popolazione totale di *Helicobacter pylori* presente a livello gastrico aderisce alle cellule epiteliali; il rimanente 80% rimane localizzato nel muco, in stretta vicinanza all'epitelio gastrico, ma senza aderire allo stesso. Il legame dell'*Helicobacter pylori* alla membrana plasmatica apicale delle cellule epiteliali gastriche non è senza conseguenze per la cellula ospite: il contatto con il batterio conduce infatti ad un profondo riarrangiamento della membrana plasmatica, dovuto ad una riorganizzazione del citoscheletro di actina, che favorisce l'estensione della membrana plasmatica e, quindi, un aumento della superficie di contatto tra la membrana plasmatica cellulare e la superficie batterica.

- L'ureasi: l'ureasi è un enzima multimerico di 550 kDa appartenente alla classe delle idrolasi ed altamente espresso nell'*Helicobacter pylori*, dove rappresenta il 10% delle proteine cellulari totali (Montecucco e Rappuoli, 2001). Dal punto di vista strutturale l'enzima ureasi è costituito da dodici subunità, sei subunità UreA e sei subunità UreB, dove, a livello del sito attivo di ciascuna delle subunità UreB, sono presenti due ioni nichel Ni<sup>2+</sup>, fondamentali per il funzionamento dell'enzima stesso. L'ureasi catalizza l'idrolisi dell'urea, normalmente presente all'interno delle secrezioni gastriche, in ammoniaca ed anidride carbonica (Figura 1.2). Tali composti, innalzano il pH del microambiente che circonda il batterio, permettendone la sopravvivenza. In assenza dell'ureasi, l'estrema acidità tipica dello

stomaco, con un pH di circa 2, impedisce la sopravvivenza del batterio; studi condotti in modelli animali con ceppi di *Helicobacter pylori* mutanti per l'ureasi hanno infatti evidenziato che questo enzima è essenziale per la colonizzazione e la sopravvivenza del batterio nello stomaco (Tsuda et al., 1994). E' importante ricordare che gli ioni ammonio che si generano dall'azione ureasica sono in grado di mediare, sia direttamente che indirettamente, un danno all'epitelio gastrico: tali ioni, già tossici di per se a causa del loro pH, possono inoltre dare luogo alla formazione di ioni idrossido, in grado di esercitare una forte azione citotossica nei confronti delle cellule epiteliali gastriche. L'attività ureasica del batterio, quindi, oltre ad essere implicata nella sopravvivenza del microrganismo a pH estremamente acidi, è coinvolta anche nella patogenicità del batterio, in quanto può determinare una azione lesiva a livello dei tessuti



**Figura 1.2** - Reazione di idrolisi dell'urea, catalizzata dall'enzima ureasi

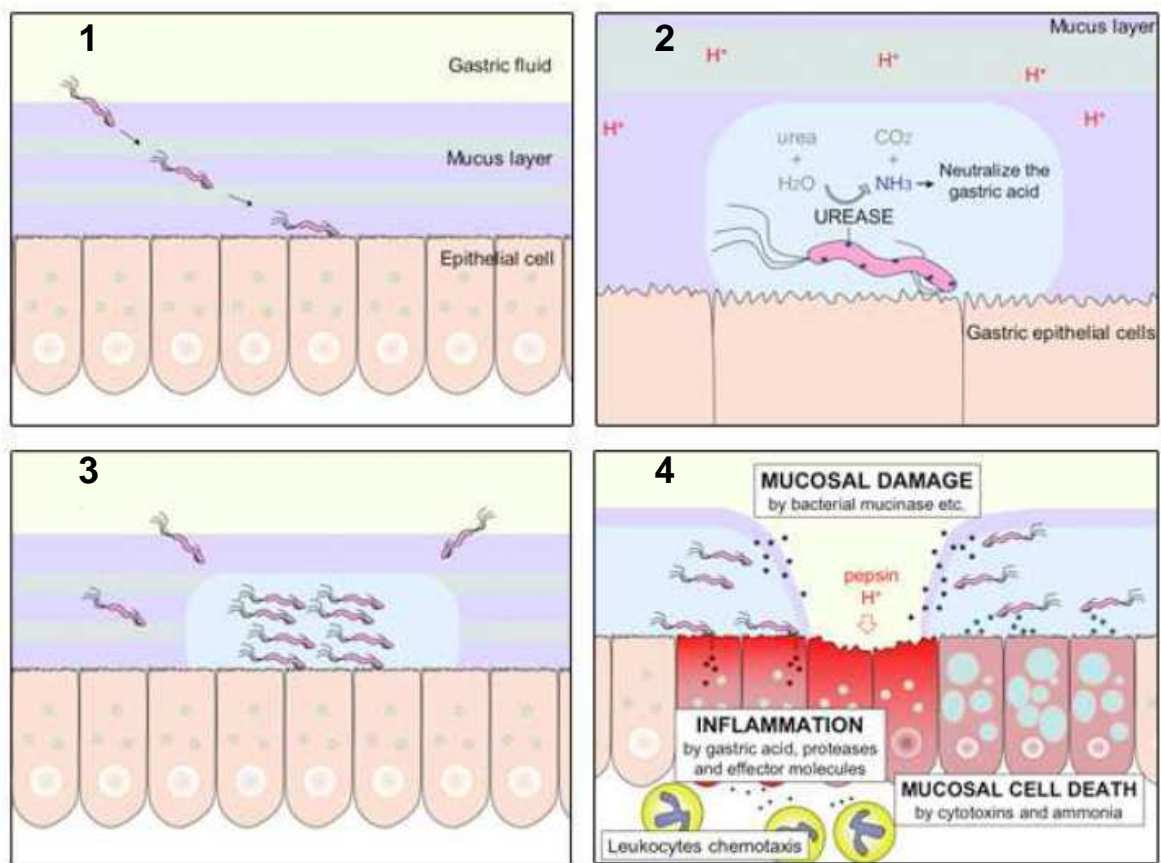
- Le citotossine batteriche: tra i più importanti effettori coinvolti nel danno tissutale a livello dell'epitelio gastrico si ricordano la citotossina CagA e la citotossina vacuolizzante VacA, espressi in alcuni ceppi di *Helicobacter pylori*, denominati rispettivamente *cag+* e *vacA+*. La proteina CagA, codificata dal gene *cagA* (*Cytotoxin associated gene A*), è una proteina di superficie di 130 kDa codificata dalla isola di patogenicità *cag* (*cag PAI*), una regione genomica di 40 kb codificanti per circa 30 proteine coinvolte in diverse fasi dell'infezione (Censini et al., 1996; Covacci et al., 1997). Le

proteine codificate dalla *cag PAI*, inclusa la citotossina CagA, sembrano non avere una azione tossica diretta ma piuttosto una azione antigenica attraverso la quale inducono una intensa risposta infiammatoria con produzione di chemochine, ed in particolare di IL-8, da parte delle cellule dello stomaco, contribuendo in tal modo al danneggiamento della mucosa; inoltre, la *cag PAI* sembrerebbe indurre un aumento della secrezione acida da parte delle cellule epiteliali, con conseguente sviluppo di ulcere (Crabtree et al., 1992). La tossina vacuolizzante VacA, espressa da circa il 50% dei ceppi di *Helicobacter pylori* (Bodger e Crabtree, 1998), e codificata dal gene *vacA* (non incluso nell'isola di patogenicità *cag*) è invece in grado di mediare un effetto citotossico diretto e la sua espressione da parte del batterio risulta essere positivamente associata con i più severi stadi di infiammazione gastrica ed ulcera peptica. E' da ricordare comunque che, sebbene il gene *vacA* possa essere presente sia nei ceppi *cag+* che nei ceppi *cag-*, la proteina VacA è attiva esclusivamente nei ceppi *cag+* (Xiang et al., 1995).

### Modalità di infezione dell' *Helicobacter pylori*

La modalità di infezione da parte dell'*Helicobacter pylori* può essere schematizzata in tre fasi principali: colonizzazione delle cellule epiteliali dello stomaco, creazione di un microambiente adatto alla sopravvivenza del microrganismo e riproduzione del microrganismo patogeno con conseguente danneggiamento della mucosa gastrica. Nella prima fase, il batterio, grazie alla presenza dei flagelli, penetra nello strato di muco che ricopre le cellule epiteliali gastriche ed aderisce alle stesse per mezzo di specifiche proteine d'adesione, le adesine. La fase di colonizzazione delle cellule epiteliali è permessa, oltre che dai flagelli, anche dall'attività ureasica del batterio, che lo difende dalle condizioni di acidità estrema che caratterizzano il lume gastrico. Nella seconda fase l'*Helicobacter pylori* mette in atto strategie in grado di garantirgli la sopravvivenza in un ambiente estremamente ostile; in particolare questo viene realizzato attraverso l'innalzamento del pH determinato dall'attività

ureasica: l'urea, normalmente presente all'interno del lume gastrico, viene convertita in anidride carbonica ed ammoniaca, che innalza il pH nell'intorno del batterio. Una volta colonizzata la mucosa gastrica, l'*Helicobacter pylori* si ritrova in un ambiente ideale per la sua sopravvivenza; esso va quindi incontro a riproduzione ed alla produzione di alcuni composti (quali le citotossine CagA e VacA) in grado di danneggiare le cellule epiteliali e di attivare una risposta infiammatoria (Figura 1.3).



**Figura 1.3** - Infezione e danneggiamento della mucosa gastrica da parte dell'*Helicobacter pylori*. Nell'immagine 1 è mostrata la colonizzazione delle cellule epiteliali dello stomaco; nell'immagine 2 è mostrata la creazione del micro-ambiente basico, idoneo alla sopravvivenza del microrganismo. Nell'immagine 3 e 4 sono mostrate la riproduzione del microrganismo ed il danneggiamento della mucosa gastrica

## Risposta dell'organismo all'infezione da parte dell'*Helicobacter pylori*

A seguito dell'infezione, l'organismo ospite scatena un'importante risposta immunitaria, sia innata, attraverso l'interazione dei TLRs (*Toll-Like Receptors*) (Lepper et al., 2005) e NLRs (*Nod-Like Receptors*) con elementi del patogeno, dal rilascio di citochine da parte delle cellule epiteliali e dall'infiltrazione di neutrofili e macrofagi, sia acquisita con l'attivazione linfocitaria nella mucosa gastrica e l'induzione di una risposta umorale specifica caratterizzata dalla produzione di IgA, IgM ed IgG (Lindholm et al., 1998; Lindholm et al., 2001; Mohammadi et al., 1996; Mohammadi et al., 1997; Noach et al., 1994). Il sistema immunitario innato modula la risposta all'infezione da parte dell'*Helicobacter pylori* e dei suoi prodotti attraverso due principali classi di recettori: i TLRs ed i NLRs. Tali recettori, a seguito dell'interazione con i loro specifici ligandi, attivano la trascrizione di fattori come NF- $\kappa$ B, AP-1 e CREB-1, inducendo la produzione di numerose citochine infiammatorie, quali il TNF (*Tumor Necrosis Factor*), l'IL-1b, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-10, l'IL-12, l'IL-18 (Sánchez-Zauco et al., 2010), l'ENA-78 (*Epithelial cell derived Neutrophil-Activating protein 78*), il GM-CSF (*Granulocyte-Monocyte Colony-Stimulating Factor*), RANTES (*Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted*) e GRO (*Growth Regulated Oncogene*). Più precisamente i TLRs sono recettori che partecipano al riconoscimento di molecole associate ai microrganismi (MAMP) e di molecole associate al danno (DAMP). Nei mammiferi sono presenti 13 tipi di recettori TLRs. Essi sono recettori transmembrana caratterizzati dalla presenza di un dominio extracellulare comprendente regioni ripetute ricche in leucina (LRR) di 24-29 amminoacidi; presentano inoltre una o due regioni ricche in cisteina ed un dominio intracellulare di circa 200 amminoacidi denominato TIR (Toll/IL-1R), che media la trasduzione del segnale (Aderem et al., 2000). Ciascuno dei 13 tipi di TLRs presenti nei mammiferi svolge funzioni differenti: il TLR2 riconosce il peptidoglicano (PGN), l'acido lipoteicoico (LTA) e le lipoproteine dei batteri Gram positivi, così come lo zimosano dei lieviti. Il TLR3 riconosce l'RNA a doppio filamento (dsRNA). Il TLR4 riconosce il lipopolisaccaride (LPS) della parete dei batteri Gram negativi e le proteine dello *shock* termico (HSP) di 60 e 70



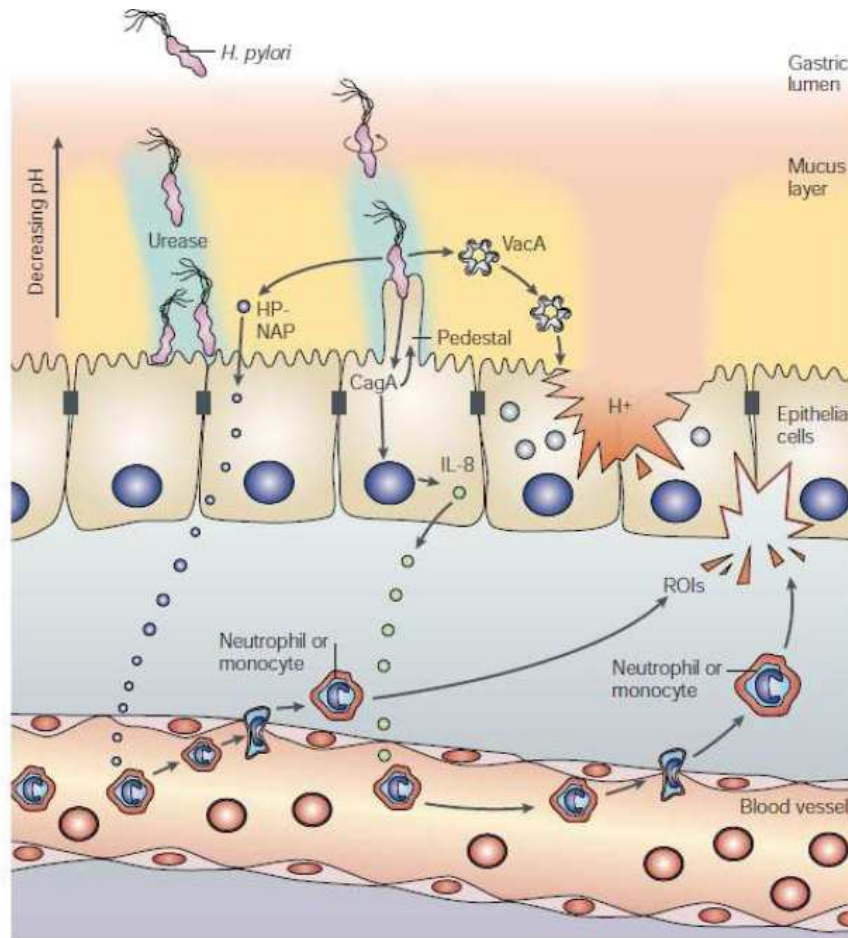
kDa. Il TLR5 riconosce la flagellina batterica mentre il TLR9 partecipa al riconoscimento della CpGs, del DNA non metilato. I TLR1, TLR6 e TLR10 possono formare eterodimeri con il TLR2, aumentando la specificità per i suoi ligandi (Akira et al., 2006). Il patogeno produce e secerne inoltre molecole chemoattrattive in grado di attraversare la barriera epiteliale quali, la proteina *HP-NAP* (*Helicobacter pylori neutrophil activating protein*), una proteina di 150 kDa in grado di indurre l'attivazione e l'attrazione dei neutrofili e dotata di attività chemotattiche anche verso i monociti. La degradazione tissutale che segue il reclutamento e l'attivazione di cellule infiammatorie non risulta essere sufficientemente dannosa per l'ospite ma, grazie alla moderata risposta infiammatoria ed alle associate alterazioni nelle membrane basali e nelle giunzioni strette delle cellule epiteliali, promuove la produzione ed il rilascio di nutrienti dalla mucosa in grado di sostenere la crescita di *Helicobacter pylori* (Montecucco e Rappuoli, 2001). L'*Helicobacter pylori* e i suoi prodotti sono quindi in grado di dare luogo ad infiammazione gastrica attraverso due principali meccanismi: il danno mucosale diretto e/o la liberazione di mediatori chimici pro-infiammatori da parte delle cellule epiteliali.

- Danno mucosale diretto: il legame del microrganismo all'epitelio cellulare si accompagna a perdita dei microvilli, irregolarità del bordo luminale e cambiamenti intracellulari dovuti al rilascio di enzimi e tossine da parte dell'*Helicobacter pylori*. L'*Helicobacter pylori* esprime infatti numerose citotossine ed enzimi, alcuni dei quali (come l'ureasi, le fosfolipasi e gli enzimi proteolitici), possono avere un ruolo diretto nel danno alla mucosa.
- Liberazione di mediatori chimici pro-infiammatori da parte delle cellule epiteliali: l'epitelio gastrico è una importante fonte di chemochine che vengono rilasciate sia in risposta all'infezione da *Helicobacter pylori* che di mediatori pro-infiammatori endogeni. Il rilascio epiteliale di chemochine indotto dall'infezione coinvolge l'attivazione di NF- $\kappa$ B (Bodger et Crabtree, 1998) e sembra essere particolarmente importante negli stadi iniziali dell'infiammazione indotta dall'*Helicobacter pylori*, in cui l'epitelio

gastrico agisce come importante prima linea di difesa contro l'infezione microbica. Nella Tabella 1.2 sono elencate le principali chemochine e citochine che si riscontrano nelle gastriti Hp-associate e in Figura 1.4 sono rappresentati i principali fattori coinvolti in questo tipo di gastriti.

<u>MEDIATORE</u>	<u>AZIONE</u>
<u>Citochine</u>	
<i>TNF</i>	Pro-infiammatoria
<i>IL-1</i>	Pro-infiammatoria
<i>IL-6</i>	Pro-infiammatoria
<i>IL-7</i>	Regolazione dei linfociti T e B
<i>IL-10</i>	Down-regolazione della risposta immunitaria
<i>IL-12</i>	Stimolazione della risposta Th1
<i>INF-<math>\gamma</math></i>	Pro-infiammatoria
<i>GM-CSF</i>	Pro-infiammatoria
<u>Chemochine</u>	
<i>IL-8</i>	Reclutamento ed attivazione dei neutrofili
<i>GRO</i>	Reclutamento ed attivazione dei neutrofili
<i>RANTES</i>	Reclutamento ed attivazioni delle cellule mononucleari
<i>MIP-1<math>\alpha</math></i>	Reclutamento ed attivazioni delle cellule mononucleari

**Tabella 1.2** - Principali mediatori chimici implicati nelle gastriti Hp-associate



**Figura 1.4** - Rappresentazione della mucosa gastrica colonizzata dall'*Helicobacter pylori*. Durante l'infezione il batterio entra nel lume gastrico grazie al movimento dei flagelli ed all'attività ureasica. L'ureasi permette la colonizzazione e la sopravvivenza del batterio in un ambiente acido attraverso la produzione di ammoniaca, che tampona il pH. Il batterio raggiunge quindi la superficie apicale dell'epitelio cellulare gastrico e si lega ad essa attraverso specifiche molecole di adesione, le adesine. Il patogeno inietta quindi la proteina CagA nelle cellule ospiti attraverso un sistema di secrezione di tipo IV e rilascia altri fattori tossici come la HP-NAP e VacA. VacA induce alterazioni delle giunzioni strette e la formazione di larghi vacuoli. La HP-NAP attraversa la barriera epiteliale e recluta i neutrofili ed i monociti dai vasi ematici; questi possono causare danni tissutali attraverso il rilascio di intermedi reattivi dell'ossigeno (ROIs). Le proteine CagA iniettate determinano l'alterazione del citoscheletro, l'estroflessione della membrana plasmatica ed il rilascio di linfocine pro-infiammatorie, che amplificano la reazione infiammatoria con il reclutamento di linfociti ed inducono un ulteriore rilascio di ROIs. La combinazione dell'attività tossica di VacA e dei ROIs comporta un danno tissutale che è ulteriormente aggravato dalla perdita dello strato mucoso e dall'ingresso degli acidi gastrici (Montecucco e Rappuoli, 2001).

### Le gastriti non Hp correlate

Le gastriti non Hp correlate comprendono tre principali tipologie di gastriti: le gastriti da agenti chimici (o gastropatie), le gastriti autoimmuni ed altre tipologie di gastriti.

- Le gastriti da agenti chimici (o gastropatie): numerosi agenti chimici sono in grado di dare luogo ad un ampio spettro di lesioni della mucosa gastrica, associate ad un lieve stato infiammatorio. La maggior parte delle gastropatie chimiche sono asintomatiche e, nella maggioranza dei casi, sono causate dai FANS, farmaci antinfiammatori non steroidei in grado di determinare un danneggiamento della mucosa gastrica attraverso un duplice meccanismo: l'azione lesiva provocata dal diretto contatto del farmaco con la mucosa gastrica e l'inibizione della sintesi dei prostanoidei, i quali svolgono un importante ruolo di protezione nei confronti della mucosa gastrica. I prostanoidei, infatti, stimolano la secrezione di muco e di bicarbonato e partecipano al mantenimento di un adeguato flusso ematico della mucosa. L'inibizione della loro biosintesi (attraverso l'inibizione della COX-1) comporta perciò una modificazione dello strato di muco che riveste la mucosa gastrica ed una riduzione del flusso ematico, rendendo la mucosa gastrica maggiormente suscettibile al danno.
- La gastrite autoimmune: con il termine gastrite autoimmune si intende l'infiammazione della mucosa gastrica determinata da un'aggressione autoimmunitaria. Tale tipologia di gastrite è normalmente limitata al *corpus* dello stomaco, con anticorpi diretti contro le cellule parietali e contro il fattore intrinseco. I soggetti affetti da gastrite autoimmune presentano generalmente ipo/acloriduria, ipergastrinemia, basso rapporto pepsinogeno I/pepsinogeno II (parallelamente alla perdita delle ghiandole oxintiche), carenza di vitamina B12 ed anemia macrocitica.
- Altre tipologie di gastriti: nella pratica clinica la prevalenza delle altre tipologie di gastriti è praticamente trascurabile. La maggior parte delle gastriti virali, micotiche, batteriche (con l'eccezione di quella causata dall'*Helicobacter pylori*) o da altri parassiti sono associate ad immunodeficienza e non sono significativamente coinvolte nel pathway di sviluppo tumorale gastrico.

## I fattori di trascrizione NF-κB

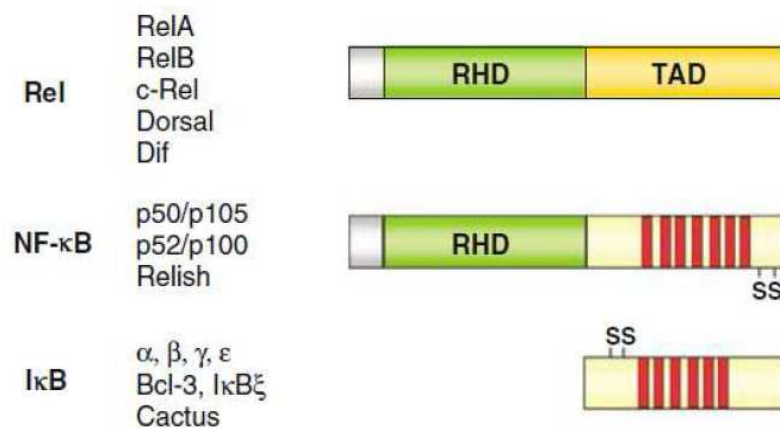
NF-κB è una famiglia di fattori di trascrizione inducibili, espressi in modo ubiquitario, che giocano un ruolo importante nella regolazione del processo infiammatorio e di numerosi processi fisiologici quali la crescita, il differenziamento cellulare, l'apoptosi, la plasticità sinaptica e la memoria (Albensi e Mattson, 2000; Barkett et al., 1999). La grande famiglia dei fattori di trascrizione NF-κB è composta, nei mammiferi, da cinque membri suddivisi in due principali sottofamiglie (Tabella 1.3): 1) le proteine NF-κB o di classe I, tra cui la proteina p50 e p52, che vengono prodotte dal processamento proteolitico dei loro precursori (p105 e p100, rispettivamente) e 2) le proteine Rel o di classe II, tra cui c-Rel, RelB e RelA, nota anche come p65 (Hayden et al., 2008).

Sottofamiglia	Proteine	Gene
NF-κB o classe I	NF-κB1 (o p105 → p50)	NFKB1
	NF-κB2 (o p100 → p52)	NFKB2
Rel o classe II	c-Rel	REL
	RelA (o p65)	RELA
	RelB	RELB

**Tabella 1.3** - Proteine presenti nell'uomo appartenenti alla famiglia NF-κB

Tutte queste proteine, sia le NF-κB che le Rel, condividono un dominio altamente conservato posto all'estremità N-terminale noto come RHD (*Rel Homology Domain*) e mediano funzioni simili (Gilmore, 1990). Il dominio RHD è caratterizzato dalla presenza di sequenze coinvolte nella dimerizzazione delle proteine, nel loro legame al DNA e nel legame agli inibitori IκB (Figura 1.5); esso presenta inoltre le sequenze NLS (*Nuclear Localization Signal*), importanti per la localizzazione nucleare. Le due sottofamiglie differiscono a livello dell'estremità C-terminale: le proteine Rel presentano un dominio C-terminale di trans-attivazione TAD (*Transcriptional activation domain*) non molto conservato, mentre i membri della sottofamiglia NF-κB sono caratterizzati dalla presenza di un lungo dominio C-

terminale di trans-repressione il quale contiene copie multiple di anchirina, in grado di mascherare le sequenze di localizzazione nucleare e quindi di inibire l'attività di queste proteine. Le proteine della sottofamiglia NF- $\kappa$ B sono sintetizzate come precursori (p100 e p105) che vanno incontro ad un processo proteolitico che genera le proteine NF- $\kappa$ B mature, note come p52 e p50. Il processamento di p100 e di p105 è mediato dal pathway ubiquitina-proteasoma e coinvolge la degradazione selettiva delle loro regioni C-terminali contenenti le ripetizioni di anchirina.



**Figura 1.5** - Rappresentazione schematica della struttura delle due sottofamiglie dei fattori di trascrizione NF- $\kappa$ B e delle proteine inibitorie I $\kappa$ B. Sia le proteine Rel che le proteine NF- $\kappa$ B presentano un dominio altamente conservato, noto come RHD. Tale dominio è importante nella dimerizzazione delle proteine, nel loro legame al DNA, per il legame degli inibitori I $\kappa$ B e presenta inoltre sequenze importanti per la localizzazione nucleare. Le due sottofamiglie differiscono a livello dell'estremità C-terminale: le proteine della sottofamiglia Rel presentano il dominio TAD (*Transcriptional activation domain*) mentre la sottofamiglia proteica NF- $\kappa$ B presenta domini inibitori formati da ripetizioni di anchirina, domini che possono essere rimossi da proteolisi (Gilmore, 2006).

Tutte le proteine appartenenti alla superfamiglia NF- $\kappa$ B sono in grado di formare omodimeri o eterodimeri (ad eccezione di RelB che è in grado di formare esclusivamente eterodimeri) in grado di legarsi a sequenze DNA *consensus* presenti nelle regioni regolatorie dei geni target, regolandone la loro espressione. Sebbene omodimeri p50 e p52 siano, in generale, repressori della trascrizione, essi possono partecipare alla transattivazione dei geni-target formando eterodimeri con RelA, RelB o c-Rel; dato che omodimeri p50 e p52 non sono trascrizionalmente attivi si ritiene che per attivare la trascrizione *in vivo* basti, in un dimero, almeno un dominio di trans-attivazione. In condizioni normali, i dimeri di NF- $\kappa$ B sono

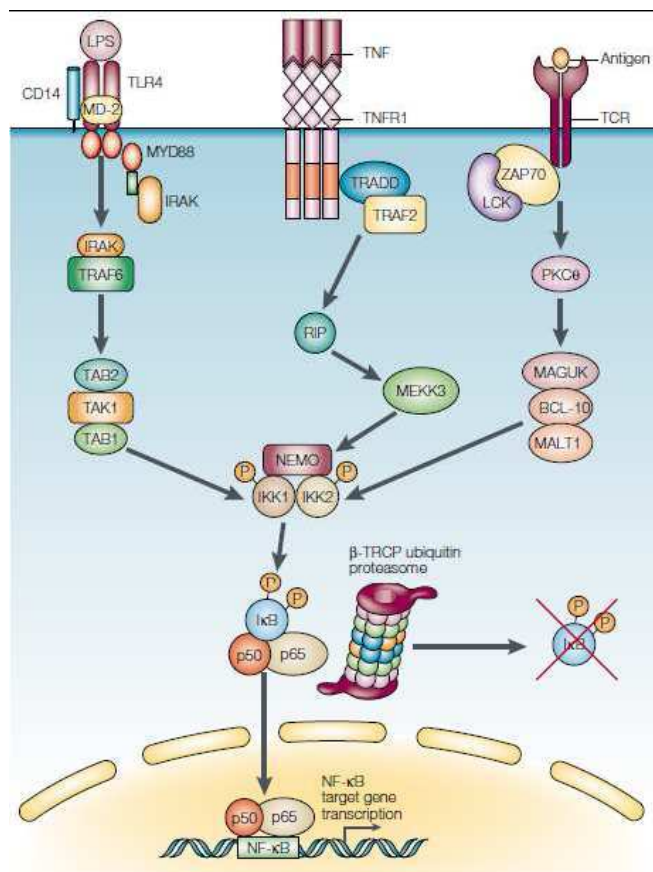
mantenuti nel citoplasma cellulare in uno stato inattivo da parte di una famiglia di proteine inibitorie, note complessivamente come IκBs (*Inhibitors of κB*). Tale famiglia di proteine inibitorie include IκBα, IκBβ, IκBε, le proteine precursori p100 e p105 ed i membri atipici Bcl-3, IκBζ e IκBNS (Hayden et al., 2008). Dal punto di vista strutturale le proteine IκBs sono caratterizzate dalla presenza di copie multiple di ripetizioni di anchirina, in grado di mascherare la sequenza di localizzazione nucleare (NLS) delle proteine NF-κB e pertanto mantenerle sequestrate in uno stato inattivo a livello del citoplasma (vedi figura 4) (Jacobs e Harrison, 1998; Gilmore, 2006). Le proteine IκBs contengono inoltre regioni in grado di interagire con aminoacidi coinvolti nel legame al DNA di NF-κB ed una sequenza PEST posta all'estremità C-terminale, coinvolta nella regolazione della degradazione delle IκBs stesse (Baldwin, 1996). Questa visione classica del meccanismo di inibizione da parte delle proteine IκB è stata recentemente messa in discussione da diversi studi i quali affermano che in realtà i complessi inattivi di NF-κB/IκBa si muovano continuamente a cavallo della membrana nucleare (Huxford et al., 1998; Birbach et al., 2002; Huang et al., 2000; Johnson et al., 1999); a supporto di queste teorie, esperimenti biochimici e strutturali hanno dimostrato che solo una delle due sequenze di localizzazione nucleare presenti nel dimero è mascherata da proteine inibitorie IκBa. Tramite la NLS libera il complesso può migrare quindi nel nucleo da cui però viene subito esportato in quanto la proteina IκBa presenta all'N-terminale una sequenza NES (*Nuclear Export Signal*). Poiché l'efficienza del processo di esporto è molto superiore rispetto al processo inverso, NF-κB si accumula nel citoplasma; la presenza del complesso inattivo nel nucleo è stata dimostrata sperimentalmente utilizzando leptomicina B come inibitore dell'esporto nucleare. Quanto detto per IκBa vale anche per IκBe. I vantaggi di questo processo, dispendioso da un punto di vista energetico, richiedono ulteriori approfondimenti. In contrasto con quanto appena detto, i complessi formati da NF-κB e la proteina inibitoria IκBb permangono costantemente nel citoplasma poiché quest'ultima è in grado di mascherare entrambe le NLS e non sarebbe in grado di mediare l'esporto

dal nucleo essendo carente della sequenza NES (Malek et al., 2001; Lee et al., 2002).

### Meccanismo di attivazione di NF- $\kappa$ B

Come detto in precedenza, in condizioni normali i dimeri di NF- $\kappa$ B sono presenti a livello del citoplasma in uno stato inattivo, complessati con le proteine inibitorie I $\kappa$ Bs. I dimeri NF- $\kappa$ B sono tuttavia in grado di attivarsi rapidamente in risposta ad una ampia varietà di stimoli biologici ed ambientali quali antigeni virali e batterici, radicali liberi, radiazioni ultraviolette e citochine pro-infiammatorie quali il *tumor necrosis factor* (TNF) e l'interleuchina-1 (IL-1) (Gilmore, 1999; Gilmore 2006). La stimolazione di una vasta gamma di recettori superficiali (quali TLR, TNFR e RANK) da parte di questi stimoli, potenzialmente dannosi, conduce alla attivazione della chinasi di I $\kappa$ B (anche nota come IKK), una proteina composta da tre subunità: le subunità catalitiche ad attività chinasica IKK-1 ed IKK-2 (note anche come IKKa ed IKKb, rispettivamente) e la subunità regolatoria NEMO (nota anche come IKKg) (Zandi et al., 1998; Yamaoka et al., 1998). La chinasi di I $\kappa$ B è in grado di

fosforilare due residui di serina localizzati sul dominio regolatorio degli I $\kappa$ Bs. Quando fosforilate a livello di queste due serine, le molecole inibitorie I $\kappa$ Bs vanno incontro ad ubiquitinazione e successiva degradazione a livello del proteasoma 26S (Chen et al., 1995). La proteina I $\kappa$ B degradata, non essendo più legata al complesso NF- $\kappa$ B, non è più in grado di mascherare la sequenza di localizzazione nucleare di





quest'ultima che può quindi traslocare nel nucleo, legarsi a specifiche sequenze responsive presenti sul DNA e stimolare l'espressione dei geni-*target*,

**Figura 1.6** - L'attivazione di NF- $\kappa$ B è stimolata dall'interazione di numerosi fattori quali LPS, il TNF e antigeni batterici con i loro rispettivi recettori. Il punto di convergenza di tutte queste vie di attivazione è rappresentata dalla fosforilazione degli inibitori I $\kappa$ Bs, a cui segue l'ubiquitinazione e la successiva degradazione a livello proteasomale. Questo comporta l'ingresso di NF- $\kappa$ B nel nucleo, il suo legame con le specifiche sequenze target a livello del DNA e la stimolazione della trascrizione genica.

che possiedono siti di legame per NF- $\kappa$ B (Figura 1.6). NF- $\kappa$ B regola la trascrizione di un grande numero di geni, tra questi si ricordano: geni codificanti per citochine, chemochine, peptici antimicrobici e proteine anti-apoptotiche. E' da ricordare che NF- $\kappa$ B è in grado anche di stimolare l'espressione genica dei geni codificanti per le sue proteine inibitorie I $\kappa$ Bs e degli enzimi deubiquitinanti A20 e Cyld (che regolano negativamente l'attivazione di IKK) (Wullaert et al., 2006; Nelson et al., 2004). In questo modo l'attivazione di NF- $\kappa$ B risulta essere strettamente controllata da una inibizione a *feedback* negativo. Studi più approfonditi hanno dimostrato che le diverse I $\kappa$ Bs mediano due tipi di attivazione differente: se I $\kappa$ B $\alpha$  regola attivazioni transienti di NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\beta$  è responsabile di attivazione durature della proteina suddetta (May et al., 1997). I $\kappa$ B $\alpha$  è infatti rapidamente degradata una volta fosforilata dalla chinasi IKK attiva ma è pure velocemente resintetizzata data la presenza di un elemento responsivo a NF- $\kappa$ B nel suo promotore. La proteina appena sintetizzata possiede una NLS e può quindi entrare nel nucleo dove spiazza NF- $\kappa$ B dal DNA e lo trasporta nuovamente nel citoplasma inibendone l'attività. I $\kappa$ B $\beta$ , al contrario, è meno sensibile alla degradazione indotta da stimoli infiammatori rispetto a I $\kappa$ B $\alpha$ . È stato quindi proposto che l'interazione selettiva tra  $\kappa$ B-Ras e I $\kappa$ B $\beta$  è di importanza fondamentale per inibire la degradazione di I $\kappa$ B $\beta$  durante l'attivazione di NF- $\kappa$ B (Fenwick et al., 2000). Come già detto in precedenza I $\kappa$ B $\beta$  non presenta una sequenza NES e non è inducibile da NF- $\kappa$ B. Poiché I $\kappa$ B $\beta$  neo-sintetizzata può interagire con NF- $\kappa$ B legato al DNA ma non è in grado di spiazzarlo, il risultato è una risposta più persistente.

### NF- $\kappa$ B ed il processo infiammatorio

L'attivazione della famiglia dei fattori di trascrizione NF- $\kappa$ B gioca un ruolo centrale nel processo infiammatorio grazie alla loro abilità di indurre la trascrizione di geni

codificanti per molecole pro-infiammatorie. Una volta attivato, infatti, NF-κB è in grado di legarsi a specifici elementi responsivi presenti sul DNA e di indurre l'espressione di proteine quali citochine (come TNF, IL-1, IL-2 e IL-6), chemochine (come RANTES, MCP-1, MIP-1, MIP-2 e IL-8), molecole di adesione cellulare (come ICAM, VCAM e le E-selectine) e l'espressione di enzimi quali le ciclossigenasi di tipo 2 (COX-2), le ossido nitrico sintasi inducibili (iNOS) e le metallo proteinasi di matrice (MMPs), tutti fattori che giocano un ruolo critico nel processo infiammatorio (Baeuerle e Baichwal, 1997; Pahl, 1999; Tak e Firestein, 2001). Diverse ricerche hanno messo in luce che una persistente attivazione di NF-κB è coinvolta nella patogenesi di numerose malattie infiammatorie, sia acute che croniche. Dato quindi il ruolo chiave di NF-κB nella risposta infiammatoria e nelle patologie ad essa correlate, sono state condotte numerose indagini volte a permettere una migliore comprensione del suo meccanismo d'azione al fine di identificare sostanze in grado di modularne l'attività che possano avere un importante sviluppo farmacologico. E' tuttavia da ricordare che, sebbene NF-κB sia un importante *target* terapeutico per la cura di patologie infiammatorie, esso è comunque necessario per la normale fisiologia cellulare per cui la totale inibizione di NF-κB potrebbe avere pesanti effetti collaterali quali la compromissione della normale difesa immunitaria; questo è dimostrato dal fatto che topi caratterizzati dall'assenza di NF-κB non sono in grado di sconfiggere infezioni opportunistiche (Lavon et al., 2000). NF-κB è difatti essenziale per una corretta risposta immunitaria nonché per la sopravvivenza e l'attivazione linfocitaria. Queste evidenze suggeriscono che il *signaling* di NF-κB ha importanti funzioni per il mantenimento della fisiologica omeostasi immunitaria; sembra perciò che NF-κB svolga due ruoli apparentemente contrastanti: da un lato l'aumentata e prolungata attivazione di NF-κB induce l'infiammazione ed il danneggiamento tissutale; dall'altro lato l'inibizione del *signaling* di NF-κB può disturbare l'omeostasi immunitaria portando allo sviluppo di infiammazione e patologie.

## Inibitori naturali di NF-kB

L'importanza di NF-kB nel processo infiammatorio lo rende un importante *target* farmacologico per la cura di numerose patologie. Recentemente sono stati identificati molteplici composti di origine naturale in grado di modulare l'azione di NF-kB e, quindi, il processo infiammatorio stesso. Tra questi si ricordano numerosi polifenoli (tra cui alcuni lignani, il resveratrolo, la curcumina, l'epigallocatechinagallato e la quercetina), sesquiterpeni (come il partenolide, il costunolide, il celatrolo ed il celafanolo A), di terpeni (come la excisanina e la cambecaurina) e triterpeni (come la acicina e la oleandrina) (Nam, 2006; Bremner e Heinrich, 2002). I polifenoli, in particolare, hanno ricevuto una notevole attenzione grazie alla loro capacità di modulare numerosi *pathway* correlati all'infiammazione; diverse evidenze sperimentali, infatti, sottolineano come tali composti possano agire sia a livello del *pathway* infiammatorio correlato all'acido arachidonico (attraverso la modulazione delle ciclossigenasi, delle lipossigenasi e delle fosfolipasi A2) che a livello del *pathway* infiammatorio non correlato all'acido arachidonico (attraverso la modulazione del fattore di trascrizione NF-kB, delle ossido nitrico sintasi inducibili e dei PPARs). L'importanza dei polifenoli come agenti anti-infiammatori è sottolineata dal fatto che ben 12 su 40 farmaci antinfiammatori approvati tra il 1983 ed il 1994 sono basati o derivati da questi composti naturali (Yoon e Baek, 2005). Tra le fonti naturali ricche in polifenoli si ricorda la *Camellia sinensis* L., particolare oggetto di studio di questa tesi. Nell'ambito del progetto europeo PlantLIBRA, è stata effettuata una ricerca sistematica della letteratura relativa all'attività anti-infiammatoria anche di altre piante, oltre alla *C. sinensis*, delle quali verrà in seguito testata l'attività biologica *in vitro*.

## 2. SCOPO DELLA TESI

Tra le attività del progetto europeo PlantLIBRA riveste particolare importanza la valutazione dell'effetto benefico derivante dall'assunzione di integratori alimentari a base erboristica. Ad oggi, tale valutazione è affidata all'EFSA, la quale, per le richieste di claims salutistici, richiede l'utilizzo di studi clinici randomizzati e controllati per stabilire la relazione causa-effetto tra assunzione di un componente alimentare (tra cui anche gli ingredienti vegetali impiegati in integratori alimentari) e l'effetto benefico/fisiologico sulla salute umana. Tuttavia, occorre sottolineare che esiste una difficoltà oggettiva nell'effettuare studi di intervento nell'uomo, sia in termini di costi che di complessità nella definizione dei parametri fisiologici. In aggiunta, per molte piante utilizzate come ingredienti di integratori alimentari non esistono studi nell'uomo in quanto i dati riguardanti il loro effetto benefico è basato sulla tradizione d'uso e non su studi scientifici *ad hoc*. Inoltre, dal punto di vista legislativo, esiste una forte discrepanza tra la i dati richiesti per l'immissione in commercio di un medicinale vegetale tradizionale (procedura semplificata, che non prevede l'esecuzione di studi clinici nell'uomo) e quelli richiesti per i claims salutistici (studi di intervento nell'uomo). Tale discrepanza ha portato la Comunità Europea a non prendere ancora alcuna decisione in merito alla valutazione dell'efficacia di prodotti a base vegetale (EU Food Commission, 2010). Il progetto PlantLIBRA, al fine di contribuire a colmare tale vuoto e supportare l'EFSA e le altre autorità regolatorie nelle decisioni riguardanti la valutazione del rischio-beneficio relativa all'uso di integratori alimentari a base vegetale, si propone di effettuare studi di intervento nell'uomo. In tal modo, attraverso la ricerca e la misura dei markers biologici di esposizione, sarà possibile valutare il potenziale benefico derivante dal consumo di integratori alimentari a base vegetale. Inoltre, la caratterizzazione fitochimica degli estratti utilizzati, basata su metodi validati, risulta essenziale nella valutazione del beneficio. A questo scopo, un primo screening sull'attività biologica di estratti/integratori vegetali è in fase di sviluppo

tramite metodologie *in vitro*. Tali metodi possono risultare utili, in vista di eventuali richieste di claims salutistici da parte delle aziende, anche come modelli alternativi agli studi nell'uomo dati gli elevati costi e la difficoltà nella definizione di parametri fisiologici *in vivo*. Nel progetto sono state identificate cinque aree di ricerca principali per la valutazione dei benefici: l'area cardiovascolare, apparato scheletrico, area relativa alle condizioni associate alla post-menopausa, sistema gastrointestinale e l'area infiammatoria, sulla quale si basa la presente ricerca. Lo scopo della prima parte del lavoro è stato quello di effettuare una revisione sistematica della letteratura riguardante gli studi epidemiologici e di intervento nell'uomo circa l'attività anti-infiammatoria di 10 piante identificate rilevanti in quest'area, scelte sulla base della lista di piante scelte nell'ambito del progetto. Tali piante sono:

- 1- *Vitis vinifera* L.
- 2- *Camellia sinensis* L.
- 3- *Matricaria recutita* L.
- 4- *Olea europea* L.
- 5- *Urtica dioica* L.
- 6- *Harpagophytum procumbens* L.
- 7- *Curcuma longa* L.
- 8- *Boswellia serrata* L.
- 9- *Symphytum officinalis* L.
- 10- *Calendula officinalis* L.

Lo scopo della seconda parte del lavoro, invece, è stato quello di valutare il profilo fitochimico di estratti acquosi di una delle piante risultate di maggiore interesse, la *Camellia sinensis* L. In particolare, è stato effettuato un primo screening per la valutazione del profilo dei polifenoli totali seguito dalla quantificazione tramite HPLC delle catechine, responsabili della maggior parte degli effetti benefici nell'uomo. Successivamente, è stata valutata l'attività anti-infiammatoria a livello gastrico degli estratti in colture cellulari di adenocarcinoma gastrico. L'attività biologica è stata successivamente paragonata all'attività antiossidante degli estratti.

Come già accennato, lo studio dell'attività biologica si pone come obiettivo quello di fornire un modello *in vitro* che possa mimare le condizioni fisiologiche *in vivo*, difficili da misurare e che richiedono elevati costi di esecuzione. Nell'ambito del progetto, la ricerca proseguirà su altre piante risultate di particolare interesse quali la *Vitis vinifera*, la *Matricaria recutita* e la *Calendula officinalis*.

### 3. MATERIALI

#### 3.1 Campioni

I campioni utilizzati per le analisi e mesi mancanti alla data di scadenza sono riportati in Tabella 3.1. Essi comprendono:

- 1 estratto acquoso commerciale di tè verde (GTE), fornito dalla Martin Bauer Group (Martin Bauer GmbH & Co, Vestenbergsgreuth, Germania);
- 3 campioni di tè verde di differente marchio commerciale (GTI-1, GTI-2, GTI-3);
- 2 campioni di tè verde decaffeinato (GTID-1, GTID-2) di differente marchio commerciale;
- 2 campioni tè nero (BTI-1, BTI-2) di differente marchio commerciale;
- 1 campione di tè nero decaffeinato (BTID-1).

Successivamente, da essi sono stati preparati gli estratti acquosi come descritto nel capitolo “Metodi”.

**Tabella 3.1** – Campioni analizzati e tempo alla scadenza (mesi)

Campione	Mesi alla scadenza
Estratto di tè verde commerciale (GTE)	-
Tè verde-1 (GTI-1)	8
Tè verde-2 (GTI-2)	23
Tè verde-3 (GTI-3)	24
Tè verde decaffeinato-1 (GTID-1)	14
Tè verde decaffeinato-2 (GTID-2)	13
Tè nero-1 (BTI-1)	23
Tè nero-2 (BTI-2)	23
Tè nero decaffeinato-1 (BTID-1)	14

### **3.2 Saggio di Folin-Ciocalteu per la determinazione dei polifenoli totali**

#### **Reagenti:**

- Acqua bidistillata
- Carbonato di sodio (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
- Reagente per il fenolo secondo Folin-Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Germany)

#### **Standard:**

- Acido gallico (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)

#### **Strumenti:**

- Spettrofotometro UV-VIS Cary 50 Scan, Varian (Palo Alto, CA, USA)

### **3.3 Analisi cromatografica**

#### **Solventi**

- Acqua bidistillata
- Acqua per HPLC (Romil Pure Chemistry, Cambridge)
- Acetonitrile per HPLC (VWR International, Geldenaaksebaan, Leuven, Belgium)
- Acido Formico (Merck, Darmstadt, Germany)
- Metanolo (Romil Pure Chemistry, Cambridge, UK)

#### **Standard purificati**

- Caffaina anidra (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germania), purezza > 95%
- (-) Epicatechina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germania), purezza > 90%
- (-) Epicatechina gallato (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germania), purezza > 98%



- (-) Epigallocatechina gallato (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germania), purezza > 95%

### **Apparecchiatura cromatografica**

- 2 pompe PU-1580 Jasco (Tokyo, Giappone) per HPLC
- Autocampionatore AS-2059 plus Jasco (Tokyo, Giappone)
- Colonna Kinetex 2,6  $\mu$  PFP, 100 A, 100 x 4,60 mm (Phenomenex)
- Integratore software Borwin Jasco (Tokyo, Giappone)
- Rilevatore 975-UV Jasco (Tokyo, Giappone) –  $\lambda = 280$  nm

## **3.4 Attività biologica**

### **Culture cellulari**

Per tutti gli esperimenti sono state utilizzate cellule di adenocarcinoma gastrico umano (AGS) provenienti dalla ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA). Tali cellule, pur presentando anomalie cromosomiche rispetto alle corrispondenti cellule gastriche non tumorali, rappresentano un buon modello di studio per l'infiammazione gastrica. Tutte le manipolazioni delle cellule in coltura sono state eseguite sotto cappa sterile a flusso laminare verticale, servendosi di materiale sterile usa e getta.

### **Terreni di coltura**

- DMEM-F12 completo: DMEM F-12 (Dulbecco-Modified Eagles Medium F-12, Gibco, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, USA) completato con 10% di siero bovino fetale (FBS, Gibco, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, USA) sottoposto ad inattivazione delle proteine del complemento e delle proteasi plasmatiche (trattamento termico a 56 °C per 30 minuti), 100 UI/mL di penicillina-streptomicina (Invitrogen S.r.l., Milano,

Italia) ed L-glutamina 2 mM (Invitrogen S.r.l., Milano, Italia). La composizione del terreno è schematizzata in Tabella 3.2.

**Tabella 3.2** - Composizione del terreno di coltura DMEM-F12 completo.

	<b>Concentrazione iniziale (stoccaggio)</b>	<b>Concentrazione finale nel terreno</b>	<b>Volume necessario</b>
FBS	100%	10%	56 mL
Penicillina- streptomicina	10000 UI/mL	100 UI/mL	5,6 mL
L-glutamina	200 mM	2 mM	5,6 mL

- DMEM-F12 incompleto: DMEM F-12 (Dulbecco-Modified Eagles Medium F-12, Gibco, Invitrogen Corporation) addizionato con 100 UI/mL di penicillina-streptomicina (Invitrogen S.r.l., Milano, Italia) ed L-glutamina 2 mM (Invitrogen S.r.l., Milano, Italia).

### **3.4.1 Saggi di citotossicità**

- MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma Aldrich, Steinheim, Germania)
- Trypan blue soluzione 0.4% ((Sigma Aldrich, Steinheim, Germania)

### **3.4.2 Saggio dell'NF-kB**

#### **Trasfezione cellulare**

- plasmide pNF-kB-luc (Dipartimento di Medicina Interna II, Ulm, Germania)
- HBS (Hepes-buffered saline) sterile 2X a pH 7.15 (NaCl 280 mM; HEPES 50 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 mM; pH 7.15)
- Partenolide (Sigma Aldrich, Stenheim, Germania)

- Acqua bidistillata sterile
- terreno DMEM-F12 completo
- piastra da 24 pozzetti (BD, NJ, USA)

### **3.4.3 Determinazione del potere antiossidante**

#### **Reagenti:**

- Acqua bidistillata
- Radicale 2,2-Difenil-1-picril-idrazile (DPPH•) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- Metanolo (Romil Pure Chemistry, Cambridge)

#### **Standard:**

- Acido gallico (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)

#### **Strumenti:**

- Spettrofotometro UV-VIS Cary 50 Scan, Varian (Palo Alto, CA, USA)

## 4. METODI

### I PARTE – REVISIONE SISTEMATICA DELLA LETTERATURA

Uno degli scopi principali del progetto europeo PlantLIBRA riguarda la valutazione dell'efficacia di ingredienti vegetali di integratori alimentari. Nell'ambito dell'area infiammatoria è stata effettuata una ricerca sistematica della letteratura al fine di valutare le evidenze scientifiche esistenti (in particolare studi epidemiologici e studi d'intervento nell'uomo) riguardanti l'attività biologica di dieci piante considerate rilevanti nell'area di interesse e utilizzate sia come ingredienti di integratori alimentari sia come estratti o alimenti. Tali piante sono: *Olea europea* L., *Camellia sinensis* L., *Vitis vinifera* L., *Matricaria recutita* L., *Boswellia serrata* L., *Curcuma longa* L., *Calendula officinalis* L., *Symphytum officinalis* L., *Harpagophytum procumbens* L., *Urtica dioica* L. Tale revisione sistematica della letteratura è in fase di pubblicazione (Dell'Agli et al., 2013 e Di Lorenzo et al., 2013, in press).

#### **Database e strategie di ricerca**

La ricerca in letteratura è stata effettuata utilizzando i database: Cochrane Library, Scifinder Scholar, Embase e Pubmed includendo gli studi effettuati dal 1970 al 2010. La ricerca è stata effettuata per titolo e abstract utilizzando i seguenti termini: nome latino o nome comune della pianta in combinazione con “inflamm\*”, “phlogosis” o “anti-inflammatory”, e altre parole chiave relative all'infiammazione (ad esempio “cyclooxygenase”, “cytokines”, “adhesion molecules”, etc.) . La ricerca è stata limitata agli studi nell'uomo e alla lingua inglese. Le bibliografie degli articoli sono state esaminate per verificare la presenza di eventuali ulteriori pubblicazioni non emerse dai database. Per gli studi epidemiologici sono stati utilizzati gli stessi termini sopra indicati in combinazione con “epidemiology/exp”, “epidemiolog\*”, “case control”, “cohort”.

## **Criteri di inclusione ed esclusione**

Sono stati inclusi nella revisione sistematica gli studi clinici controllati effettuati sia in soggetti sani che con patologie. La randomizzazione, anche se preferibile, non è stata considerata essenziale per l'inclusione degli studi. Altri criteri di inclusione sono stati: l'impiego, negli studi, di integratori alimentari (capsule, estratti, polveri, etc.) o alimenti a base delle piante oggetto di ricerca; studi basati sul trattamento combinato con altri integratori o composti biologicamente attivi. Le pubblicazioni riportanti analisi qualitative e quantitative incomplete di integratori alimentari sono state comunque incluse. I criteri di esclusione applicati sono: studi riguardanti alimenti fortificati con le piante oggetto di studio o singoli composti isolati dalla pianta; studi dove le piante considerati sono state impiegate per vie di somministrazione diverse da quella orale quali la via topica, aerosol/inalazione, cosmetici, prodotti per l'igiene (dentifrici, colluttori, etc.); review e pubblicazioni inerenti a brevetti; le pubblicazioni in forma di lettera all'editore sono state considerate solo nel caso in cui erano riportati nuovi dati. Anche la qualità scientifica degli articoli è stata uno dei criteri di inclusione o esclusione; inoltre, la qualità metodologica degli studi è stata valutata da due differenti persone (autori delle pubblicazioni finali) sulla base della qualità della presentazione dei risultati, la presenza di un'adeguata analisi statistica, descrizione del protocollo clinico. I medesimi criteri di inclusione/esclusione sono stati applicati per gli studi epidemiologici.

Per facilitare il lavoro di raccolta e valutazione degli studi è stato creato e implementato uno specifico database (MS Access) che ha permesso la selezione delle pubblicazioni raccolte seguendo i criteri d'inclusione ed esclusione già descritti. Il 10% delle pubblicazioni trovate in un primo processo di screening è stato controllato e valutato da un secondo revisore, così come il 5% di quelle incluse.

## **II PARTE – CARATTERIZZAZIONE FITOCHIMICA E VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' BIOLOGICA DEGLI ESTRATTI DI *Camellia sinensis* L.**

### **4.1 Preparazione dei campioni**

Per ciascun campione di tè verde e nero è stata scelta casualmente una bustina e sono stati pesati esattamente 1.5 g. Tale quantitativo è stato successivamente posto in infusione, per 3 minuti, in acqua bidistillata (200 mL) preriscaldata alla temperatura di 80°C. La soluzione è stata quindi raffreddata, filtrata con filtro 0.45 µm (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) e liofilizzata. Gli estratti ottenuti sono stati conservati, fino al momento delle analisi, alla temperatura di -20°C.

### **4.2 Saggio di Folin-Ciocalteu per la determinazione dei polifenoli totali**

#### **Preparazione del campione**

I campioni sono stati allestiti secondo quanto descritto nel paragrafo 4.1.

#### **Preparazione dei reagenti**

- Soluzione di carbonato di sodio al 7,5%: si pesano 7,5 g su bilancia analitica e si porta a volume con acqua deionizzata in un matraccio da 100 mL; successivamente si sonica per disciogliere completamente la polvere.
- Reattivo di Folin-Ciocalteu: si diluisce la soluzione del reagente 1:10.

#### **Preparazione dello standard**

Si pesano 50 mg di acido gallico (GA) e si sciolgono in 100 mL di acqua deionizzata; la soluzione risultante ha concentrazione pari a 500 µg/mL.

Si preparano successivamente diluizioni in acqua deionizzata per ottenere concentrazioni finali pari a 5, 10, 20, 25, 40 e 50 µg/mL.

Per ogni diluizione dello standard si esegue il test colorimetrico e, dopo aver valutato l'assorbanza a 765 nm, si costruisce la retta di calibrazione.

## **Reazione**

Il metodo per la determinazione dei polifenoli totali (TPC) si basa sull'ossidazione dei gruppi fenolici da parte del reattivo di Folin, costituito da una miscela di acidi fosfotungstico e fosfomolibdico.

Si esegue la reazione aggiungendo a 0,3 mL di campione, opportunamente diluito o tal quale, 1,5 mL di reattivo di Folin e 1,2 mL di soluzione di carbonato di sodio.

Per il bianco, invece, si utilizzano 0,3 mL di acqua bidistillata al posto del campione.

Si lascia proseguire la reazione, mantenendo al buio per 30 minuti; la colorazione finale varia tra il blu e l'azzurro (Figura 4.1).

Si effettua infine la lettura dei campioni, contro il bianco, allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 765 nm (Chan et al., 2007).



**Figura 4.1** – Colorazione assunta dai campioni dopo la reazione con reattivo di Folin-Ciocalteu e soluzione di carbonato di sodio

## **4.3 Analisi cromatografica**

### **4.3.1 Procedure di validazione del metodo in HPLC**

Il metodo di quantificazione in HPLC delle catechine è stato validato secondo le linee guida dell'FDA relative alla convalida dei metodi bioanalitici (FDA, 2001).

### **4.3.2 Separazione e idoneità del sistema HPLC**

I parametri utilizzati per convalidare l'idoneità del sistema sono: tempo di ritenzione ( $T_r$ ), fattore di ritenzione (K), fattore di separazione ( $\alpha$ ), fattore di simmetria e numero dei piatti teorici (N).

### **4.3.3 Limite di determinazione e quantificazione**

Il limite di determinazione (LOD) indica la sensibilità del metodo ed è misurato per mezzo di iniezioni di standard la cui concentrazione viene progressivamente diluita finché il picco osservato presenta un rapporto segnale-rumore di fondo di 3:1.

Il limite di quantificazione (LOQ) è la più bassa concentrazione che può essere determinata con accettabile accuratezza e precisione. La risposta dell'analita al LOQ dovrebbe essere almeno 10 volte rispetto al rumore di fondo. Il picco dell'analita (risposta) dovrebbe essere identificabile, distinto e riproducibile, con una precisione uguale o inferiore a 20% e un'accuratezza dell'80-120%.

### **4.3.4 Recupero**

Il recupero è la risposta del rivelatore, ottenuta da una quantità nota di analita aggiunta ed estratta dalla matrice, rispetto alla risposta del rivelatore ottenuta per la stessa concentrazione dello standard puro.

Il recupero rappresenta l'efficienza di estrazione di un metodo analitico entro i limiti di variabilità, e deve essere coerente, preciso e riproducibile. I test di recupero vengono eseguiti confrontando i risultati analitici di campioni a tre concentrazioni diverse (bassa, media e alta), eseguiti in triplicato, rispetto ai valori dello standard non estratto.

### **4.3.5 Linearità**

La linearità di un metodo analitico è la sua idoneità a fornire risultati direttamente proporzionali alle concentrazioni degli analiti nei campioni, all'interno di un



determinato campo di validità. Deve essere verificata con il calcolo del coefficiente di correlazione ( $R^2$ ) ottenuto dalla retta di calibrazione.

La retta di calibrazione (estrapolata) ottenuta dall'estrazione degli standard dalla matrice, è costituita da 5 punti, compreso un bianco ed un LOQ, nell'intervallo di applicabilità del metodo, in triplicato per ogni concentrazione. Ad un bianco viene aggiunto lo standard a concentrazione nota. Successivamente, la matrice è sottoposta al metodo di estrazione descritto nella sezione "Metodi", paragrafo "Preparazione dei campioni". Sono generalmente accettati coefficienti di correlazione uguali o superiore a 0.98 (Moreau e Siqueira, 2008).

Per la quantificazione degli analiti nei campioni, si utilizza il rapporto tra le concentrazioni dello standard dell'analita ricercato e la concentrazione dello standard interno (in ordinata) e il rapporto delle aree relative (in ascissa).

#### **4.3.6 Preparazione degli standard**

- Caffaina: si pesano 10 mg di caffeina standard e si sciolgono in 20 mL di metanolo; la soluzione risultante ha concentrazione pari a 500  $\mu\text{g/mL}$ .

Si preparano successivamente diluizioni in acqua deionizzata, per ottenere concentrazioni di 100, 50, 25, 12.5, 8, 4, 2  $\mu\text{g/mL}$ .

- (-) Epicatechina (EC): si pesano 10 mg di (-) epicatechina standard e si sciolgono in 20 mL di metanolo; la soluzione risultante ha concentrazione pari a 500  $\mu\text{g/mL}$ .

Si preparano successivamente diluizioni in acqua deionizzata per ottenere concentrazioni di 100, 85, 65, 45, 20, 12.5, 10, 7.5, 5, 2, 0.34, 0.26  $\mu\text{g/mL}$ .

- (-) Epigallocatechina-3-gallato (EGCG): si pesano 10 mg di (-) epigallocatechina gallato standard e si sciolgono in 20 mL di metanolo; la soluzione risultante ha concentrazione pari a 500  $\mu\text{g/mL}$ .

Si preparano successivamente diluizioni in acqua deionizzata per ottenere concentrazioni di 100, 85, 65, 45, 20, 12.5, 10, 7.5, 5, 2, 0.26, 0.24  $\mu\text{g/mL}$ .

- (-) Epicatechina gallato (ECG): Si pesano 5 mg di (-) epicatechina gallato standard e si sciolgono in 20 mL di metanolo; la soluzione risultante ha concentrazione pari a 250 µg/mL.

Si preparano successivamente diluizioni in acqua deionizzata per ottenere concentrazioni di 100, 85, 65, 45, 20, 12.5, 10, 7.5, 5, 2, 0.11, 0.09 µg/mL.

Essendo le catechine composti instabili, le soluzioni di standard sono state preparate giornalmente a partire dalla polvere.

#### **4.3.7 Analisi cromatografica**

L'analisi degli standard e dei campioni viene effettuata mediante HPLC (High Performance Liquid Chromatography). La cromatografia liquida in fase inversa è stata eseguita con eluizione in gradiente.

##### **Fasi:**

- Fase A: 99,5% Acqua – 0,5% Acido formico
- Fase B: 99,5% Acetonitrile - 0,5% Acido formico

##### **Gradiente di eluizione:**

Per consentire una migliore separazione cromatografica sono stati utilizzati due gradienti differenti, uno per i tè verdi (Gradiente 1 - Tabella 4.1) e uno per i tè neri (Gradiente 2 - Tabella 4.2).

I tè neri, infatti, contengono sostanze che interferiscono con le catechine; per questi campioni il gradiente è stato leggermente modificato per ottimizzare la separazione degli analiti.

**Tabella 4.1** – Gradiente 1 utilizzato per l'analisi in HPLC dei tè verdi

Tempo (minuti)	% Fase A	% Fase B
0	96	4
25	83	17
30	25	75
35	25	75
40	96	4

**Tabella 4.2** – Gradiente 2 utilizzato per l'analisi in HPLC dei tè neri

Tempo (minuti)	% Fase A	% Fase B
0	96	4
25	85	15
30	30	70
35	25	75
40	96	4

Flusso: 0,8 mL/min per i tè neri

Volume di iniezione: 20 µL (autocampionatore)

Tempo: 45 minuti

Temperatura: ambiente

Detector: UV

Lunghezza d'onda: 280 nm

La composizione delle fasi ci è stata suggerita dalla ditta produttrice della colonna, mentre le condizioni dell'analisi cromatografica sono state invece da noi messe a punto sperimentalmente.

#### **4.3.8 Valutazione della stabilità delle catechine nei campioni**

I campioni di tè sono stati conservati nelle confezioni originali, al buio, a temperatura ambiente. Due campioni di tè verde del medesimo marchio commerciale sono stati analizzati, secondo le procedure precedentemente descritte, al momento dell'apertura della confezione (T=0) e alla data di scadenza (T=E).

## **4.4 Attività biologica**

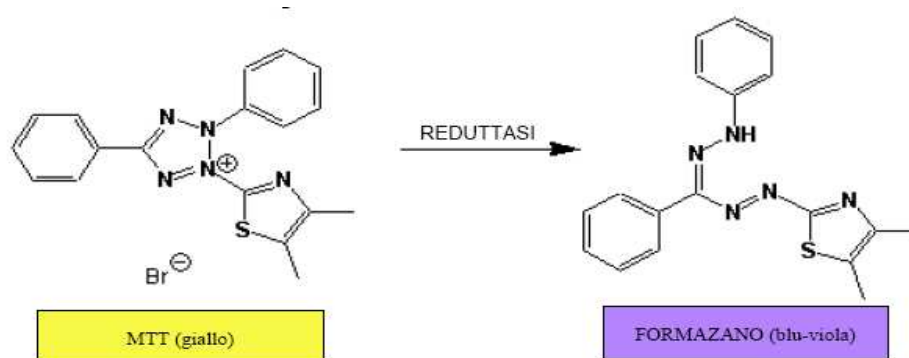
### **4.4.1 Colture cellulari**

Le cellule di adenocarcinoma gastrico umano (AGS), cresciute a confluenza in fiasca, vengono sottoposte a procedura di subcoltivazione che prevede la completa rimozione del medium di coltura e l'aggiunta di 3 mL di una soluzione di tripsina 0.105 mM contenente lo 0.25% di EDTA (Sigma-Aldrich S.p.a., Milano, Italia); le cellule vengono quindi riposte in incubatore per 5-10 minuti al fine di facilitare l'attività enzimatica ed il distacco cellulare. L'enzima è inattivato tramite l'aggiunta di 5 mL di terreno DMEM-F12 completo. Le cellule vengono quindi contate al microscopio ottico per mezzo di una camera di Burker e poste in coltura in fiasche da 75 cm<sup>2</sup> (Falcon, San Jose, CA, USA) alla densità di  $1.5 \times 10^6$  cellule/fiasca in un volume totale pari a 15 mL di terreno di coltura DMEM F-12 completo. Le cellule vengono incubate per 2-3 giorni a 37 °C in atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub> senza mai cambiare loro il terreno. Quindi si procede ad una ulteriore subcoltivazione.

### **4.4.2 Saggi di citotossicità**

#### Test dell'MTT (Methyl Thiazolyl Tetrazolium)

Per valutare la citotossicità esercitata dagli estratti totali dei frutti di bosco sulla linea cellulare AGS è stato effettuato il saggio dell'MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)), un test colorimetrico che permette di quantificare la vitalità cellulare attraverso la misurazione dell'attività della succinico deidrogenasi, un enzima presente a livello mitocondriale. Questo enzima è attivo esclusivamente nelle cellule vitali e può essere facilmente utilizzato come "marker" della funzionalità mitocondriale e della vitalità cellulare dal momento che è in grado di convertire l'MTT, un composto azoico di colore giallo, a formazano, una sale di colore blu-viola, attraverso la rottura dell'anello tetrazolio. La quantità di formazano, determinata spettrofotometricamente, è proporzionale alla presenza dell'enzima in coltura e, quindi, indirettamente, al numero delle cellule vitali.



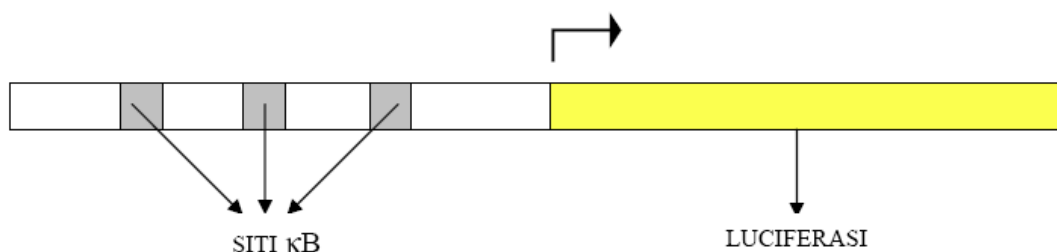
Le cellule AGS durante la fase logaritmica della loro crescita sono state tripsinizzate e piastrate in una piastra da 24 pozzetti alla concentrazione di  $15 \times 10^3$  cellule/pozzetto. Le cellule sono state mantenute in coltura per 36 ore, quindi sono state trattate con gli estratti in concentrazioni comprese nell'intervallo 0.1-25  $\mu\text{g/mL}$  per 6 ore. Trascorso tale tempo si è proceduto alla valutazione della morfologia cellulare attraverso microscopia ottica ed alla valutazione della citotossicità attraverso il test dell'MTT: a ciascun pozzetto della piastra è stato accuratamente rimosso il terreno di coltura ed aggiunti 200  $\mu\text{L}$  di soluzione di MTT (0.1  $\text{mg/mL}$ ). Le cellule sono state quindi riposte in incubatore a 37 °C per 60 minuti. Al termine del periodo di incubazione si è proceduto alla rimozione della soluzione di MTT, quindi sono stati aggiunti 200  $\mu\text{L}$  di soluzione estraente (90% isopropanolo; 10% DMSO). A seguito della completa ed omogenea solubilizzazione dei sali di formazano sono stati trasferiti 100  $\mu\text{L}$  del contenuto di ciascun pozzetto della piastra da 24 in altrettanti pozzetti di una piastra trasparente da 96, adatta allo spettrofotometro. Si è quindi proceduto alla misurazione dell'assorbanza di ciascun pozzetto alla lunghezza d'onda  $\lambda$  di 550 nm. Il valore di assorbanza è proporzionale alla vitalità cellulare.

## Test del Trypan Blue

Il test del Trypan Blue è un test che permette di misurare la vitalità cellulare attraverso l'utilizzo di un colorante (Trypan Blue, Sigma-Aldrich S.p.a., Milano, Italia) in grado di colorare selettivamente le cellule morte (sia cellule necrotiche che apoptotiche). Brevemente: le cellule AGS durante la fase logaritmica della loro crescita sono state piastrate in una piastra da 24 pozzetti alla concentrazione di  $15 \times 10^3$  cellule/pozzetto. Le cellule sono state mantenute in coltura per 48 ore, quindi sono state trattate con i composti di interesse a varie concentrazioni per 6 ore. Trascorso tale tempo si è proceduto al distacco cellulare per mezzo di 500 mL di soluzione di tripsina (Sigma-Aldrich S.p.a., Milano, Italia); la tripsina è stata successivamente inattivata con 500 mL di terreno DMEM-F12 completo e si è quindi proceduto al conteggio delle cellule al microscopio ottico per mezzo della camera di Burker. Per la conta cellulare abbiamo prelevato 20 mL di sospensione cellulare ed aggiunto 180 mL di Trypan blue. Le cellule che si coloravano di scuro sono state considerate morte.

### **4.4.3 Trasfezioni cellulari**

Le cellule di adenocarcinoma gastrico (AGS) sono state sottoposte a procedura di trasfezione transiente con il plasmide pNF-kB-luc attraverso la metodica del calcio fosfato, tecnica che sfrutta la formazione di un co-precipitato di calcio fosfato/DNA al fine di facilitare l'introduzione del DNA esogeno di interesse nelle cellule. Il plasmide pNF-kBluc è caratterizzato dalla presenza del gene reporter della luciferasi sotto il controllo di un promotore (quello della molecola di adesione E-selectina) contenente 3 siti di legame per NF-kB: in questo modo l'espressione della luciferasi risulterà strettamente associata all'attività di NF-kB stesso.



Per ogni piastra da 24 pozzetti si è proceduto alla preparazione di una miscela, realizzata sotto agitazione, costituita da 650 mL di HBS (Hepes-buffered saline) sterile 2X a pH 7.15 (NaCl 280 mM; HEPES 50 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 mM; pH 7.15) e 650 mL di una soluzione costituita da 85 mL di CaCl<sub>2</sub> (250 mM finale), 50 ng di plasmide/pozzetto ed H<sub>2</sub>O sterile per portare a volume. 50 mL di miscela sono stati aggiunti a ciascun pozzetto della multiwell da 24 almeno un ora dopo aver cambiato il terreno di coltura (terreno DMEMF12 completo). Le cellule sono quindi state riposte in incubatore per 15 ore, prima di essere trattate.

#### **4.4.4 Preparazione delle cellule per i saggi**

Le cellule di adenocarcinoma gastrico umano (AGS) vengono sottoposte a procedura di tripsinizzazione, contate al microscopio ottico per mezzo di una camera di Burker e:

- Per i saggi di trascrizione mediata da NF-κB e di secrezione dell'IL-8: piastrate in multiwell da 24 pozzetti (Falcon, San Jose, CA, USA) alla densità di  $1.5 \times 10^4$  cellule/pozzetto in un volume totale pari a 500 mL di terreno di coltura DMEM F- 12 completo per ciascun pozzetto.
- Per i saggi di traslocazione di NF-κB: piastrate in Petri da 100 mm (Falcon, San Jose, CA, USA) alla densità di  $3.0 \times 10^6$  cellule/petri in un volume totale pari a 10 mL di terreno di coltura DMEM F-12 completo.

Le cellule vengono quindi mantenute per 2-3 giorni a 37 °C in atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub> senza mai cambiare loro il terreno. Quindi si procede al trattamento o alla trasfezione seguita dal trattamento (per il saggio di trascrizione mediata da NF-κB). I trattamenti sono stati effettuati aggiungendo al terreno DMEM-F12 gli estratti di interesse alle concentrazioni comprese nell'intervallo 1 - 25 µg/mL. Come veicolo è stato utilizzato DMSO alla concentrazione finale dello 0.1%; come controllo positivo è stato utilizzato il partenolide (10 µM).





6, 24 e 30 ore, utilizzando varie citochine (il TNF, l'IL-1b, l'IL-6, l'IL-21 e l'IL-8) alla concentrazione di 10 ng/mL, concentrazione che si ritiene raggiungibile nel distretto gastrico durante il processo infiammatorio. La trascrizione mediata da NF-kB è stata valutata quantificando, tramite luminometro, l'attività luciferasica in cellule AGS precedentemente sottoposte ad una procedura di trasfezione transiente, come descritto nel paragrafo 4.3.3.

#### **4.4.7 Valutazione dell'attività antiossidante**

##### Preparazione del campione

I campioni sono stati allestiti secondo quanto descritto nel paragrafo 4.1.

##### Preparazione dei reagenti

Si pesano 0,005 g di DPPH•, che si presenta come una polvere violacea, su bilancia analitica e portare a volume con metanolo in matraccio da 100 mL; successivamente si sonica per disciogliere completamente la polvere. Si ottiene così una soluzione con concentrazione pari a 50 µg/mL.

Il valore di assorbanza letto allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 517 nm deve essere compreso tra 0,9 e 1.

##### Preparazione dello standard

Si pesano 50 mg di acido gallico e si sciolgono in 100 mL di acqua deionizzata; la soluzione risultante ha concentrazione pari a 500 µg/mL.

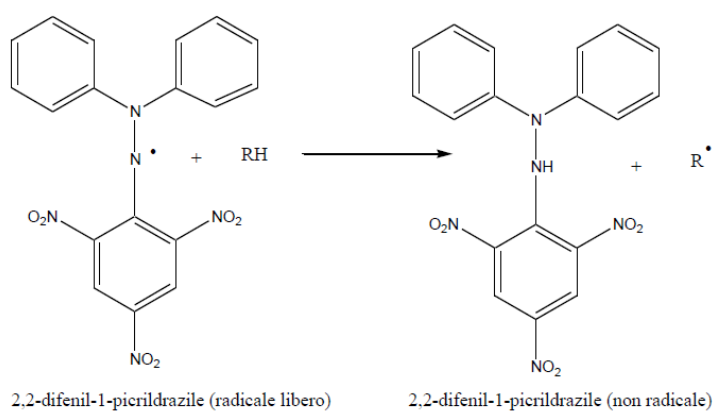
Si preparano successivamente diluizioni in acqua deionizzata per ottenere concentrazioni di 1, 2,5, 3,5 e 5 µg/mL.

Per ogni diluizione dello standard si esegue il test colorimetrico e, dopo aver valutato l'assorbanza a 517 nm, si costruisce la retta di calibrazione.

## Reazione

Questa metodica prevede l'utilizzo del DPPH•, un catione radicalico cromoforo stabile, e la successiva valutazione della capacità dell'antiossidante in base alla diminuzione di assorbanza che si osserva in seguito alla cattura del radicale; la reazione che si verifica è la donazione di un idrogeno dall'antiossidante (RH) al DPPH (Figura 4.2).

Il radicale presenta un massimo di assorbimento a 517 nm.



**Figura 4.2** – Reazione di donazione di un idrogeno al DPPH

Si esegue la reazione aggiungendo 1 mL di soluzione metanolica di DPPH• a 0,5 mL di campione, opportunamente diluito o tal quale.

Per il bianco, si utilizzano 0,5 mL di acqua al posto del campione.

Si lascia proseguire la reazione, mantenendo al buio per 30 minuti; la colorazione finale varia tra il rosa e il giallo (Figura 4.3).

Si effettua infine la lettura dei campioni, rispetto al bianco, utilizzando lo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 517 nm (Graham, 1992).



**Figura 4.3** – Colorazione assunta dai campioni dopo la reazione con la soluzione metabolica di DPPH

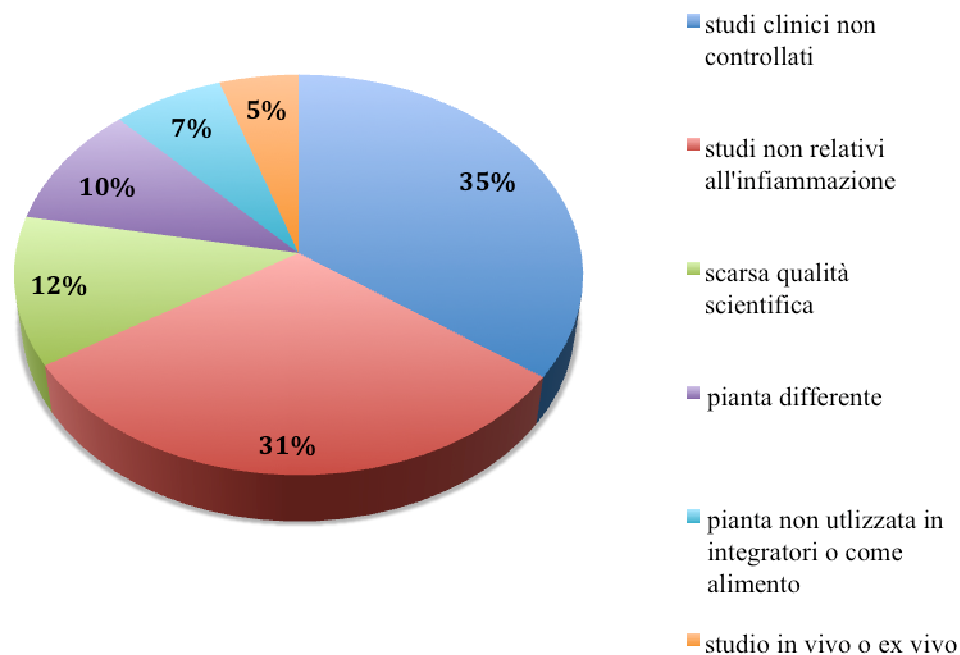
## 5. RISULTATI E DISCUSSIONE

### I PARTE – REVISIONE SISTEMATICA DELLA LETTERATURA

#### 5.1 Risultati generali

Dalla ricerca sistematica della letteratura, condotta secondo le modalità descritte nel capitolo “Metodi”, sono state inizialmente raccolte 1830 pubblicazioni. Applicando i criteri di inclusione/esclusione descritti precedentemente, sono stati selezionati 138 articoli; di questi, 69 sono risultati elegibili per l’inclusione nella revisione sistematica. Delle 138 pubblicazioni selezionate inizialmente il 35% è stato escluso poichè gli studi clinici non erano controllati; nel 31% dei casi lo studio non era relativo all’area infiammatoria; il 12% per la scarsa qualità scientifica dello studio; il 10% in quanto inerente a piante non incluse nelle 10 scelte; il 7% perché la pianta di interesse non era utilizzata come integratore o alimento; il 5% perché lo studio era effettuato *in vitro* o *ex vivo* (Figura 5.1). Nelle Tabelle 5.1-5.13 sono riportati gli studi nell’uomo relativi alle 10 piante oggetto della revisione sistematica. Per ciascuna pianta, gli studi sono stati suddivisi in due colonne: beneficio/non beneficio, a seconda del risultato dello studio. La variazione dei biomarkers infiammatori o degli “hard end-points”, definiti come riduzione dei sintomi o miglioramento di uno stato fisiologico (ad es. riduzione dell’indice di ulcera nella gastrite), è stata utilizzata come criterio per la suddivisione degli studi nelle colonne “beneficio” o “non beneficio” (Dell’Agli et al., in press). Non è stato possibile includere alcuno studio relativo alla *Calendula officinalis* L. e al *Symphytum officinalis* L.; infatti, la calendula è utilizzata soprattutto per via topica nella riduzione degli stati infiammatori della cute. Qualche prodotto per via orale è ora disponibile in commercio, soprattutto in associazione con altri ingredienti vegetali, ma ad oggi, non sono ancora stati effettuati studi nell’uomo per la valutazione degli effetti benefici. Il *Symphytum officinalis* L. non è generalmente utilizzato per via orale a causa della presenza di alcaloidi pirrolizidinici. In Germania, il suo utilizzo è limitato all’uso esterno (Stickel and Seits, 2000), e il dosaggio giornaliero è limitato ad un massimo di 100

µg. E' stato però osservato che una parte di alcaloidi, compresa tra 0.1 e 0.4 % è comunque assorbita attraverso la cute ed è determinabile nelle urine (Lin et al., 2010).



**Figura 5.1** – Distribuzione percentuale delle pubblicazioni escluse dalla revisione sistematica in base alle motivazioni

## 5.2 *Vitis vinifera* L.

In Tabella 5.1 sono riportati i risultati relativi alle pubblicazioni selezionate e considerate accettabili per la *Vitis vinifera* L. Gli studi riportanti l'attività biologica del vino rosso sono stati esclusi poiché è un integratore alimentare; inoltre, la presenza dell'alcol può rappresentare un fattore confondente. In totale, sono state selezionate ed incluse tredici pubblicazioni: di queste, quattro descrivono l'effetto ottenuto tramite l'utilizzo di uva (Gupta et al., 2008; Zern et al., 2005; Rankin et al., 2008; Puglisi et al., 2008), tre di succo d'uva (Albers et al., 2004; Castilla et al., 2006; Castilla et al., 2008) tre di semi d'uva (Sano et al., 2007; Kar et al., 2006;

Kalfin et al., 2002), due di bucce d'uva (Myers et al., 2010; Young et al., 2000) e uno di foglie di vite (Abidov et al., 2006). Negli studi è stato valutato l'effetto benefico su circa venti biomarkers infiammatori tra cui molecole di adesione, citochine, proteina C reattiva (CRP), ossido nitrico (NO), molecole derivanti dal trombossano (TXB), e biomarkers di stress ossidativo quali la malondialdeide (MDA). I soggetti che hanno riportato una riduzione significativa di tali biomarkers sono stati 608 contro 84 per i quali, invece, non è stato rilevato alcun miglioramento.

Per quanto riguarda gli hard end-points, tutti i soggetti hanno riportato il miglioramento dello stato fisiologico generale. In particolare, nello studio condotto da Albers et al. (2004) è stata evidenziata una riduzione dei parametri infiammatori piastrinici (CD 40L) pur non riducendo direttamente l'attivazione piastrinica. Inoltre, lo studio condotto da Rankin et al. (2008) ha evidenziato una discreta riduzione dello stress ossidativo generale in soggetti in sovrappeso, ma non una riduzione dei parametri infiammatori. Tuttavia, nella maggior parte degli studi il numero dei soggetti è piuttosto limitato e i trattamenti tra loro eterogenei, poiché basati su prodotti con differenti composizioni (es. frutto intero, succo, semi o bucce d'uva). Inoltre, sebbene i dati disponibili siano promettenti, non sono ancora disponibili studi epidemiologici che possano supportare gli effetti benefici relativi a questa pianta.

Nei paragrafi seguenti sono riportati i risultati relativi ai principali biomarkers infiammatori valutati.

### **5.2.1 Proteina C reattiva (CRP)**

La Proteina C reattiva (CRP) è una delle principale molecole pro-infiammatorie. E'una proteina pentamerica del peso molecolare di 115000-140000 D, sintetizzata dal fegato in seguito a stimolo di mediatori dell'infiammazione quali le citochine ed in particolare l'IL-6. La CRP ha assunto negli anni un'importanza crescente nella valutazione dei processi infiammatori. I motivi sono da ricercare nel rapido aumento nel tempo dei livelli di tale proteina rispetto agli altri marcatori di flogosi,

tanto che essa è attualmente l'indicatore più utilizzato negli stati infiammatori. In particolare, pur essendo un parametro infiammatorio aspecifico, la CRP è utilizzata come marker predittivo nella valutazione del rischio cardiovascolare in patologie croniche come il diabete.

Gli studi inclusi nella revisione sistematica della letteratura riportano la valutazione dei livelli di CRP in sei studi (Tabella 5.1). Nello studio randomizzato e controllato in cross-over condotto da Albers et al. (2004) è stato valutato l'effetto del consumo di succo d'uva rossa per due settimane, rispetto al placebo, su differenti parametri infiammatori in 20 soggetti affetti da patologie cardiovascolari, già in terapia anticoagulante. Per quanto riguarda i livelli di CRP, in seguito al trattamento non sono state evidenziate differenze significative:  $2.12 \pm 0.227 \mu\text{g/mL}$  del gruppo trattato rispetto ai  $2.11 \pm 0.228 \mu\text{g/mL}$  del gruppo placebo ( $P=0.982$ ). Risultati analoghi sono stati nello studio condotto da Rankin et al. (2008), nel quale sono stati misurati i livelli di CRP in 17 soggetti obesi in seguito ad assunzione di 90 g di uva passa al giorno per due settimane rispetto al placebo (2.18 mg/L prima del trattamento e 2.24 mg/L dopo il trattamento). Anche nello studio di Castilla et al. (2008), nel quale è stato valutato l'effetto del consumo di succo d'uva sia sui differenti parametri infiammatori sia in soggetti sani che affetti da insufficienza renale, i livelli di CRP non sono risultati significativamente diversi prima e dopo il trattamento (in media  $5.28 \text{ mg/L} \pm 1.54$  all'inizio dello studio e  $6.52 \pm 1.95 \text{ mg/mL}$  dopo 3 settimane). Al contrario, negli studi di Kar et al., (2006) e di Zern et al., (2005), la CRP plasmatica nei soggetti valutati tende a diminuire in seguito ad assunzione di estratti d'uva. In particolare, nello studio di Zern et al., (2005) i valori di CRP in pazienti diabetici con elevato rischio cardiovascolare sono risultati di  $3.2 \pm 3.65 \text{ mg/L}$  prima del trattamento rispetto ai  $2.0 \pm 2.2 \text{ mg/L}$  ( $P = 0.0006$ ) dopo il consumo per quattro settimane di 600 mg/die di estratto di semi d'uva.

### **5.2.2 Malondialdeide (MDA)**

La malondialdeide (MDA) è uno dei più importanti biomarkers indicativi di perossidazione lipidica. Inoltre, gioca un'importante ruolo nei processi infiammatori regolando l'attivazione delle citochine. La valutazione dei livelli plasmatici di MDA è quindi importante per la valutazione del grado di ossidazione lipidica delle lipoproteine e, di conseguenza, del rischio cardiovascolare.

Nello studio di Sano et al. (2007) è stato valutato l'effetto, rispetto al placebo, del consumo di un integratore alimentare a base di estratto di semi d'uva (200 o 400 mg/die) per 12 settimane in 61 soggetti sani. Dopo 12 settimane, nel gruppo che aveva assunto 400 mg/die di estratto è stata evidenziata una riduzione significativa dei livelli di MDA rispetto al gruppo che aveva invece assunto 200 mg o al placebo ( $P = 0.009$ ). Simili risultati sono stati ottenuti da Kalfin et al. (2002), nel quale i livelli di MDA sono stati misurati in pazienti affetti da sclerosi sistemica. Il trattamento consisteva nell'assunzione (100 mg/die per un mese) di un integratore alimentare (Activin) a base di un estratto idroalcolico standardizzato di semi d'uva rossa californiana, particolarmente ricco di proantocianidine oligomeriche. Al contrario, Young et al. (2000) non hanno rilevato alcuna riduzione significativa dei livelli di MDA plasmatica, rispetto a placebo, in soggetti sani dopo il consumo, per una settimana, di un integratore alimentare a base di estratto acquoso di bucce d'uva rossa (600 mg/die, corrispondente a 31.3 mg di polifenoli totali). Secondo gli autori, ciò potrebbe essere dovuto in parte al processo di lavorazione delle bucce d'uva che può aver ridotto il contenuto fenolico dell'estratto finale.

### **5.2.3 Interleuchina-6 (IL-6)**

L'interleuchina 6 (IL-6) è prodotta principalmente nel sito infiammatorio da parte di monociti e macrofagi svolgendo un duplice ruolo sia nella fase infiammatoria acuta che cronica. In fase acuta, l'IL-6 induce l'espressione di IL-8, MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein) e di molecole di adesione nelle cellule



endoteliali; nella fase di infiammazione cronica, invece, promuove l'angiogenesi e inibisce i processi apoptotici. Nello studio condotto da Rankin et al. (2008), nel quale è stato misurato l'effetto del consumo di uva passa su numerosi biomarkers infiammatori in 17 soggetti in sovrappeso (Body Mass Index > 26). Per quanto riguarda l'IL-6, è stata evidenziata una riduzione dei livelli di tale proteina di circa l'11% in seguito al trattamento, ma tale riduzione non è risultata significativamente diversa rispetto a quella osservata nel gruppo placebo. Tale risultato può essere dovuto in gran parte, secondo gli autori, al quantitativo di uva utilizzato nello studio (90 g/die, corrispondente a circa 68-94.5 mg di polifenoli), che risulta essere più basso rispetto a quello utilizzato in altri studi (208-600 mg/die di polifenoli totali). Nello studio di Zern et al., (2005) nel quale è stata valutata la riduzione di markers infiammatori associati allo stress ossidativo in donne in pre e post-menopausa, i valori di IL-6 sono risultati ridotti dal consumo di 36 g/settimana di estratto d'uva (per 4 settimane) solo nelle donne in pre-menopausa ( $3.14 \pm 4.30$  pg/L vs  $2.71 \pm 4.10$  pg/L). Ciò è stato attribuito al probabile ridotto contenuto in flavonoidi del succo d'uva, e ai ridotti livelli plasmatici di IL-6 presenti nei soggetti all'inizio dello studio.

#### **5.2.4 Interleuchina-8 (IL-8)**

L'IL-8 rappresenta una delle principali chemiochine prodotte da monociti e macrofagi allo scopo di reclutare monociti e neutrofili, che costituiscono le cellule principali coinvolte nell'infiammazione acuta. Una delle caratteristiche più importanti di questa proteina, che la differenzia dalla CRP, è la sua emivita particolarmente lunga nel sito di infiammatorio (fino ad alcune settimane). L'IL-8 è prodotta in elevate quantità durante i processi infiammatori che accompagnano gli eventi cardiovascolari (es. ischemia) e il gene che la codifica è particolarmente sensibile all'azione degli antiossidanti, i quali sono in grado di ridurre l'espressione (Apostolakis et al., 2009). Per tale motivo, numerose molecole naturali, tra cui i flavonoidi, sono state studiate per valutarne la capacità nella riduzione della produzione di IL-8 in patologie cardiovascolari (Apostolakis et al.,

2009). Nello studio condotto da Albers et al. (2004) non sono state evidenziate differenze significative tra il gruppo che aveva assunto succo d'uva ( $148.50 \pm 12.6$  pg/mL) rispetto al placebo ( $159.90 \pm 13.6$  pg/mL) ( $P=0.403$ ).

### **5.2.5 CD-40L**

Il ligando CD-40 (CD-40L) e il suo recettore CD-40 rappresentano le principali molecole stimolatorie del Tumor Necrosis Factor (TNF). Il CD-40L è espresso principalmente su macrofagi, cellule muscolari lisce, endoteliali e piastrine, mediando il processo della coagulazione (Lievens et al., 2010).

Nello studio di Albers et al. (2004) i livelli di CD-40L sono stati significativamente ridotti dal consumo di succo d'uva rossa rispetto al placebo ( $3.70 \pm 0.78$  ng/mL vs  $6.00 \pm 0.58$  ng/mL;  $P=0.03$ ), indicando un'importante riduzione dell'attivazione piastrinica. Numerose evidenze hanno stabilito il ruolo centrale dell'interazione tra CD-40L ed il suo recettore CD40 nelle risposte del sistema immunitario e nell'infiammazione e, più recentemente, è emerso l'importante contributo di tale interazione sulle cellule vascolari e piastriniche nella patogenesi di patologie aterosclerotiche, trombotiche e infiammatorie (Albers et al., 2004). Il succo d'uva, quindi, soprattutto grazie al suo contenuto di flavonoidi, sembrerebbe attenuare l'espressione del CD-40L.

### **5.2.6 Tumor Necrosis Factor alfa (TNF- $\alpha$ )**

Il TNF- $\alpha$  è una glicoproteina prodotta dai macrofagi e linfociti T attivati in risposta a differenti stimoli tra cui quello associato allo stress ossidativo. Essa ha un ruolo centrale nella risposta infiammatoria. Interagisce con due differenti recettori (TNFR1 e TNFR2), espressi diversamente in cellule e tessuti, l'attivazione dei quali porta ad una vasta gamma di risposte biologiche. Tra queste, la produzione di citochine pro-infiammatorie da parte delle cellule endoteliali vascolari che aumentano i processi di adesione leucocitari e l'incremento dell'aggregazione piastrinica (Golias et al., 2007).

Nello studio di Zern et al. (2005) è stato valutato l'effetto del consumo di un integratore alimentare a base di estratto d'uva su diversi biomarkers infiammatori in donne in pre- e post-menopausa, rispetto al placebo. Dopo quattro settimane di intervento, i livelli di TNF- $\alpha$  sono stati significativamente ridotti nel gruppo trattato rispetto al placebo, indicando una riduzione dello stress ossidativo associato alla perossidazione lipidica. Simili risultati sono stati ottenuti nello studio di Puglisi et al. (2008), nel quale è stato valutato l'effetto del consumo di uva passa (1 coppa/die per sei settimane) sui livelli plasmatici di alcuni biomarkers infiammatori in donne in post-menopausa. L'infiammazione e la perossidazione dei lipidi plasmatici, infatti, sono strettamente correlati allo sviluppo di patologie cardiovascolari (Puglisi et al., 2008). Le partecipanti allo studio sono state suddivise in tre gruppi a seconda del tipo di intervento alle quali erano state assegnate: un gruppo doveva consumare esclusivamente uva passa (gruppo "Raisin"), il secondo associare il consumo di uva all'attività fisica (gruppo "Raisin + walk", il terzo doveva esclusivamente praticare attività fisica (gruppo "walk"). Al termine dello studio, nel gruppo "Raisin" è stata evidenziata una riduzione dei livelli plasmatici di TNF- $\alpha$  (da 3.5 ng/L a 2.1 ng/L,  $P < 0.025$ ), mentre non ha subito significative variazioni negli altri due gruppi.

### **5.2.7 E-selectina**

La E-selectina è una proteina espressa dalle cellule endoteliali in seguito ad attivazione da parte delle citochine durante i processi infiammatori e ossidativi. Essa media l'adesione all'endotelio vascolare dei neutrofili e monociti. Inoltre, è presente in elevate quantità nei processi infiammatori che accompagnano le patologie artritiche ed osteoarticolari e nella reazioni di ipersensibilità (Golias et al., 2006).

Nello studio di Kalfin et al. (2002) (descritto precedentemente) il consumo per quattro settimane di Activin (integratore alimentare a base di estratto di semi d'uva rossa), ha determinato, rispetto al placebo, una significativa riduzione dei livelli di E-selectina ( $P < 0.01$ ).

### **5.2.8 P-selectina**

La P-selectina è una proteina generalmente immagazzinata in granuli (denominati corpi di Weibel-Palade) presenti nelle cellule endoteliali e nelle piastrine da cui viene rapidamente rilasciata e trasportata sulla superficie cellulare in risposta a numerose molecole correlate all'infiammazione quali la trombina, l'istamina, radicali liberi e citochine. L'espressione della P-selectina sulla superficie cellulare è generalmente di breve durata (alcuni minuti), rendendola un candidato ideale nella mediazione delle prime fasi d'interazione tra leucociti ed endotelio (Golias et al., 2007). L'espressione della P-selectina non è stata significativamente ridotta nello studio di Albers et al. (2004) (47.9 ng/mL del gruppo trattato vs 43.8 ng/mL del placebo; P=0.518), suggerendo che il consumo di succo d'uva non abbia un effetto sinergico con i farmaci anticoagulanti nella riduzione della funzionalità piastrinica.

### **5.2.9 Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1)**

Le VCAM-1 sono proteine appartenenti alla superfamiglia delle Immunoglobuline che vengono espresse sulla superficie endoteliale in seguito a stimoli infiammatori quali interleuchina 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-4, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Oltre all'endotelio, possono essere espresse dai fibroblasti, macrofagi tissutali e cellule dendritiche. L'espressione delle VCAM-1 sulla superficie endoteliale può comportare adesione piastrinica con conseguente aumento del rischio cardiovascolare (Golias et al., 2007). Nello studio di Rankin et al. (2008), nel quale è stato valutato l'effetto del consumo di uva passa sui livelli di VCAM-1 in pazienti in sovrappeso, i livelli di VCAM-1 non sono risultati significativamente differenti prima e dopo il trattamento. Al contrario, Kalfin et al. (2002) hanno evidenziato una riduzione significativa dei livelli di VCAM-1 in pazienti affetti da sclerosi sistemica in seguito ad assunzione di estratto a base di semi d'uva rossa (Activin) per un mese (P < 0.01), modulandone anche l'espressione a livello endoteliale.

### **5.2.10 Intercellular Cell Adhesion Molecule-1 (ICAM-1)**

Come le VCAM-1, ICAM-1 sono proteine appartenenti alla superfamiglia delle Immunoglobuline, generalmente espresse sulla superficie delle cellule endoteliali. I principali ligandi delle ICAM-1 sono le  $\beta_2$ -integrine LFA-1 e Mac1, espressi dai leucociti. L'espressione delle ICAM-1 risulta up-regolata da citochine infiammatorie quali TNF- $\alpha$ , interferone- $\gamma$  ed interleuchina-1) ed elevati livelli di questa proteina sono presenti nel siero in patologie croniche con rilevante componente infiammatoria (artrite reumatoide, lupus eritematoso, diabete, patologie cardiovascolari) (Golias et al., 2006).

Nello studio di Kalfin et al. (2002) (descritto precedentemente) è stata evidenziata una riduzione significativa dei livelli di VCAM-1 in pazienti affetti da sclerosi sistemica in seguito ad assunzione di estratto a base di semi d'uva rossa (Activin) per un mese ( $P < 0.01$ ). Simili risultati sono stati ottenuti da Puglisi et al. (2008), ipotizzando che l'effetto dei flavonoidi contenuti nell'uva si espliciti nell'inibizione dell'attivazione di NF-kB nelle cellule endoteliali, determinando, così, la riduzione dell'espressione di ICAM-1.

### **5.2.11 8-epi-prostaglandina-F2-alfa (8-epi-PG-F2- $\alpha$ )**

L'8-epi-prostaglandina-F2-alfa è una proteina appartenente alla famiglia degli F2-isoprostani, composti strutturalmente simili alle prostaglandine F2 (PG-F2), prodotti dalla perossidazione non enzimatica dell'acido arachidonico. Tale proteina è un potente vasocostrittore il cui effetto è mediato dall'interazione con i recettori vascolari del TXA2 (Morrow et al., 1992). Nello studio di Rankin et al. (2008) sono stati valutati i livelli di 8-epi-prostaglandina-F2-alfa al fine di valutare l'effetto dell'assunzione di uva passa sullo *status* infiammatorio in soggetti in sovrappeso. I livelli di tale proteina sono risultati ridotti del 33% in seguito al trattamento, a differenza del gruppo placebo dove non è stata evidenziata nessuna riduzione significativa.

### **5.2.12 Trombossano B2 (TXB2)**

Il Trombossano B2 (TXB2) è un metabolita del Trombossano A2 (TXA2), prodotto dall'acido arachidonico in elevate quantità in seguito a stimoli di varia natura. Il TXA2 è un potente attivatore dell'aggregazione piastrinica; in modelli *in vivo*, soprattutto in patologie cardiovascolari con importante componente trombotica, vengono generalmente misurati i livelli sierici di TXB2, che riflettono la capacità piastrinica di sintetizzare TXA2. Nello studio condotto da Albers et al. (2004) i livelli di TXB2 non hanno subito significative variazioni in seguito al consumo di succo d'uva (50.3 pg/mL) rispetto al placebo (50.95 pg/mL) (P=0.468), indicando uno scarso effetto sinergico con i farmaci antiaggreganti nella riduzione della funzionalità piastrinica.

### **5.2.13 Ossido Nitrico (NO)**

L'NO (Ossido Nitrico) è un radicale libero di azoto prodotto dalle cellule endoteliali a partire dalla L-arginina. Esso è coinvolto in numerosi processi fisiologici tra cui la regolazione della pressione sanguigna, il tono della muscolatura liscia vasale, l'aggregazione piastrinica, la risposta del sistema immunitario e la trasmissione nervosa. Numerose evidenze sperimentali suggeriscono che alla base dei processi di compromissione dei vasi su base aterosclerotica vi sia un'alterazione significativa della biosintesi dell'NO. Tale alterazione può essere secondaria alla lesione aterosclerotica ma anche primaria ed avere significato patogenetico (Paoletti et al., 2003). Inoltre, lo stress ossidativo può portare alla formazione di radicali liberi dell'NO, tra cui i perossinitriti. In questo senso, negli studi *in vivo* vengono misurati i livelli di NO in quanto strettamente correlati al grado di stress ossidativo. Nello studio di Albers et al. (2004) i livelli di NO non risultano essere significativamente differenti nei due gruppi (P=0.839).

**Tabella 5.1** – Studi relativi alla *Vitis vinifera* L.

	Nessun beneficio		Beneficio		Commenti Efficacia
	N° studi	N° partecipanti	N° studi	N° partecipanti	
<b>Biomarkers</b>					
CRP	3 (Albers, et al., 2004);(Rankin, et al., 2008);(Castilla, et al., 2008)	69	3 (Kar, et al., 2006);(Castilla, et al., 2006);(Zern, et al., 2005)	117	OSN*
Proteina del complemento C3	1 (Castilla, et al., 2008)	32			OSN
Malondialdeide (MDA)	1 (Young, et al., 2000)	15	2 (Sano, et al., 2007);(Kalfin, et al., 2002)	263	SI
IL-6	1 (Rankin, et al., 2008)	17	1 (Zern, et al., 2005)	44	OSN
IL-8	1 (Albers, et al., 2004)	20			OSN
CD-40 L			1 (Albers, et al., 2004)	20	OSN
Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1)			2 (Castilla, et al., 2006);(Castilla, et al., 2008)	73	OSN
TNF- $\alpha$			2 (Zern, et al., 2005);(Puglisi, et al., 2008)	78	OSN
E-selectina			1 (Kalfin et al., 2002)	202	SI
P-selectina	1 (Albers, et al., 2004)	20			OSN
Fagocitosi dei granulociti			1 (Myers, et al., 2010)	21	OSN
Espressione della COX2			1 (Myers, et al., 2010)	21	OSN
8-epi-prostaglandina-F2-alfa			2 (Rankin, et al., 2008);(Abidov, et al., 2006)	61	OSN
PG-F2 (Prostaglandina F2)			1 (Gupta, et al., 2008)	60	OSN
VCAM-1	2 (Rankin, et al., 2008);(Castilla, et al., 2008)	49	2 (Castilla, et al., 2006);(Kalfin, et al., 2002)	243	SI

	Nessun beneficio		Beneficio		Commenti Efficacia
	N° studi	N° partecipanti	N° studi	N° partecipanti	
<b><i>Biomarkers</i></b>					
ICAM-1			4 (Castilla, et al., 2006);(Castilla, et al., 2008);(Kalfin, et al., 2002);(Puglisi, et al., 2008)	309	SI
Trombossano B2 TXB2	1 (Albers, et al., 2004)	20			OSN
11-deidro-TXB2			1 (Abidov, et al., 2006)	44	OSN
Ossido nitrico (NO)	1 (Albers, et al., 2004)	20			OSN
<b>TOTALE</b>	<b>4<sup>a</sup></b>	<b>84<sup>b</sup></b>	<b>12<sup>c</sup></b>	<b>608<sup>d</sup></b>	
<b><i>Hard end-points</i></b>					
Riduzione dei parametri infiammatori dipendenti dall'aggregazione piastrinica			1 (Albers, et al., 2004)	20	OSN
Riduzione dello stress ossidativo in soggetti sani			5 (Young, et al., 2000);(Rankin, et al., 2008);(Castilla, et al., 2006);(Sano, et al., 2007);(Abidov, et al., 2006)	178	SI
Riduzione dello stress ossidativo nella sclerosi sistemica			1 (Kalfin, et al., 2002)	202	SI
Riduzione dello stress ossidativo nella sclerosi sistemica			1 (Kalfin, et al., 2002)	202	SI



	Nessun beneficio		Beneficio		Commenti Efficacia
	N° studi	N° partecipanti	N° studi	N° partecipanti	
<b>Hard end-points</b>					
Riduzione dello stress ossidativo in pazienti emodializzati			1 (Castilla, et al., 2006)	41	OSN
Riduzione dello stress ossidativo in pazienti emodializzati			2 (Castilla, et al., 2006);(Castilla, et al., 2008)	73	OSN
Effetto antipiretico			1 (Gupta, et al., 2008)	60	OSN
<b>TOTALE</b>	<b>0<sup>a</sup></b>	<b>0<sup>b</sup></b>	<b>9<sup>c</sup></b>	<b>492<sup>d</sup></b>	

\*OSN: necessità di ulteriori studi; a) numero degli studi che non hanno rilevato effetti benefici; b) numero totale dei soggetti inclusi negli studi che non hanno riportato benefici; c) numero degli studi che hanno rilevato effetti benefici; d) numero totale dei soggetti inclusi negli studi che hanno riportato benefici.

Legenda: CRP (Proteina C reattiva); ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1); IL-6 (Interleuchina-6); IL-8 (Interleuchina-8); CD-40L (Ligando CD-40); TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ); COX2 (Cicloossigenasi 2); VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1).

### **5.3 *Camellia sinensis* L.**

Le foglie essiccate della pianta *Camellia sinensis* L. sono utilizzate per la preparazione del tè, che rappresenta una delle bevande più consumate al mondo. A seconda del trattamento che subisce la foglia fresca dopo la raccolta si ottengono diverse tipologie di tè: il tè verde (che costituisce il 20% della produzione mondiale di tè) simile alla foglia fresca in termini di contenuto di flavonoidi; le foglie, infatti, subiscono solo un breve processo di torrefazione ed essiccamento che permette la conservazione dei principi attivi contenuti, in particolare catechine. Il tè nero (78% della produzione mondiale), invece, subisce un processo di fermentazione che porta all'ossidazione delle catechine in teaflavine e tearubigine. Il tè oolong, infine, è un tè parzialmente fermentato che costituisce il 2% della produzione mondiale.

Le catechine costituiscono i principali flavonoidi del tè verde (circa il 30% del peso secco) e le più importanti dal punto di vista salutistico e dell'attività biologica sono l'epigallocatechin-3-gallato (EGCG), che rappresenta circa il 60% del contenuto di catechine totale, l'epigallocatechina (EGC) e l'epicatechina 3-gallato (ECG). In letteratura sono presenti numerosi studi sugli effetti benefici del tè verde; essi includono la valutazione della riduzione della pressione arteriosa e del colesterolo plasmatico (Han et al., 2011; Kim et al., 2011), l'inibizione dell'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità (LDL) (Ohmori et al., 2005), l'attività antiossidante e scavenger dei radicali liberi (Cabrera et al., 2006).

Gli studi relativi alle proprietà anti-infiammatorie della *C. sinensis* sono riportati nelle Tabelle 5.2-5.4: 19 studi riportano gli effetti del tè verde (Tabella 5.2), 6 quelli del tè nero (Tabella 5.3) e 4 hanno valutato o paragonato gli effetti di entrambi.

#### **5.3.1 Tè verde**

Per quanto riguarda il tè verde, un totale di 552 soggetti ha riportato benefici sui principali biomarkers infiammatori contro 389, dove un tale effetto non è stato osservato. Una simile situazione si osserva per gli hard end-points: 539 soggetti

hanno riportato un miglioramento dello *status* fisiologico associato all'infiammazione contro 419 che, invece, non hanno sperimentato alcun miglioramento significativo. Per quanto riguarda il tè nero, si osserva, rispetto al tè verde, un numero maggiore di soggetti in cui non sono stati riportati effetti benefici, sia in termini di riduzione di parametri infiammatori (334 vs. 129) che di miglioramento dei sintomi (268 vs 0). Nonostante l'elevato numero di studi, i dati disponibili sono ancora molto contraddittori: il tè verde, infatti, sembra avere un effetto significativo solo nella riduzione dei livelli di malondialdeide (MDA) e dello stress ossidativo, mentre altri biomarkers non sembrano esserne influenzati o comunque ciò si verifica solo in un numero ristretto di soggetti. Tuttavia, occorre sottolineare che il tè verde è stato saggiato in condizioni infiammatorie molto eterogenee (es. soggetti sani, patologie metaboliche, influenza etc.); di conseguenza, risulta difficile trarre conclusioni definitive sul suo effetto anti-infiammatorio. Nei paragrafi successivi sono riportati gli effetti del tè verde e del tè nero sui principali biomarkers infiammatori valutati.

### **5.3.1.1 Proteina C reattiva (CRP)**

La Proteina C Reattiva (CRP) è un biomarkers infiammatorio aspecifico i cui livelli sono correlati positivamente con il rischio cardiovascolare e del diabete. Numerosi studi hanno valutato l'effetto del tè verde sulla riduzione dei livelli plasmatici di CRP in numerose patologie croniche, facendo emergere risultati contrastanti. Infatti, negli studi di Fukino et al. (2005), Ryu et al. (2006), Basu et al. (2011) e de Maat et al. (2000) il consumo di tè verde, sia come estratto che come infuso, sia a breve che a lungo termine (4-8 settimane) non ha determinato riduzione dei livelli di CRP rispetto al controllo (placebo). Tali risultati hanno fatto ipotizzare che il meccanismo alla base dei dati relativi alla riduzione del rischio cardiovascolare da parte del tè verde non sia da ascrivere alla riduzione dei livelli plasmatici di CRP.

Tuttavia, altri studi hanno invece mostrato risultati positivi. Nello studio di Oyama et al. (2010) è stato investigato l'effetto del consumo quotidiano, per due

settimane, di infusi di tè verde con differenti quantitativi di catechine (0 mg, 80 mg, 580 mg) in 30 soggetti sani fumatori. Al termine dello studio, è stata evidenziata una riduzione dei livelli plasmatici di CRP nel gruppo che aveva consumato l'infuso di tè verde contenente il più elevato quantitativo di catechine rispetto al controllo (infuso senza catechine) ( $p < 0.05$ ). Gli autori, tuttavia, hanno concluso che il numero limitato di soggetti, l'inclusione di partecipanti di solo sesso maschile e l'assenza di patologie cardiovascolari possano costituire importanti limitazioni allo studio. Simili risultati e conclusioni sono stati evidenziati nello studio di Eichenberger et al. (2010), nel quale è stata riscontrata, rispetto al placebo ( $p = 0.045$ ), una riduzione dei livelli plasmatici di CRP in nove soggetti sani in seguito a consumo di un integratore di tè verde (contenente 159 mg di catechine totali) per tre settimane. Tuttavia, all'inizio dello studio, i livelli basali di CRP erano già molto bassi ( $0.4 \mu\text{g/mL}$ ), ponendo qualche dubbio sul reale significato di un'ulteriore riduzione di tale biomarker infiammatorio. Infatti, in patologie cardiovascolari i livelli di CRP risultano in media maggiori di  $1 \mu\text{g/mL}$ .

### **5.3.1.2 Malondialdeide (MDA)**

Nella ricerca sistematica della letteratura cinque studi hanno evidenziato l'effetto positivo del consumo di tè verde sulla riduzione dello stress ossidativo, di cui la malondialdeide (MDA) è uno degli indicatori più significativi. Nello studio di Nantz et al. (2009), il consumo da parte di soggetti sani di 2 capsule/die un estratto standardizzato di tè verde (contenente  $> 80\%$  di catechine) per tre settimane ha determinato, rispetto al placebo, la riduzione dell'11.9% dei livelli plasmatici di MDA ( $p < 0.05$ ), suggerendo, quindi, un possibile effetto protettivo nei confronti dell'ossidazione lipidica plasmatica. Simili risultati sono stati riscontrati nello studio di Freese et al. (1999), nel quale i livelli dell'MDA plasmatico sono stati significativamente ridotti in seguito a consumo di un estratto di tè verde ( $6.21 \text{ mol/L}$  all'inizio e  $4.87 \text{ mol/L}$  al termine dello studio;  $p < 0.05$ ).

Anche il consumo dell'infuso ha evidenziato effetto positivi sullo stress ossidativo. Infatti, nello studio di Klaunig et al. (1999) è stato testato l'effetto del consumo dell'infuso di tè verde (circa sei tazze/die) per sette giorni in un campione più ristretto, 67 soggetti sia fumatori che non. Al termine dello studio, la riduzione dell'escrezione urinaria di MDA è stata più evidente nei soggetti fumatori (circa sei volte), suggerendo il maggior effetto antiossidante del tè verde in soggetti sottoposti ad uno stress ossidativo più intenso. Allo stesso modo, una riduzione del 32.5 % dei livelli di MDA plasmatica è stata riportata da 18 soggetti che avevano consumato un infuso di tè verde (contenente 700 mg/340 mL di catechine) per 12 settimane, rispetto al placebo dove la riduzione è stata dell'11.5%. L'effetto positivo del tè verde sui livelli plasmatici di MDA è stato evidenziato anche in soggetti affetti da diabete di tipo II; infatti, nello studio di Fenercioglu et al. (2010) la riduzione dei biomarkers di perossidazione lipidica (tra cui l'MDA) è risultata significativamente più evidente nel gruppo trattato (300 mg/die di estratto di tè verde) rispetto al controllo (placebo) ( $p = 0.001$ ).

Due studi hanno, invece, non hanno riportato effetti significativi sui livelli di MDA plasmatici (van het Hof et al., 1997; Erba, 2005). Gli autori hanno concluso che il consumo giornaliero di tè verde (circa 6 tazze/die per quattro settimane) può non fornire sufficienti quantitativi di flavonoidi per espletare l'effetto biologico o che i principi attivi non risultano essere biodisponibili.

### **5.3.1.3 Interleuchina-6 (IL-6)**

Quattro studi, per un totale di 163 soggetti, non hanno evidenziato effetti positivi del consumo di tè verde sui livelli plasmatici di IL-6. Nello studio di Ryu et al. (2006) il consumo a lungo termine (4 settimane) dell'infuso di tè verde (contenuto di catechine non specificato) non ha determinato variazioni significative dei livelli di IL-6 in soggetti affetti da diabete di tipo II rispetto al placebo (acqua) ( $p = 0.594$ ). Simili risultati sono stati raggiunti negli altri studi (Basu et al., 2011; de Maat et al. 2000; Eichenberger et al., 2010), nei quali è stato valutato sia l'effetto

di estratti che di infusi di tè verde in soggetti sani. Tali risultati suggeriscono che l'IL-6 non sia implicata negli effetti benefici del tè verde.

#### **5.3.1.4 Interleuchina 1- $\beta$ (IL-1 $\beta$ )**

In condizioni fisiologiche, l'interleuchina 1- $\beta$  riveste un'importante funzione omeostatica nella regolazione di processi quali il ciclo sonno-veglia e la temperatura corporea. Tuttavia, l'iper-produzione di questa citochina infiammatoria è implicata nei cambiamenti fisiopatologici che si verificano in condizioni quali l'artrite reumatoide, l'osteoartrite, le patologie vascolari e l'Alzheimer (Golias et al., 2006).

Nessuno dei due studi che hanno valutato l'effetto del tè verde sull'IL 1- $\beta$  (Basu et al., 2011; de Maat et al., 2000) è stato riscontrato un effetto positivo. Infatti, nello studio di Basu et al. (2011), i livelli di IL 1- $\beta$  non sono risultati significativamente diversi prima e dopo il trattamento di otto settimane con estratto di tè verde (0.20 pg/mL all'inizio e 0.23 pg/mL al termine dello studio). Simili conclusioni sono state tratte da de Maat et al. (2000) (0.87 pg/mL di IL 1- $\beta$  riscontrati nei soggetti all'inizio dello studio vs 0.86 pg/mL dopo quattro settimane).

#### **5.3.1.5 Tumor Necrosis Factor alfa (TNF- $\alpha$ )**

L'effetto del consumo di tè verde sui livelli di TNF- $\alpha$  sono stati valutati solo nello studio di de Maat et al., (2000), non riscontrando, tuttavia, effetti positivi. In questo studio, infatti, il tè verde (6 tazze/die preparate infondendo 500 mg di tè in 150 mL di acqua calda) è stato confrontato con il tè nero (6 tazze/die preparate infondendo 500 mg di tè in 150 mL di acqua calda) e con l'acqua (placebo) nella riduzione di parametri infiammatori e di stress ossidativo in soggetti sani fumatori. Rispetto ai livelli di TNF- $\alpha$  iniziali, non è stata evidenziata alcuna riduzione significativa in nessuno dei trattamenti (p non significativo).

### **5.3.1.6 8-iso-prostaglandina-F2-alfa (8-iso-PG-F2- $\alpha$ )**

L'8-iso-prostaglandina-F2-alfa, come l'8-epi-prostaglandina-F2-alfa, è un marker dello stress ossidativo, e in particolare della perossidazione lipidica. In letteratura, sono stati selezionati due studi che hanno indagato l'effetto del tè verde su tale biomarker. Nello studio di Nagaya et al. (2004), il consumo di 440 mL di tè verde da parte di 20 soggetti sani fumatori ha determinato una significativa riduzione dei livelli di 8-epi-prostaglandina-F2-alfa. Al contrario, nello studio di Freese et al. (1999), questa riduzione non risulta significativa. Infatti, tale biomarker ha subito un decremento sia nel gruppo trattato (10 tazze/die per quattro settimane) che nel controllo (placebo).

### **5.3.1.7 Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1)**

Due studi hanno valutato l'effetto del tè verde sull'espressione delle Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1). Nello studio di Goudev et al. (2000) il trattamento consisteva in capsule contenenti non solo un estratto di tè verde (10 mg) ma anche altri antiossidanti (vitamina E,  $\beta$ -carotene, picnogenolo, etc.). Il consumo di quattro capsule/die per 12 settimane ha determinato, rispetto al placebo, una riduzione significativa dei livelli di VCAM-1 (780.5 ng/mL prima del trattamento vs 656 ng/mL al termine dello studio,  $p = 0.04$ ). Al contrario, nello studio condotto da Basu et al. (2011), nel quale è stato valutato l'effetto del solo tè verde, tale riduzione non risulta significativa. È possibile che l'associazione di più antiossidanti nello studio di Goudev et al. (2000) abbia avuto un effetto sinergico nella riduzione delle VCAM-1.

### **5.3.1.8 Intercellular Cell Adhesion Molecule-1 (ICAM-1)**

L'espressione di delle Intercellular Cell Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) è stato, anche in questo caso, valutato negli studi di Basu et al. (2011) e Goudev et al. (2000), con esiti simili a quelli osservati per le VCAM-1. Nello studio di Goudev

et al. (2000) i livelli basali di ICAM-1 erano pari a 341.8 ng/mL (placebo = 349.9 ng/mL); al termine dello studio, tali livelli sono risultati pari a 301.6 ng/mL (placebo = 356 ng/mL) ( $p = 0.053$ ). Nello studio di Basu et al. (2011) la riduzione di ICAM-1 non è stata significativa (119.0 ng/mL vs 199.6 ng/mL al termine dello studio).

Gli effetti del tè verde sono stati valutati anche su altri parametri infiammatori quali l'espressione di metalloproteinasi (MMPs), la produzione del Trombossano B2 (TXB2) (e suoi derivati) e dell'ossido nitrico (NO), ma non sono riscontrati effetti positivi.

### **5.3.2 Tè nero**

In generale, il tè nero risulta meno attivo del tè verde nella riduzione di parametri infiammatori. Infatti, otto studi (per un totale di 334 soggetti) non hanno riportato effetti positivi nella riduzione di biomarkers infiammatori e tre (per un totale di 129 soggetti), invece, li hanno evidenziati.

#### **5.3.2.1 Proteina C Reattiva (CRP)**

In totale, quattro studi hanno indagato l'effetto del tè nero sui livelli plasmatici di CRP quale biomarker associato allo stress ossidativo e al rischio cardiovascolare. Di questi, tre studi non hanno evidenziato effetti positivi (Widlansky et al., 2005; de Maat et al., 2000; Mukamal et al., 2007). Nello studio di Widlansky et al. (2005) è stato valutato l'effetto del consumo di tè nero (450 mL o 900 mL al giorno) sia a breve (due ore) che a lungo termine (quattro settimane) in 66 soggetti affetti da patologie cardiovascolari. Sebbene sia stato riscontrato un aumento dei livelli di catechine (EC ed ECG) nel plasma dei soggetti sia nel consumo a breve (33%) che a lungo termine (29%), tale effetto non è stato seguito da una riduzione dei livelli plasmatici di CRP. Tuttavia, un effetto positivo è stato evidenziato nel gruppo placebo (acqua), facendo presupporre la presenza di qualche bias



all'interno dello studio. Anche nello studio di Mukamal et al. (2007) non è stato evidenziato un effetto di riduzione dei livelli di CRP in pazienti affetti da diabete di tipo II o patologie cardiovascolari, probabilmente anche a causa del basso quantitativo di tè nero utilizzato (1 tazza/settimana per sei mesi). Nello studio di Steptoe et al. (2007), al contrario, il consumo di tè nero (una tazza/die per quattro settimane) da parte di soggetti sani, ha determinato una riduzione significativa dei livelli di CRP rispetto al placebo (in media 0.76 mg/L vs 0.97 mg/L,  $p = 0.05$ ).

### **5.3.2.2 P-selectina**

Due studi hanno valutato l'effetto del consumo di tè nero sull'espressione di P-selectina. Nello studio di Hodgson et al. (2001), il consumo di tè nero (5 tazze/die per 4 settimane) ha significativamente ridotto i livelli di P-selectina ( $p = 0.01$ ) rispetto al placebo (acqua) in 22 soggetti sani, ma non di altre molecole di adesione o dell'aggregazione piastrinica. Tali risultati potrebbero spiegare in parte l'effetto positivo del tè nero nella riduzione del rischio cardiovascolare in alcuni studi epidemiologici. Tuttavia, nello studio di Steptoe et al. (2007), svolto sempre in soggetti sani ( $n = 75$ ) e della durata di sei settimane, tale effetto non è stato evidenziato. E' probabile che diversi fattori influiscano sulla discordanza degli studi, come ad esempio la composizione del tè (non descritta nello studio di Hodgson et al., 2001) e il dosaggio.

### **5.3.2.3 Aggregazione piastrinica**

L'effetto del tè nero sull'aggregazione piastrinica è stato valutato in un unico studio (Steptoe et al., 2007). Sebbene nello studio non siano stati rilevati effetti positivi sul fattore di adesione P-selectina, il consumo di tè nero ha determinato, rispetto al placebo, una riduzione dell'attivazione piastrinica, misurata come percentuale di aggregati piastrine-leucociti circolanti ( $p = 0.78$ ).

Negli altri studi, non sono stati evidenziati effetti positivi sui biomarkers infiammatori quali E-selectina, TNF- $\alpha$ , fibrinogeno, isoprostani, VCAM-1, ICAM-1, fattore di Von Willebrand (vWF), Inibitore dell'Attivatore del Plasminogeno-1 (PAI-1) e Attivatore del Plasminogeno tissutale (t-PA).

Occorre sottolineare che sono pochi gli studi che hanno valutato gli effetti su questi biomarkers; inoltre, emerge con chiara evidenza l'elevata eterogeneità della composizione del tè utilizzata (dove descritta) e la non considerazione di fattori quali lo stile di vita e la dieta.

### 5.3.3 Studi epidemiologici

Per la *Camellia sinensis* L. sono stati selezionati, attraverso i criteri di inclusione ed esclusione precedentemente descritti, 13 studi epidemiologici (Tabella 5.5). Tre ampi studi cross-sezionali hanno valutato la relazione tra consumo di tè verde o nero e livelli plasmatici di Proteina C Reattiva (CRP) (De Bacquer et al., 2006; Chun et al., 2008; Maki et al., 2010). Uno di questi, in particolare (De Bacquer et al., 2006), condotto su 1031 soggetti sani belgi, ha evidenziato una relazione positiva tra consumo di tè nero e riduzione dei livelli non solo di CRP, ma anche di amiloide A ed aptoglobina. Gli altri due studi, invece, il primo condotto sulla popolazione giapponese (di età compresa tra 49 e 76 anni) (Maki et al., 2010) e il secondo su quella statunitense (8335 soggetti con età > 19 anni) (Chun et al., 2008), non hanno evidenziato alcuna correlazione.

Uno studio prospettico condotto nella popolazione femminile diabetica statunitense, ha messo in rilievo che l'assunzione di 2 o più tazze di tè al giorno (sia verde che nero) sembra essere associato a concentrazioni più elevate di adiponectina (proteina ad azione anti-infiammatoria), ma tale relazione è risultata non significativa una volta aggiustati i valori ottenuti per stile di vita e anamnesi medica dei soggetti (P=0.07) (Williams et al., 2008).

Dalla Tabella 5.4 è possibile osservare che, in linea generale, i biomarkers infiammatori non sembrano essere influenzati positivamente dal consumo di C.

*sinensis* L. (22075 soggetti totali che hanno riportato benefici rispetto a 1031 soggetti che non li hanno riportati).

Simili conclusioni possono essere tratte osservando gli effetti del consumo di tè verde in diverse patologie infiammatorie: 15688 soggetti totali che hanno riportato benefici rispetto a 2308 soggetti che non li hanno riportati. In uno studio cross-sezionale effettuato in Giappone (Shibata et al., 2000) e uno studio caso controllo in Cina (Setiawan et al., 2001), l'effetto protettivo nei confronti della gastrite atrofica è stato osservato solamente quando il consumo giornaliero di tè verde era molto elevato oppure prolungato nel tempo. Nello studio di Setiawan et al. (2000) in particolare, che ha incluso 166 casi di gastrite e 433 controlli sani, è risultato che, coloro che consumavano tè verde presentavano il 51% di rischio in meno di sviluppare gastrite cronica rispetto ai non consumatori e che la relazione tra consumo e patologia aveva un andamento dose-risposta con gli anni di utilizzo di tè verde. Al contrario, lo studio di Shibata et al. (2001) ha mostrato che anche il consumo elevato (> 10 tazze/die) di tè verde nella popolazione giapponese (n=636, età media 50.2 anni) non sembrerebbe essere associato ad una riduzione del rischio di sviluppare gastrite atrofica, anche dopo correzione dai dati per infezione da *H. pylori* e fattori connessi allo stile di vita (OR=0.63; 95% CI, 0.43-0.93). Simili risultati sono stati ottenuti dallo studio di Kuwahara et al. (2000) (n=566, età 50-55 anni), nel quale la riduzione del rischio di sviluppare gastrite atrofica è stata valutata statisticamente non significativa.

**Tabella 5.2** – Studi relativi alla *Camellia sinensis* L.: tè verde

	Nessun beneficio		Beneficio		Commenti Efficacia
	N° studi	N° partecipanti	N° studi	N° partecipanti	
<b>Biomarkers</b>					
Proteina C reattiva (CRP)	5 (Fukino, et al., 2005);(Ryu, et al., 2006);(de Maat, et al., 2000);(Bakker, et al., 2010);(Basu, et al., 2011)	256	2 (Oyama, 2010);(Eichenberger, et al., 2010)	39	NO
Alfa-amiloide			1 (Nantz, et al., 2009)	111	OSN*
MDA	2 (van het Hof, et al., 1997);(Erba, 2005)	49	5 (Nantz, et al., 2009);(Klaunig, 1999);(Freese, 1999);(Fenercioglu et al., 2010);(Nagao, et al., 2005)	307	YES
Adiponectina	2 (Bakker, et al., 2010);(Basu, et al., 2011)	71			OSN
IL-6	4 (Ryu, et al., 2006);(Basu, et al., 2011);(de Maat, et al., 2000);(Eichenberger, et al., 2000)	163			OSN
IL-1 $\beta$	2 (Basu, et al., 2011);(de Maat, et al., 2000)	99			OSN
CD-40 L			1 (Oyama, 2010)	30	OSN
MCP-1			1 (Oyama, 2010)	30	OSN
MIF (macrophage migration inhibitory factor)			1 (Oyama, 2010)	30	OSN
TNF- $\alpha$	1 (de Maat, et al., 2000)	64			OSN
IFN- $\gamma$			1 (Rowe, et al., 2007)	124	OSN
Leptina	1 (Basu, et al., 2011)	35			OSN
Fibrinogeno	1 (de Maat, et al., 2000)	64			OSN
Isoprostani F2	1 (Hodgson, 2002)	13			OSN
8-isoprostaglandina-F2-alfa	1 (Freese, 1999)	20	1 (Nagaya, et al., 2004)	20	OSN

	Nessun beneficio		Beneficio		Commenti Efficacia
	N° studi	N° partecipanti	N° studi	N° partecipanti	
<b>Biomarkers</b>					
8-epi-postaglandin-F2-alfa			1 (Hirano-Ohmori, et al., 2005)	22	OSN
6-cheto-PGF2 $\alpha$	1 (Hirano-Ohmori, et al., 2005)	22			OSN
VCAM-1	1 (Basu, et al., 2011)	35	1 (Goudev, 2000)	60	OSN
ICAM-1	1 (Basu, et al., 2011)	35	1 (Goudev, 2000)	60	OSN
Metalloproteinasi (MMPs)	1 (Hirano-Ohmori, et al., 2005)	22			OSN
Trombossano (B2) TXB2	1 (Hirano-Ohmori, et al., 2005)	22			OSN
F2a, 2,3-dinor thrombossano B2	1 (Freese, 1999)	20			OSN
Ossido nitrico (NO)	1 (Freese, 1999)	20			OSN
<b>TOTAL</b>	<b>12<sup>a</sup></b>	<b>389<sup>b</sup></b>	<b>10<sup>c</sup></b>	<b>552<sup>d</sup></b>	
<b>Hard end-points</b>					
Variazione dello status infiammatorio nel diabete conclamato o borderline	2 (Fukino, et al., 2005);(Ryu, et al., 2006)	121	1 (Fenercioglu, et al., 2010)	114	OSN
Riduzione dello stress ossidativo in soggetti sani	3 (Bakker, et al., 2010);(Hirano-Ohmori, et al., 2005);(van het Hof, et al., 1997)	83	9 (Erba, 2005);(Nantz, et al., 2009);(Oyama, 2010);(Freese,1999); (Nagaya, et al., 2004);(Klaunig, 1999);(Nagao, et al., 2005);(Panza, 2008);(Hodgson, 2000)	301	SI

	Nessun beneficio		Beneficio		Commenti Efficacia
	N° studi	N° partecipanti	N° studi	N° partecipanti	
<b>Hard end-points</b>					
Status infiammatorio nella sindrome metabolica	1 (Basu, et al., 2011)	35			OSN
Riduzione dei sintomi influenzali			1 (Rowe, et al., 2007)	124	OSN
Irritazione nel foto-invecchiamento	2 (Chiu, et al., 2005);(Janjua, et al., 2009)	96			OSN
<b>TOTAL</b>	<b>8<sup>a</sup></b>	<b>419<sup>b</sup></b>	<b>11<sup>c</sup></b>	<b>539<sup>d</sup></b>	

\* OSN: necessità di ulteriori studi; a) numero degli studi che non hanno rilevato effetti benefici; b) numero totale dei soggetti inclusi negli studi che non hanno riportato benefici; c) numero degli studi che hanno rilevato effetti benefici; d) numero totale dei soggetti inclusi negli studi che hanno riportato benefici

Legenda: CRP (Proteina C reattiva); MDA (Malondialdeide); IL-6 (Interleuchina-6); IL-1 $\beta$  (Interleuchina 1- $\beta$ ); CD-40L (Ligando CD-40); MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein); TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ); IFN- $\gamma$  (Interferone  $\gamma$ ); COX2 (Cicloossigenasi 2); 6-keto-PGF-2 $\alpha$  (6-cheto-prostaglandina-2 alfa); VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1); ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1).

**Tabella 5.3** - Studi relativi alla *Camellia sinensis* L.: tè nero

	Nessun beneficio		Beneficio		Commenti Efficacia
	N° studi	N° partecipanti	N° studi	N° partecipanti	
<b>Biomarkers</b>					
CRP	3 (Widlansky, et al., 2005);(de Maat, et al., 2000);(Mukamal, et al., 2007)	158	1 (Stephoe, et al., 2007)	75	NO/OSN*
MDA	2 (van het Hof, et al., 1997);(O' Reilly, et al., 2001);	57			SI
IL-6	2 (Mukamal, et al., 2007);(de Maat, et al., 2000);	92			OSN
IL-1b	1 (de Maat, et al., 2000);	64			OSN
TNF- $\alpha$	2 (de Maat, et al., 2000);(Mukamal, et al., 2007)	92			OSN
E-selectina	1 (Hodgson, 2001)	22			OSN
P-selectina	1 (Stephoe, et al., 2007)	75	1 (Hodgson, 2001)	22	OSN
Fibrinogeno	3 (de Maat, et al., 2000);(Mukamal, et al., 2007);(Hodgson, 2001)	114			OSN
8-isoprostano	1 (Widlansky, et al., 2005)	66			OSN
F-2 isoprostani	1 (Hodgson, 2002)	22			OSN
8-epi-prostaglandina-F2-alfa			1 (O' Reilly, et al., 2001)	32	OSN
VCAM-1	2 (Mukamal, et al., 2007);(Hodgson, 2001)	50			OSN
ICAM-1	2 (Mukamal, et al., 2007);(Hodgson, 2001)	50			OSN
t-PA	2 (Mukamal, et al., 2007);(Hodgson, 2001)	50			OSN
PAI-1	1 (Hodgson, 2001)	22			OSN
vWF	1 (Mukamal, et al., 2007)	28			OSN
Complessi leucociti-piastrine			1 (Stephoe, et al., 2007)	75	OSN
<b>TOTAL</b>	<b>8</b>	<b>334</b>	<b>3</b>	<b>129</b>	

	Nessun beneficio		Beneficio		Commenti Efficacia
	N° studi	N° partecipanti	N° studi	N° partecipanti	
<b>Hard end-points</b>					
Variazione dello status infiammatorio nel diabete conclamato o borderline	1 (Mukamal, et al., 2007)	28			OSN
Riduzione dello stress ossidativo in soggetti sani	5 (Steptoe, et al., 2007);(O' Reilly, et al., 2001);(Hodgson, 2001);(van het Hof, et al., 1997);(Hodgson, 2000)	174			OSN
Riduzione dello stress ossidativo In patologie vascolari croniche	1 (Widlansky, et al., 2005)	66			OSN
Riduzione dell'infiammazione In patologie vascolari croniche	1 (Widlansky, et al., 2005)	66			OSN
<b>TOTAL</b>	<b>7<sup>a</sup></b>	<b>268<sup>b</sup></b>	<b>0<sup>c</sup></b>	<b>0<sup>d</sup></b>	

\* OSN: necessità di ulteriori studi; a) numero degli studi che non hanno rilevato effetti benefici; b) numero totale dei soggetti inclusi negli studi che non hanno riportato benefici; c) numero degli studi che hanno rilevato effetti benefici; d) numero totale dei soggetti inclusi negli studi che hanno riportato benefici.

Legenda: CRP (Proteina C reattiva); MDA (Malondialdeide); IL-6 (Interleuchina-6); IL-1 $\beta$  (Interleuchina 1- $\beta$ ); TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ); VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1); ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule); t-PA (Attivatore del Plasminogeno tissutale); PAI-1 (Inibitore dell'Attivatore del Plasminogeno-1); vWF (Fattore di von Willebrand)



**Tabella 5.4** - Dati epidemiologici relativi alla *Camellia sinensis* L.

	Nessun beneficio		Beneficio		Commenti Efficacia
	N° studi	N° partecipanti	N° studi	N° partecipanti	
<b><i>Biomarkers</i></b>					
CRP	3 (Maki, et al., 2010);(Chun, et al., 2008);(Song, et al., 2005)	19004	1 (De Bacquer, et al., 2006)	1031	NO
IL-6	1 (Song, et al., 2005)	344			OSN*
Amilode A sierica e aptoglobina			1 (De Bacquer, et al., 2006)	1031	OSN
Adiponectina	1 (Williams, et al., 2008)	2040			OSN
Fibrinogeno	1 (De Bacquer, et al., 2006)	1031			OSN
<b>TOTAL</b>	<b>5</b>	<b>22075</b>	<b>1</b>	<b>1031</b>	<b>OSN</b>
<b><i>Hard end-points</i></b>					
Gastrite atrofica	1 (Kuwahara, et al., 2000)	566	2 (Setiawan, et al., 2001);(Shibata, et al., 2000)	1368	OSN
COPD (patologie ostruttive polmonari croniche)	1 (Tabak, et al., 2001)	13651			OSN
Asma	2 (Shaheen, et al., 2001);(Garcia, et al., 2005)	1471			OSN
Patologie periodontali			1 (Kushiyama, et al., 2009)	940	OSN
<b>TOTAL</b>	<b>4<sup>a</sup></b>	<b>15688<sup>b</sup></b>	<b>3<sup>c</sup></b>	<b>2308<sup>d</sup></b>	<b>OSN</b>

\*OSN: necessità di ulteriori studi; a) numero degli studi che non hanno rilevato effetti benefici; b) numero totale dei soggetti inclusi negli studi che non hanno riportato benefici; c) numero degli studi che hanno rilevato effetti benefici; d) numero totale dei soggetti inclusi negli studi che hanno riportato benefici

Legenda: CRP ( Proteina C Reattiva); IL-6 (Interleuchina-6).

#### **5.4 *Matricaria recutita* L.**

La *Matricaria recutita* L. (camomilla) rappresenta un esempio di pianta che vanta una lunga tradizione d'uso per disturbi gastrointestinali, ma per la quale studi scientifici nell'uomo, in termini di uso orale, sono praticamente inesistenti. Dalla revisione della letteratura, è stato possibile includere un solo studio (Becker et al., 2006) poiché gli altri studi estratti in letteratura utilizzavano tale pianta in formulazioni per aerosol, dentifrici e collutori. Lo studio di Becker et al. (2006), in cui sono stati inclusi 255 bambini, riporta l'uso della *M. recutita* per valutarne l'effetto sulla riduzione della diarrea acuta. Al termine dello studio è stata evidenziata una riduzione della durata della diarrea e la frequenza delle evacuazioni (hard end-point), mentre l'effetto su biomarkers infiammatori non è stato valutato. Considerata anche l'assenza di studi epidemiologici, si può concludere che la camomilla necessita di studi d'intervento nell'uomo focalizzati sull'infiammazione gastrointestinale che possano giustificare la tradizione d'uso. In alternativa, dovrebbero essere sviluppati modelli *in vitro* o *ex vivo* in grado di rappresentare tale situazione.

#### **5.5 *Olea europea* L.**

Tutti gli studi selezionati (n=6) sono stati effettuati tramite l'utilizzo dell'olio di oliva (Tabella 5.4). Cinque studi, per un totale di 985 soggetti, hanno valutato numerosi parametri infiammatori (Konstantinidou et al., 2010; Pacheco et al., 2008). In generale, i risultati mostrano che il trattamento con olio di oliva hanno modificato i livelli di Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1), Intercellular Cell Adhesion Molecule-1 (ICAM-1), Interleuchina-6 (IL-6), E-selectina, isoprostano e Interferone- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Un altro studio (Bitler et al., 2007) ha riportato, inoltre, una riduzione del dolore valutato dal sistema qualitativo DAS-28 (Disease Activity Score-28) e un miglioramento della qualità della vita secondo l'HAQ-DI (Health Assessment Questionnaire Disability Index) in 105 soggetti affetti da artrite. Nei paragrafi successivi sono riportati i risultati relativi ai

principali biomarkers infiammatori analizzati negli studi.

### **5.5.1 Proteina C Reattiva (CRP)**

L'effetto dell'*Olea europea* L. sulla CRP è stato valutato in due studi. Nel primo (Bitler et al., 2007), comprendente 105 soggetti affetti da artrite reumatoide, è stato utilizzato come trattamento la frazione acquosa dell'oliva, nella dose di 400 mg per quattro settimane e come controllo il placebo. Al termine dello studio, non è stata evidenziata una riduzione significativa dei principali biomarkers infiammatori, inclusa la CRP, nonostante il miglioramento della sintomatologia dolorosa connessa all'artrite reumatoide. Kostandinidou et al. (2010) hanno, invece, valutato l'effetto dell'olio extravergine di oliva in associazione alla dieta mediterranea (VOO + TMD) rispetto al controllo e alla sola dieta mediterranea (TMD) in 90 soggetti sani al fine sullo stress ossidativo e i biomarkers infiammatori ad esso associati. Al termine dello studio (3 mesi) è stata evidenziata una riduzione significativa dei livelli di CRP plasmatici sia nel gruppo TMD che VOO + TMD ( $p < 0.05$ ) e una riduzione dei geni coinvolti nello sviluppo dell'aterosclerosi.

### **5.5.2 Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1)**

I tre studi hanno valutato l'effetto dell'olio di oliva sulle molecole di adesione vascolari hanno evidenziato risultati positivi. In tutti e tre gli studi, tuttavia, l'effetto dell'olio di oliva è stato valutato in associazione alla dieta mediterranea, non consentendo, di conseguenza, una chiara distinzione degli effetti positivi dei due interventi dietetici. Nello studio di Mena et al. (2009) 112 soggetti con diabete o elevato rischio cardiovascolare (alcuni in trattamento con statine o ACE inibitori) sono stati assegnati a differenti approcci dietetici: la dieta mediterranea in associazione ad 1 L di olio di oliva/settimana (Med-Diet); la dieta mediterranea in associazione a 30 g/die di frutta secca (noci, mandorle e nocciole) oppure una dieta a basso contenuto di grassi. La riduzione delle VCAM-1 è stata evidenziata in entrambi i gruppi che seguivano la dieta mediterranea, ma solo in coloro che erano

in trattamento con farmaci ipocolesterolemizzanti o ACE inibitori, sottolineando l'importanza dell'effetto sinergico tra approccio dietetico e trattamento farmacologico (Mena et al., 2009). Uno studio simile è stato condotto da Fuentes et al. (2008) nel quale la dieta mediterranea ricca in acidi grassi monoinsaturi (basata, tra le altre cose, sull'uso di olio extra vergine di oliva) è stata paragonata alla dieta tipica dei Paesi occidentali (ricca in acidi grassi saturi) e ad una dieta povera di grassi ed arricchita in acidi grassi della serie n=3. Al termine dello studio (quattro settimane) i livelli di VCAM-1 sono risultati significativamente più bassi nei soggetti che avevano seguito la dieta mediterranea ( $p = 0.031$ ).

L'effetto a breve termine dell'uso di olio di oliva sulle molecole di adesione è stato valutato nello studio condotto da Pacheco et al. (2008), nel quale sono stati inclusi 28 soggetti con ipertrigliceridemia (14 normotesi e 14 ipertesi). Il protocollo clinico prevedeva il consumo di un pasto iperlipidico seguito dal consumo di olio di oliva o di olio di semi di girasole rispetto al controllo (soggetti sani). Al termine dello studio, è stata evidenziata una riduzione dei livelli di VCAM-1 solo nel gruppo che aveva assunto olio di oliva, e questo effetto era evidente sia nei soggetti normotesi che in quelli ipertesi ( $p < 0.01$ ).

### **5.5.3 Intercellular Cell Adhesion Molecule-1 (ICAM-1)**

I livelli di ICAM-1 sono stati valutati in tre studi, i risultati di due dei quali (Mena et al., 2009; Pacheco et al., 2008) confermano quanto osservato per le VCAM-1.

Nel terzo studio (Corella et al., 2009), invece, è stato valutato l'effetto della dieta mediterranea in associazione con olio extra vergine di oliva (MD + VOO) sull'espressione di ICAM-1 e altri biomarkers infiammatori in soggetti con polimorfismo genetico per la COX-2, associato ad un aumento dei livelli fisiologici di CRP, IL-6 e molecole di adesione tra cui le ICAM-1. Tale approccio dietetico è stato confrontato con la dieta mediterranea in associazione con noci (MD + NUTS) e con il controllo (dieta ipolipidica), risultando egualmente efficace al trattamento con MD + NUTS nella riduzione dei livelli di ICAM-1 ( $p = 0.018$ ).

#### **5.5.4. Interleuchina-6 (IL-6)**

Gli effetti positivi del consumo di olio di oliva sui livelli di IL-6 sono stati evidenziati dagli studi condotti da Mena et al. (2009) e Corella et al. (2009), mentre Bitler et al. (2007) non hanno riscontrato effetti benefici significativi.

Tale discordanza può essere imputabile in parte al fatto che nello studio di Bitler et al. (2007) il trattamento prevedeva l'utilizzo dell'acqua di vegetazione isolata dall'oliva, mentre negli altri due studi è stato utilizzato l'olio extra vergine di oliva in associazione alla dieta mediterranea. Inoltre, gli effetti del trattamento sono stati investigati in patologie e condizioni fisiologiche differenti: l'artrite reumatoide nello studio di Bitler et al. (2007) e patologie cardiovascolari.

L'effetto dell'olio di oliva su altri biomarkers infiammatori quali MMPs (Metalloproteinasi), IL-8 ed IL-1 $\beta$  (Interleuchina-8 e -1 $\beta$ ), (NO (ossido nitrico), IL-10 (Interleuchina 10), MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), è stato poco studiato e riportato da singoli studi (Fuentes et al., 2008 per l'NO e Kostantinidou et al., 2010 per l'IL-10), dove, peraltro, non sono stati evidenziati effetti positivi. Infine, solo uno studio riporta l'effetto positivo dell'olio di oliva sui livelli di isoprostani e IFN- $\gamma$  (Interferone- $\gamma$ ), sempre in associazione con la dieta mediterranea.

#### **5.5.5 Studi epidemiologici**

Per quanto riguarda gli studi epidemiologici, invece, applicando i criteri di inclusione ed esclusione, ne sono stati selezionati cinque. In generale, essi hanno valutato l'effetto, nella dieta, degli oli vegetali parzialmente idrogenati (HVO) rispetto all'olio di oliva (non-HVO) (Esmailzadeh e Azadbakht, 2008). Tuttavia, il numero generale dei soggetti inclusi e degli studi stessi risulta ancora insufficiente per supportare l'effetto benefico dell'olio di oliva nell'infiammazione.

Due studi caso-controllo effettuati in Grecia suggeriscono un effetto protettivo svolto dal consumo di olio di oliva nei confronti dell'artrite reumatoide (Linos et

al., 1991; Linos et al., 1999). Inoltre, due studi spagnoli (Salas-Salvado et al., 2008; Serrano-Martinez et al., 2005) hanno osservato una correlazione positiva tra consumo di olio di oliva ed espressione di molecole di adesione vascolari di tipo 1 (VCAM-1) in pazienti con elevato rischio cardiovascolare o angina instabile. In un altro studio cross-sezionale effettuato in donne iraniane, l'elevato consumo di non-HVO è risultato associato a più basse concentrazioni plasmatiche di amiloide A, TNF, CRP e sICAM-1. Tuttavia, il consumo di olio di oliva non è stato valutato da solo, ma solo in associazione con altri non-HVO. Nonostante la presenza di evidenze positive, quindi, anche gli studi epidemiologici suggeriscono la necessità di ulteriori studi a sostegno dell'effetto benefico associato al consumo di olio di oliva oppure, in alternativa, lo sviluppo di modelli *in vitro* o *ex vivo* in grado di mimare la situazione fisiologica nell'uomo.

**Tabella 5.5** - Studi relativi alla *Olea europea* L.: olio di oliva

	Nessun beneficio		Beneficio		Commenti Efficacia
	N° studi	N° partecipanti	N° studi	N° partecipanti	
<b><i>Biomarkers</i></b>					
MMPs (1,2,3,9,13)	1 (Bitler, et al., 2007)	105			OSN*
ILs (1beta, 8)	1 (Bitler, et al., 2007)	105			OSN
CRP	1 (Bitler, et al., 2007)	105			OSN
VCAM-1			3 (Mena, et al., 2009);(Pacheco, et al., 2008);(Fuentes, et al., 2008)	174	SI
ICAM-1			3 (Pacheco, et al., 2008);(Mena, et al., 2009);(Corella, et al., 2009)	875	SI
IL-6	1 (Bitler, et al., 2007)	105	2 (Mena, et al., 2009);(Corella, et al., 2009)	833	SI
E-selectina			1 (Mena, et al., 2009)	112	OSN
Nitrati/Nitriti	1 (Fuentes, et al., 2008)	20			OSN
NO	1 (Fuentes, et al., 2008)	20			OSN
Isoprostani			1 (Konstantinidou, et al., 2010)	90	OSN
Gene dell'IL-10	1 (Konstantinidou, et al., 2010)	90			OSN
MCP-1	1 (Konstantinidou, et al., 2010)	90			OSN
IFN-γ			1 (Konstantinidou, et al., 2010)	90	OSN
<b>TOTAL</b>	<b>3</b>	<b>215</b>	<b>5</b>	<b>985</b>	
<b><i>Hard end-points</i></b>					
Dolore			1 (Bitler, et al., 2007)	105	OSN
HAQ-DI (Health assessment Questionnaire for rheumatoid arthritis)			1 (Bitler, et al., 2007)	105	OSN
<b>TOTAL</b>	<b>0<sup>a</sup></b>	<b>0<sup>b</sup></b>	<b>1<sup>c</sup></b>	<b>105<sup>d</sup></b>	

\* OSN: necessità di ulteriori studi; a) numero degli studi che non hanno rilevato effetti benefici; b) numero totale dei soggetti inclusi negli studi che non hanno riportato benefici; c) numero degli studi che hanno rilevato effetti benefici; d) numero totale dei soggetti inclusi negli studi che hanno riportato benefici

Legenda: MMPs (Mealloproteinasi); ILs (Interleuchine 1 $\beta$  e 8); CRP (Proteina C Reattiva); VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1); ICAM (Intercellular Cell Adhesion Molecule-1); IL-6 (Interleuchina-6); NO (Ossido Nitrico); IL-10 (Interleuchina-10); MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1); HAQ-DI (Health Assessment Questionnaire-Disability Index)



**Tabella 5.6** – Dati epidemiologici relativi alla *Olea europea* L.: olio di oliva

	Nessun beneficio		Beneficio		Commenti Efficacia
	N° studi	N° partecipanti	N° studi	N° partecipanti	
<b>Biomarkers</b>					
VCAM-1			2 (Salas-Salvado, et al., 2008);(Serrano-Martinez, et al., 2005)	796	OSN*
ICAM-1	1 (Salas-Salvado, et al., 2008)	772			OSN
IL-6	1 (Salas-Salvado, et al., 2008)	772			OSN
CRP	1 (Salas-Salvado, et al., 2008)	772	1(Esmailzadeh and Azadbakht, 2008)	486	OSN
TNF $\alpha$			2 (Serrano-Martinez, et al., 2005);(Esmailzadeh and Azadbakht, 2008)	510	OSN
sICAM-1			1 (Esmailzadeh and Azadbakht, 2008)	486	OSN
<b>TOTAL</b>	<b>1</b>	<b>772</b>	<b>3</b>	<b>1282</b>	
<b>Hard end-points</b>					
Artrite reumatoide	0	0	2 (Linos, et al., 1991);(Linos, et al., 1999)	638	OSN
<b>TOTAL</b>	<b>0<sup>a</sup></b>	<b>0<sup>b</sup></b>	<b>2<sup>c</sup></b>	<b>638<sup>d</sup></b>	

\* OSN: necessità di ulteriori studi; a) numero degli studi che non hanno rilevato effetti benefici; b) numero totale dei soggetti inclusi negli studi che non hanno riportato benefici; c) numero degli studi che hanno rilevato effetti benefici; d) numero totale dei soggetti inclusi negli studi che hanno riportato benefici

Legenda: VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1); ICAM (Intercellular Cell Adhesion Molecule-1); IL-6 (Interleuchina-6); CRP (Proteina C Reattiva); TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ); sICAM (soluble Intercellular Cell Adhesion Molecule-1)

## 5.6 *Urtica dioica* L.

Nella Farmacopea elvetica e nelle monografie dell'ESCOP è descritto l'uso delle foglie, dei fiori, dei rizomi e delle radici di tale pianta negli stati infiammatori associati alle patologie osteo-articolari. Applicando la metodologia di ricerca descritta nella sezione "Metodi", sono state trovate quattro pubblicazioni, ma solo tre presentavano i requisiti richiesti per l'inclusione (Tabella 5.6). Gli studi presentano un'elevata eterogeneità in quanto utilizzano parti diverse della pianta: in uno è descritto l'uso delle foglie, uno dell'estratto di fiori essiccato e il terzo, infine, un preparazione commerciale (Phytalgic®) in cui l'*Urtica dioica* L. (la parte della pianta non è specificata) è in associazione con olio di pesce, zinco e vitamina E.

Solo nello studio condotto da Chrubasik et al., (1997), sono stati misurati i livelli di biomarkers infiammatori specifici, ovvero della proteina C reattiva, marcatore infiammatorio aspecifico. In particolare, è stato valutato l'effetto di un estratto di foglie di *Urtica dioica* L. (50 mg, in associazione con 50 mg di diclofenac), rispetto al diclofenac (100 mg) nella riduzione dello *status* infiammatorio e della sintomatologia dolorosa in pazienti affetti da patologie osteoarticolari. Al termine dello studio (due settimane), l'estratto di *U. dioica* si è mostrato non inferiore al diclofenac nella riduzione dei livelli di CRP ( $p = 0.82$ ). Anche per la risposta al dolore tramite il WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index) test e per il livello di disabilità valutato dai partecipanti è stato riportato un miglioramento del 70% in entrambi i trattamenti. Anche nello studio di Jacquet et al. (2009) è stato evidenziato un miglioramento dei parametri qualitativi come la risposta al dolore tramite WOMAC test e una riduzione del 50% dell'uso di farmaci anti-infiammatori non steroidei (NSAIDs), in seguito ad assunzione di Phytalgic® in 81 pazienti affetti da artrite acuta.

Infine, una risposta positiva è stata osservata in pazienti affetti da patologia rinitica (Mittman, 1990). Nonostante questi dati indichino un possibile effetto benefico della pianta in diverse patologie associate all'infiammazione, la scarsità del numero di studi non consente di trarre conclusioni definitive e sottolinea la necessità di ulteriori studi.

**Tabella 5.7** - Studi clinici relativi all' *Urtica dioica* L.

	Nessun beneficio		Beneficio		Commenti Efficacia
	N° studi	N° partecipanti	N° studi	N° partecipanti	
<b><i>Biomarkers</i></b>					
CRP	1 (Chrubasik et al., 1997)	36			OSN*
<b>TOTAL</b>	<b>1<sup>a</sup></b>	<b>36<sup>b</sup></b>	<b>0<sup>c</sup></b>	<b>0<sup>d</sup></b>	
<b><i>Hard end-points</i></b>					
Miglioramento della mobilità nell'artrite	1 (Chrubasik et al., 1997)	36			
Riduzione dell'assunzione di farmaci antidolorifici			1 (Jacquet, et al., 2009)	81	OSN
Dolore (WOMAC test)	1 (Chrubasik et al., 1997)	36	1 (Jacquet, et al., 2009)	81	OSN
Valutazione generale della sintomatologia (rinite)			1 (Mittman, 1990)	69	OSN
<b>TOTAL</b>	<b>1<sup>a</sup></b>	<b>36<sup>b</sup></b>	<b>2<sup>c</sup></b>	<b>150<sup>d</sup></b>	

\* OSN: necessità di ulteriori studi; a) numero degli studi che non hanno rilevato effetti benefici; b) numero totale dei soggetti inclusi negli studi che non hanno riportato benefici; c) numero degli studi che hanno rilevato effetti benefici; d) numero totale dei soggetti inclusi negli studi che hanno riportato benefici

Legenda: CRP (Proteina C Reattiva)

### 5.7 *Harpagophytum procumbens* L.

Di questa pianta, conosciuta anche come artiglio del diavolo, la droga è costituita dalle radici secondarie o tuberi, utilizzata per le sue proprietà anti-infiammatorie a livello osteo-articolare attribuibili al glicoside arpagoside. Per via orale, l'artiglio del diavolo è stato studiato principalmente nelle patologie croniche come l'artrite e lombalgie; in quest'ambito, la ricerca in letteratura e l'applicazione dei criteri di inclusione/esclusione ha portato alla selezione di 6 studi (Tabella 5.8). Un solo studio (n=34) (Moussard et al., 1992) ha valutato l'effetto della pianta (estratto titolato al 3% di glucoiridoidi), rispetto al placebo, su biomarkers infiammatori specifici (Prostaglandina E2, Trombossano, 6-cheto-prostaglandina-F-1 $\alpha$  e Leucotriene B4), non riportando significativi effetti positivi, facendo ipotizzare un meccanismo d'azione differente dall'inibizione della biosintesi di prostanoidi. Infatti, gli studi hanno evidenziato comunque un miglioramento nella sintomatologia delle patologie osteoarticolari.

In particolare, in questi studi (n=5) tutti i soggetti inclusi (n=502) hanno riportato un effetto benefico in termini di riduzione del dolore nell'osteoartrite, dolore cronico nelle lombalgie, riduzione dell'uso di anti-infiammatori non steroidei. In tali studi, sono state utilizzate formulazioni in capsule o compresse contenenti estratti secchi di *H. procumbens*, il cui dosaggio giornaliero risultava compreso tra i 60 e i 2610 mg (Tabella 5.9). Tuttavia, due revisioni sistematiche di studi clinici randomizzati (Gagnier et al., 2006 ; Gagnier et al., 2007), hanno riportato risultati contrastanti tra loro in termini di effetti benefici correlati all'uso della pianta. Nonostante la lunga tradizione d'uso dell'*H. procumbens* nelle zone meridionali dell'Africa nei disturbi di tipo infiammatorio, risulta evidente, come nel caso della *Matricaria recutita*, la necessità di ulteriori studi.

**Tabella 5.8** - Studi relativi all'*Harpagophytum procumbens* L.

	Nessun beneficio		Beneficio		Commenti
	N° studi	N° partecipanti	N° studi	N° partecipanti	Efficacia
<b><i>Biomarkers</i></b>					
PGE2	1 (Moussard, et al., 1992)	34			OSN*
Trombossano	1 (Moussard, et al., 1992)	34			OSN
6-keto-PGF1- $\alpha$	1 (Moussard, et al., 1992)	34			OSN
Leucotriene B4 (LTB4)	1 (Moussard, et al., 1992)	34			OSN
<b>TOTAL</b>	<b>1<sup>a</sup></b>	<b>34<sup>b</sup></b>	<b>0<sup>c</sup></b>	<b>0<sup>d</sup></b>	
<b><i>Hard end-points</i></b>					
Dolore associate ad osteoartrite del ginocchio			1 (Chantre, et al., 2000)#	122	OSN
Disabilità associate ad osteoartrite del ginocchio			1 (Chantre, et al., 2000)#	122	OSN
Dolore associate a lombalgia cronica			4 (Chrubasik S., et al., 1996);(Chrubasik J. E., et al., 1999);(Chrubasik S., et al., 2003);(Chrubasik S., et al., 2005)	380	SI
Riduzione dell'assunzione di farmaci anti-infiammatori non steroidei (NSAIDs)			1 (Chantre, et al., 2000)#	122	OSN
<b>TOTAL</b>	<b>0<sup>a</sup></b>	<b>0<sup>b</sup></b>	<b>5<sup>c</sup></b>	<b>502<sup>d</sup></b>	

\* OSN: necessità di ulteriori studi; a) numero degli studi che non hanno rilevato effetti benefici; b) numero totale dei soggetti inclusi negli studi che non hanno riportato benefici; c) numero degli studi che hanno rilevato effetti benefici; d) numero totale dei soggetti inclusi negli studi che hanno riportato benefici

Legenda: PGE2 (Prostaglandina E2); 6-keto-PGF1- $\alpha$  (6-keto-prostaglandina-F1- $\alpha$ )

**Tabella 5.9** – Preparazioni utilizzate, principi attivi e consumo giornaliero utilizzati negli studi relativi all' *Harpagophytum procumbens* L.

<b>Riferimento bibliografico</b>	<b>Preparazione</b>	<b>Principi attivi</b>	<b>Assunzione giornaliera</b>
(Chrubasik J. E., et al., 1999)	Comprese (ciascuna contenente 200 mg di estratto di <i>Harpagophytum procumbens</i> )	Arpagoside (17 mg/compressa)	600 e 1200 mg/die
(Chrubasik S., et al., 1996)	Comprese contenenti un estratto di <i>Harpagophytum procumbens</i>	Arpagoside	6 g/die (corrispondente a 50 mg arpagoside)
(Chrubasik S., et al., 2003)	Capsule (400 mg ciascuna) contenenti un estratto di <i>Harpagophytum procumbens</i>	Arpagoside	60 mg arpagoside/die
(Chrubasik S., et al., 2005)	Capsule (400 mg ciascuna) contenenti un estratto di <i>Harpagophytum procumbens</i>	Arpagoside	60 mg arpagoside/die
(Chantre, et al., 2000)	Capsules contenenti <i>Harpagophytum procumbens</i> in polvere (Harpadol®)	Iridoidi glicosidici totali	2610 mg/die
(Moussard, et al., 1992)	Capsule (500 mg ciascuna) contenenti <i>Harpagophytum procumbens</i> in polvere	3% degli glicoiridoidi totali	2 g/die

NR=non riportato

## **5.8 *Curcuma longa* L.**

La curcuma deriva dai rizomi essiccati della *Curcuma longa* L., ed è utilizzata principalmente per i disturbi digestivi di varia natura e per le disfunzioni biliari. La maggior parte degli studi selezionati sono stati effettuati utilizzando estratti ricchi in curcuminoide o curcumina, che sono considerati i principi attivi della curcuma. Sono stati inclusi in totale nove studi (Tabella 5.10), nei quali la curcuma è stata utilizzata da sola o in associazione con la *Boswellia serrata* Roxb. La composizione e le formulazioni utilizzate negli studi sono descritti in Tabella 5.11. In generale, nella maggior parte dei casi (n=5) sono state utilizzate preparazioni standardizzate che riportano anche il contenuto dei principi attivi e in un solo caso (Hamblin et al., 2008) l'estratto idroalcolico. Il dosaggio giornaliero è piuttosto variabile, compreso tra i 50 e i 2000 mg/die. Quattro studi hanno valutato l'effetto della curcuma sui biomarkers infiammatori e hanno evidenziato l'effetto positivo nella riduzione di TNF, IL-6, ossido nitrico, LTC<sub>4</sub> e MDA. Al contrario, i valori di ESR (Erythrocyte Sedimentation Rate) non hanno subito variazioni in seguito all'assunzione di curcuma (Kulkarni et al., 1991).

Nei paragrafi successivi sono descritti i risultati relativi agli effetti della *C. longa* sui principali biomarkers infiammatori.

### **5.8.1 Malondialdeide (MDA)**

L'effetto della curcuma sull'MDA è stato misurato in differenti quadri patologici quali l'asma bronchiale (Houssen et al., 2010), il diabete di tipo II (Usharani et al., 2008) e la pancreatite cronica (Durgaprasad et al., 2005) e valutato positivamente. Nello studio di Houssen et al. (2010) i livelli di MDA sono stati significativamente ridotti (179.77 nmol/L prima del trattamento vs 78.96 nmol/L al termine dello studio,  $p < 0.001$ ) nei pazienti che avevano assunto 3 capsule/die contenenti *C. longa* (2.2% di curcumina), rispetto al placebo (170.36 nmol/L prima del trattamento vs 268 nmol/L al termine dello



studio). I più elevati livelli di MDA all'inizio dello studio sono dovuti al fatto che nella patologia asmatica i livelli di specie reattive dell'ossigeno sono generalmente più elevati rispetto ai soggetti sani; ciò si traduce in più elevati prodotti di perossidazione lipidica (MDA) che svolgono un ruolo di attivazione delle fosfolipasi e della proteina chinasi C. La riduzione dei livelli di MDA nel gruppo trattato è dovuta in gran parte all'attività antiossidante della curcuma. Tuttavia, occorre sottolineare che, oltre alla curcuma, le capsule del gruppo trattato contenevano anche *Boswellia carterii* (37.5% di acido boswellico) ed un estratto di *Glycyrrhiza glabra* (6.5% glicirritina), che possono aver contribuito all'azione scavenger della curcuma sui radicali liberi.

Un effetto positivo della sola curcuma è stato valutato nella patologia diabetica, nello studio condotto da Usharani et al. (2008). Nel diabete di tipo II, infatti, i livelli di MDA risultano generalmente più elevati a causa dell'ossidazione proteica e della formazione di prodotti di glicazione a livello endoteliale. Nei pazienti che avevano assunto l'estratto di curcuma (standardizzato in curcumina, demetossicurcumina, e bis-demetossicurcumina) è stata evidenziata una significativa riduzione dei livelli plasmatici di MDA ( $p < 0.001$ ) rispetto al placebo. Simili risultati sono stati riscontrati nello studio di Durgaprasad et al. (2005), nel quale gli effetti della *C. longa* (500 mg/die) sono stati valutati, in confronto con placebo, in pazienti affetti da pancreatite cronica, patologia associata ad un intenso stress ossidativo e a sintomatologia dolorosa.

### **5.8.2 Leucotriene C<sub>4</sub> (LCT<sub>4</sub>)**

Elevati livelli di leucotriene C<sub>4</sub> è generalmente sono generalmente presenti nel plasma di soggetti affetti da patologie respiratorie croniche (come l'asma), in quanto prodotti dal metabolismo dell'acido arachidonico da parte di citochine infiammatorie a loro volte prodotte durante la manifestazione della sintomatologia patologica. Nello studio di Houssen et al. (2010) una significativa riduzione dei livelli del leucotriene C<sub>4</sub> è stato evidenziato nel gruppo che aveva ricevuto l'estratto di curcuma (6.53 ng/mL prima del

trattamento vs 1.31 ng/mL al termine dello studio,  $p < 0.001$ ). Nonostante la pianta abbia un'elevata attività antiossidante, gli autori hanno ipotizzato che l'effetto benefico sia da attribuire principalmente alla *B. serrata* (in particolare all'acido boswellico), poiché in grado di interferire con la traslocazione dell'enzima 5-lipossigenasi, responsabile della formazione del leucotriene C4, e alla *G. glabra*, in grado di aumentare la produzione di cortisolo.

### **5.8.3 Ossido Nitrico (NO)**

L'effetto della curcuma sui livelli di NO è stato valutato solo dallo studio di Houssen et al. (2010). Tali livelli sono stati significativamente nel gruppo trattato (50.04  $\mu\text{mol/L}$  all'inizio del trattamento vs 30.65  $\mu\text{mol/L}$  al termine dello studio,  $p < 0.001$ ). Secondo gli autori, tale effetto è da attribuire alla capacità della curcuma di ridurre la produzione di NO (e di conseguenza, dei suoi radicali), grazie all'inibizione dell'espressione della NO sintasi e della trascrizione di NF-kB.

### **5.8.4 Tumor Necrosis Factor-alfa (TNF- $\alpha$ )**

L'effetto sul TNF- $\alpha$  è stato valutato in un solo studio (Usharani et al. 1991), nel quale la *C. longa* (estratto) è stata confrontata con l'atorvastatina nella riduzione dei parametri infiammatori associati al diabete di tipo II. Al termine dello studio (otto settimane), essa è risultata non inferiore all'atorvastatina. Tuttavia, gli autori hanno concluso che tale effetto deve ancora essere verificato a lungo termine.

### **5.8.5 Interleuchina-6 (IL-6)**

Anche questo biomarker è stato valutato solo nello studio di Usharani et al. (1991), confermando quanto precedentemente osservato per il TNF- $\alpha$ .

Per quanto riguarda gli hard-end point, un totale di 256 soggetti (n=5) ha mostrato risultati positivi (in particolare nella riduzione del dolore, dell'edema e nell'ulcera gastroduodenale) contro 213 (n=4) che invece non hanno evidenziato alcun beneficio in seguito al trattamento. Anche per la curcuma, è possibile concludere che, nonostante i dati raccolti siano promettenti nella riduzione dei parametri infiammatori associati ad alcune patologie croniche come l'asma e il diabete di tipo II, il numero di studi è ancora insufficiente per supportare le sue proprietà anti-infiammatorie. Tuttavia, potrebbe essere utile lo sviluppo di modelli alternativi, *in vitro* o *ex vivo*, che possano rappresentare le condizioni fisiologiche che si verificano *in vivo*.

**Tabella 5.10** – Studi relativi alla *Curcuma longa* L.

	Nessun beneficio		Beneficio		Commenti Efficacia
	N° studi	N° partecipanti	N° studi	N° partecipanti	
<b><i>Biomarkers</i></b>					
MDA			3 (Durgaprasad, et al., 2005);(Houssen, et al., 2010); (Usharani, et al., 2008)	155	SI
Leucotriene C <sub>4</sub>			1 (Houssen, et al., 2010)	63	OSN*
NO			1 (Houssen, et al., 2010)	63	OSN
ESR (erythrocyte sedimentation rate)	1 (Kulkarni, et al., 1991)	42			OSN
TNF- $\alpha$			1 (Usharani, et al., 2008)	72	OSN
IL-6			1 (Usharani, et al., 2008)	72	OSN
<b>TOTAL</b>	<b>1<sup>a</sup></b>	<b>42<sup>b</sup></b>	<b>3<sup>c</sup></b>	<b>155<sup>d</sup></b>	
<b><i>Hard end-points</i></b>					
Dolore	1 (Durgaprasad, et al., 2005)	20			SI
CAI (clinical index activity)					OSN
<i>Lichen planus</i> orale	1 (Chainani-Wu, et al., 2007)	33			OSN
EI (indice endoscopico)			1 (Hanai, et al., 2006)	89	OSN
Dolorabilità			1 (Satoskar, 1986)	45	OSN
Edema spinale			1 (Satoskar, 1986)	45	OSN
Punteggio relative alla disabilità			1 (Kulkarni, et al., 1991)	42	OSN

	Nessun beneficio		Beneficio		Commenti Efficacia
	N° studi	N° partecipanti	N° studi	N° partecipanti	
<b>Hard end-points</b>					
Punteggio relative alla mobilità articolare	1 (Kulkarni, et al., 1991)	42			OSN
Ulcera duodenale	1 (Van Dau, et al., 1998)	118			OSN
Ulcera gastrica			1 (Kositchaiwat, et al., 1993)	60	OSN
<b>TOTAL</b>	<b>4<sup>a</sup></b>	<b>213<sup>b</sup></b>	<b>5<sup>c</sup></b>	<b>256<sup>d</sup></b>	

\* OSN: necessità di ulteriori studi; a) numero degli studi che non hanno rilevato effetti benefici; b) numero totale dei soggetti inclusi negli studi che non hanno riportato benefici; c) numero degli studi che hanno rilevato effetti benefici; d) numero totale dei soggetti inclusi negli studi che hanno riportato benefici

Legenda: MDA (Malondialdeide); NO (Ossido Nitrico); TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor-alfa); IL-6 (Interleuchina-6)

**Tabella 5.11** – Preparazioni utilizzate, principi attivi e dosaggio giornaliero utilizzati negli studi relativi alla *Curcuma longa* L.

<b>Riferimento bibliografico</b>	<b>Preparazione</b>	<b>Principi attivi</b>	<b>Dosaggio giornaliero</b>
(Chainani-Wu, et al., 2007)	Capsule contenenti estratto standardizzato di curcuma	curcuminoidi (95%) contenenti curcumina (70-80%), demetossicurcumina, e bis-demetossicurcumina	2 g/die
(Durgaprasad, et al., 2005)	Capsule (contenenti ciascuna 500 mg di estratto di <i>Curcuma longa</i> )	curcumina (95%)	1500 mg/die
(Hanai, et al., 2006)	Compresse contenenti curcumina	curcumina	2 g/die
(Usharani, et al., 2008)	Capsule NCB-02 (formulazione standardizzata di curcuminoidi)	Preparazione standardizzata di curcuminoidi C3 (curcumina, demetossicurcumina e bis-demetossicurcumina)	600 mg/die
(Kositchaiwat, et al., 1993)	Capsule (250 mg ciascuna) contenenti polvere di <i>Curcuma longa</i>	NR	250 mg/die
(Hamblin, et al., 2008)	Tintura 1:5 a base di <i>Curcuma longa</i>	NR	930 mg/die
(Satoskar, 1986)	Capsule contenenti curcumina	curcumina	400 mg/day
(Van Dau, et al., 1998)	Compresse contenenti polvere di <i>Curcuma longa</i>	NR	2 g/day
(Houssen, et al., 2010)	Capsule contenenti estratti di <i>Boswellia carterii</i> e <i>Curcuma longa</i>	Acido boswellico, curcumina	450 mg acido boswellico/die; 45 mg curcumina/die
(Kulkarni, et al., 1991)	Capsule	NR	<i>Boswellia serrata</i> : 100 mg/die; <i>Curcuma longa</i> : 50 mg/die

NR= non riportato

## **5.9 *Boswellia serrata* Roxb. Ex Colebr.**

La droga di questa pianta, denominata anche *salai guggal*, è l'oleoresina, utilizzata anche nella medicina Ayurvedica per le patologie degenerative articolari. La ricerca bibliografica ha portato alla selezione di sei pubblicazioni che hanno riportato un effetto positivo della *Boswellia serrata* su numerosi biomarkers quali Ossido Nitrico (NO), Malondialdeide (MDA), Leucotriene C<sub>4</sub> (LCT<sub>4</sub>), metalloproteinasi-3, conta eosinofila e livello d'infiltrazione di leucociti (Tabella 5.12); al contrario, risultati contrastanti sono stati osservati per i valori di ESR (Erythrocyte Sedimentation Rate) e numero di leucociti. Le preparazioni utilizzate negli studi sono elencate in Tabella 5.11 e 5.13. Indubbiamente, diversamente da quanto abbiamo osservato per altre piante, negli studi sono state utilizzate perlopiù preparazioni standardizzate per le quali è stato indicato anche il titolo dei principi attivi contenuti. Ciò riveste particolare importanza poiché consente di poter stabilire una correlazione tra assunzione della pianta ed effetto benefico oltre a permettere un confronto tra i diversi studi. Il dosaggio giornaliero utilizzato è risultato compreso tra 50 e 1050 mg/die. In linea generale quindi, il numero di soggetti che ha riportato effetti benefici risulta essere molto più elevato rispetto al numero di coloro che non hanno rilevato alcun beneficio (308 vs 72). Nei paragrafi successivi sono riportati i risultati relativi ai singoli biomarkers infiammatori valutati negli studi.

### **5.9.1 Metalloproteinasi-3 (MMP-3)**

Le metalloproteinasi (MMPs) sono una famiglia di endopeptidasi in grado di degradare i componenti della matrice extracellulare. Esse sono suddivise in differenti classi a seconda del tipo di substrato e della funzione fisiologica. Le MMP-3, in particolare, sono coinvolte nell'attivazione del plasminogeno e della migrazione macrofagica durante i processi infiammatori (Golias et al., 2006). Elevati livelli di MMP-3 sono presenti, infatti, in patologie croniche

quali l'artrite reumatoide e il diabete. In letteratura, solo uno studio (Sengupta et al., 2008) ha valutato l'effetto della *Boswellia serrata* su tale parametro infiammatorio in 65 pazienti affetti da osteoartrite del ginocchio. In tale studio, è stato utilizzato un estratto standardizzato della pianta (5-Loxin® contenente 30% acido 3-O-acetil-11-cheto-beta boswellico) in differenti quantità (100 mg e 250 mg) rispetto al placebo. Al termine dello studio è stata evidenziata, rispetto al placebo, una riduzione dei livelli di MMP-3 in entrambi i gruppi trattati ( $p < 0.0001$ ). Seppur con maggiore evidenza in coloro che avevano assunto il dosaggio più elevato (926.9 ng/mL prima del trattamento vs 167.5 ng/mL al termine dello studio), suggerendo una riduzione dell'espressione di MMP-3 da parte dell'acido boswellico.

L'effetto della *Boswellia serrata* sull'MDA, ossido nitrico e leucotriene C4 sono stati discussi nei paragrafi 5.8.1-5.8.3.

Per quanto riguarda gli hard end-points (in particolare il dolore associato alle patologie articolari), 443 soggetti hanno riportato benefici relativamente agli contro gli 82 che non hanno, invece, mostrato miglioramenti negli stati fisiologici, oggetto di studio, associati all'infiammazione. Tali dati sono in accordo con quelli riportati da una revisione sistematica condotta da Ernst et al. (2008), il quale conclude che sebbene la *B. serrata* abbia fornito risultati promettenti nell'area infiammatoria, essi non siano ancora del tutto convincenti.



**Tabella 5.12** – Studi relativi alla *Boswellia serrata* Roxb.

	Nessun beneficio		Beneficio		Commenti
	N° studi	N° partecipanti	N° studi	N° partecipanti	Efficacia
<b><i>Biomarkers</i></b>					
Infiltrazione leucocitica			1 (Gupta, et al., 1997)	50	OSN*
Numero di leucociti	1 (Gupta, et al., 2001)	30	1 (Gupta, et al., 1997)	50	OSN
Eosinofili			2 (Gupta, et al., 1998);(Gupta, et al., 2001)	70	OSN
ESR (erythrocyte sedimentation rate)	1 (Kulkarni, et al., 1991)	42	2 (Gupta, et al., 1998);(Usha and Naidu, 2006a)	100	OSN
Leucotriene C <sub>4</sub>			1 (Houssen, et al., 2010)	63	OSN
MDA			1 (Houssen, et al., 2010)	63	OSN
NO			1 (Houssen, et al., 2010)	63	OSN
MMP-3			(Sengupta , et al., 2008)	65	OSN
<b>TOTAL</b>	<b>2<sup>a</sup></b>	<b>72<sup>b</sup></b>	<b>6<sup>c</sup></b>	<b>308<sup>d</sup></b>	
<b><i>Hard end-points</i></b>					
Dolore			7 (Usha and Naidu, 2006b);(Kulkarni, et al., 1991);(Gupta, et al., 1997);(Sengupta, et al., 2008);(Sengupta Krishanu, et al., 2010);(Sontakke, et al., 2007);(Kimmatkar, et al., 2003)	353	SI
Ulcerazioni			1 (Gupta, et al., 1997)	50	OSN
Caratteristiche delle evacuazioni			1 (Gupta, et al., 2001)	30	OSN

	Nessun beneficio		Beneficio		Commenti Efficacia
	N° studi	N° partecipanti	N° studi	N° partecipanti	
<b>Hard end-points</b>					
Punteggio relativo al grado di disabilità			1 (Kulkarni, et al., 1991)	42	OSN
Punteggio relativo alla mobilità articolare	1 (Kulkarni, et al., 1991)	42	1 (Usha and Naidu, 2006a)	60	OSN
Circonferenza del ginocchio	1 (Usha and Naidu, 2006b)	40			OSN
<b>TOTAL</b>	<b>2<sup>a</sup></b>	<b>82<sup>b</sup></b>	<b>9<sup>c</sup></b>	<b>443<sup>d</sup></b>	

\* OSN: necessità di ulteriori studi; a) numero degli studi che non hanno rilevato effetti benefici; b) numero totale dei soggetti inclusi negli studi che non hanno riportato benefici; c) numero degli studi che hanno rilevato effetti benefici; d) numero totale dei soggetti inclusi negli studi che hanno riportato benefici

Legenda: MDA (Malondialdeide); NO (Ossido Nitrico); MMP-3 (Metalloproteinasi-3)

**Tabella 5.13** – Preparazioni utilizzate, principi attivi e dosaggio giornaliero utilizzati negli studi relativi alla *Boswellia serrata* Roxb.

<b>Riferimento bibliografico</b>	<b>Preparazione</b>	<b>Principi attivi</b>	<b>Dosaggio giornaliero</b>
(Sengupta K., et al., 2008)	5-Loxin®: capsule contenenti estratto di <i>Boswellia serrata</i>	30% Acido 3-O-acetil-11-cheto-beta boswellico	100 or 250 mg/day
(Sengupta Krishanu, et al., 2010)	Capsule contenenti estratto standardizzato di <i>Boswellia serrata</i>	5-Loxin®: 30% Acido 3-O-acetil-11-cheto-beta boswellico (AKBA). Aflapin®: estratto di <i>Boswellia serrata</i> arricchito con AKBA e olio non-volatile	5-Loxin®: 100 mg/day; Aflapin®: 100 mg/day.
(Sontakke, et al., 2007)	Capsule contenenti estratto standardizzato di <i>Boswellia serrata</i>	40% acidi boswellici totali. Acidi 11-cheto-beta boswellici (6.44%), acidi 3-O-acetil-beta boswellici (8.58%), acidi alfa boswellici (6.93%) e acidi 3-O-acetil alfa boswellici (1.853%).	999 mg/day
(Usha and Naidu, 2006a)	Capsule contenenti estratto standardizzato di <i>Boswellia serrata</i> in associazione con altri ingredient vegetali (Eazmov plus)	NR	50 mg/day
(Usha and Naidu, 2006b)	Capsule contenenti estratto standardizzato di <i>Boswellia serrata</i> in associazione con altri ingredient vegetali (Eazmov plus)	NR	50 mg/day

<b>Riferimento bibliografico</b>	<b>Preparazione</b>	<b>Principi attivi</b>	<b>Dosaggio giornaliero</b>
(Gupta, et al., 1997)	Capsule contenenti estratto in polvere di <i>Boswellia serrata</i>	Acido 11-cheto-beta boswellico (1.8% ), acido acetil 11-chetobeta boswellico (1.4%), acido acetil-beta- e beta boswellico (2%)	1050 mg/day
(Gupta, et al., 1998)	Capsule contenenti estratto in polvere di <i>Boswellia serrata</i> (300 mg ciascuna)	Acido 11-cheto-beta boswellico (0.63%), acido acetil 11-chetobeta boswellico (0.70%), acido acetil-beta- e beta boswellico (1.5%).	900 mg/day
(Gupta, et al., 2001)	Capsule contenenti estratto in polvere di <i>Boswellia serrata</i> (300 mg ciascuna)	Acido 11-cheto-beta boswellico (0.63%), acido acetil 11-chetobeta boswellico (0.70%), acido acetil-beta- e beta boswellico (1.5%).	900 mg/day
(Kimmatkar, et al., 2003)	Capsule contenenti estratto in polvere di <i>Boswellia serrata</i>	Estratto standardizzato di <i>Boswellia serrata</i> contenente 40% acidi boswellici totali. Principali componenti: acido 11-cheto-beta boswellico (6.44%), acido 3-O-acetil-11-cheto-beta boswellico (2%), acidi beta-boswellici (18.51%), acidi 3-O-acetil-beta boswellici (8.58%), acidi alpha boswellici (6.93%), e acidi 3-O-acetil-alfa boswellici	999 mg/day

NR=non riportato

## 5.10 Conclusioni

Lo scopo della revisione sistematica della letteratura è stato quello di valutare i dati relativi agli effetti benefici di 10 piante d'interesse nell'area infiammatoria, selezionate all'interno del progetto PlantLIBRA. Tali dati, infatti, costituiscono un primo passo nel fornire utili informazioni alle autorità regolatorie e alle aziende nelle decisioni o richieste riguardanti claims salutistici. Le principali condizioni nelle quali le piante trattate sono utilizzate includono l'osteoartrite, patologie gastrointestinali (pancreatite, colite ulcerosa, gastrite), diabete di tipo II e infiammazione associata a patologie cardiovascolari ed epatiche. I risultati ottenuti, seppure positivi, mostrano la necessità di ulteriori studi relativi alla *Vitis vinifera* L., *Matricaria recutita* L., *Olea europea* L., *Urtica dioica* L., *Harpagophytum procumbens* L. e *Boswellia serrata* L. Roxb.. Al contrario, la *Camellia sinensis* L. (in particolare il tè verde), nonostante numerosi studi in diverse aree ne riportino gli effetti benefici, non sembra avere effetti positivi nel ridurre le condizioni infiammatorie in patologie croniche come il diabete e il sindrome metabolica. Qualche evidenza positiva sembra invece emergere per quanto riguarda la riduzione dello stress ossidativo sia per il tè verde che per il tè nero. Simili osservazioni possono essere effettuate anche per la *Curcuma longa*, la quale, pur riducendo alcuni parametri infiammatori, non sembra apportare benefici in termini di miglioramento della sintomatologia associata all'infiammazione in patologie osteoarticolari. Oltre alla scarsità degli studi, i fattori principali che ostacolano la valutazione degli effetti benefici sono l'insufficiente caratterizzazione fitochimica degli estratti o della matrice vegetale e l'elevata eterogeneità delle posologie utilizzate negli studi. Inoltre, le piante sono state testate per verificare il loro effetto in differenti distretti corporei, cosa che rende difficile il loro confronto in termini di attività biologica. Un altro aspetto che occorre considerare nella valutazione dell'effetto benefico è l'effetto placebo, che spesso risulta essere indistinguibile da quello dei componenti attivi, soprattutto quando il protocollo dello studio prevede il solo uso di controlli positivi. Inoltre, è importante sottolineare che anche il metabolismo dei composti attivi andrebbe

considerato durante la stesura del disegno clinico e nella valutazione dei risultati, in quanto alcuni metaboliti possono rappresentare importanti biomarkers di esposizione associabili all'effetto benefico. Infine, anche l'analisi statistica dovrebbe essere considerata prioritaria nella valutazione della qualità scientifica dello studio.

Dall'analisi degli studi effettuata, è possibile concludere che sarebbe opportuno, in vista di ulteriori studi, includere un numero più elevato di soggetti e una popolazione maggiormente rappresentativa di quella reale, utilizzando preparazioni erboristiche ben caratterizzate e standardizzate. Tuttavia, occorre sottolineare la difficoltà oggettiva nell'effettuare studi nell'uomo che utilizzino integratori alimentari a base erboristica sia per quanto riguarda i costi sia per la complessità nella definizione dei parametri fisiologici. Da ciò, ne deriva l'importanza della ricerca e studio di modelli alternativi che possano mimare l'effetto biologico *in vivo* consentendo di ottenere dati significativi per eventuali claims salutistici.

## II PARTE – CARATTERIZZAZIONE FITOCHIMICA E ATTIVITA' BIOLOGICA DI ESTRATTI DI *Camellia sinensis* L.

Delle dieci piante scelte all'interno del progetto PlantLIBRA per l'attività anti-infiammatoria, la *Camellia sinensis* L. è la prima ad essere stata inclusa negli studi sperimentali condotti nel Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari. Considerati i risultati contrastanti circa l'attività anti-infiammatoria della *Camellia sinensis* L. e la necessità di ricercare modelli alternativi che mimino le condizioni *in vivo*, è stata studiata la capacità di differenti estratti acquosi di tè verde e nero (infusi) di inibire la trascrizione guidata da NF- $\kappa$ B in cellule epiteliali gastriche, valutando l'effetto del differente contenuto e composizione di principi attivi (dovuto ai processi di lavorazione del tè verde e nero) sull'attività anti-infiammatoria. A questo scopo, è stato inizialmente effettuato un primo screening di valutazione del contenuto totale di polifenoli nei differenti estratti tramite il saggio colorimetrico di Folin-Ciocalteu, seguito dalla quantificazione delle catechine tramite HPLC. Il contenuto di catechine è stato successivamente correlato all'attività biologica, ovvero all'inibizione della trascrizione guidata da NF- $\kappa$ B. e all'attività antiossidante. L'analisi quantitativa è stata effettuata anche dopo la scadenza dei campioni al fine di verificare l'eventuale grado di riduzione delle catechine e la perdita dell'attività biologica.

### 5.11 Determinazione del contenuto di polifenoli totali

#### 5.11.1 Retta di calibrazione

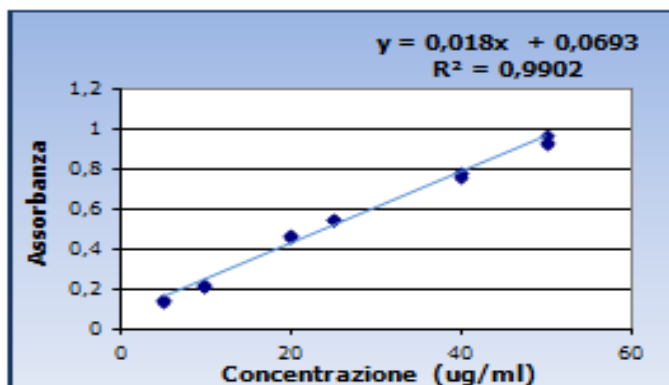
Innanzitutto è stata costruita la retta di calibrazione per i successivi dosaggi quantitativi. Le concentrazioni standard di acido gallico sono state quindi correlate alle letture spettrofotometriche ed integrate mediante regressione lineare.

Nella Tabella 5.14 sono riportate le concentrazioni delle soluzioni standard di acido gallico utilizzate per l'analisi spettrofotometrica e i valori di assorbanza corrispondenti, mentre la retta di calibrazione ottenuta è illustrata in Figura 5.2.

**Tabella 5.14** – Concentrazioni di acido gallico standard utilizzate e relativa assorbanza

Concentrazione (µg/mL)	Assorbanza
5	0,1448
5	0,1410
5	0,1431
10	0,2174
10	0,2163
10	0,2229
20	0,4765
20	0,4619
20	0,4753
25	0,5492
25	0,5526
25	0,5451
40	0,7624
40	0,7872
40	0,7828
50	0,9450
50	0,9331
50	0,9768

**Figura 5.2** – Retta di calibrazione per il dosaggio dei polifenoli totali



Il coefficiente di correlazione,  $R^2$ , vicino a 1 (0,9902), indica una risposta lineare ottimale per l'intervallo di concentrazioni considerate.

### 5.11.2 Contenuto di polifenoli totali nei campioni

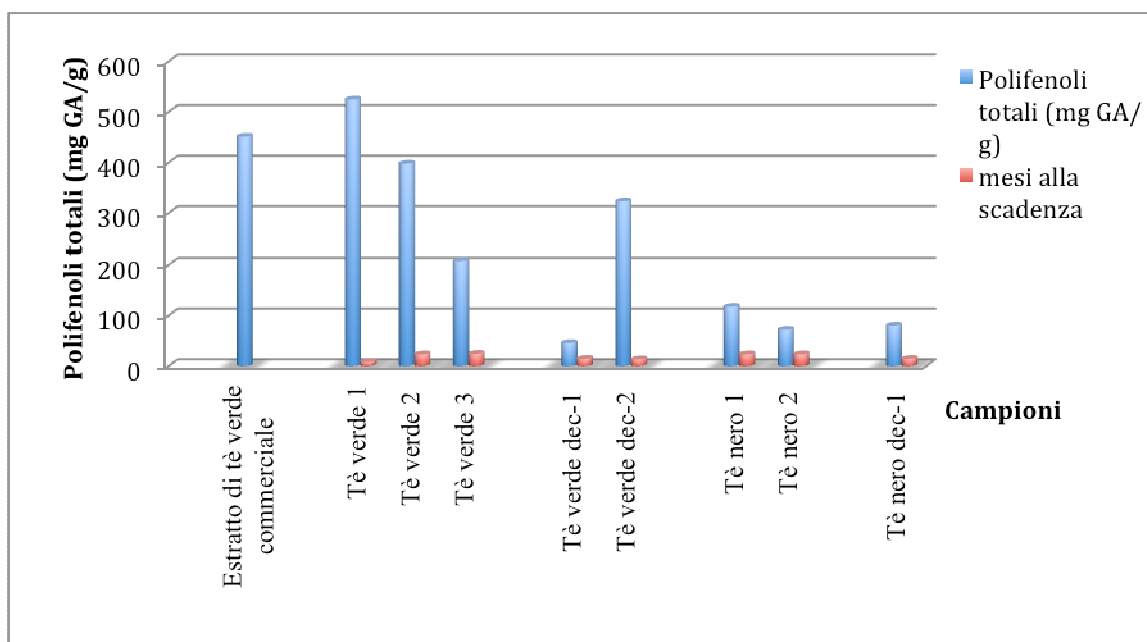
Sui campioni, allestiti come descritto nella sezione “Metodi”, è stata eseguita, in triplo, la reazione colorimetrica per la determinazione del contenuto totale di polifenoli. Effettuata la lettura dell'assorbanza e, utilizzando le rette di calibrazione, sono state calcolate le concentrazioni.

In Tabella 5.15 e in Figura 5.3 sono riportati i quantitativi medi ( $\pm$  DS), espressi in equivalenti di acido gallico (mg GA/mL), di polifenoli totali nei campioni (di differente marchio commerciale) analizzati e il rispettivo tempo alla scadenza (mesi).



**Tabella 5.15** - Contenuto di polifenoli totali e mesi alla scadenza dei campioni analizzati

Campione	Mesi alla scadenza	Contenuto di polifenoli totali (mg GA/g) (media ± DS)
Estratto di tè verde commerciale (GTE)	-	451.1 ± 6.97
Tè verde-1 (GTI-1)	8	524.38 ± 6.80
Tè verde-2 (GTI-2)	23	397.54 ± 1.32
Tè verde-3 (GTI-3)	24	207.58 ± 7.53
Tè verde decaffeinato-1 (GTID-1)	14	45.30 ± 1.41
Tè verde decaffeinato-2 (GTID-2)	13	323.08 ± 6.27
Tè nero-1 (BTI-1)	23	117.22 ± 0.44
Tè nero-2 (BTI-2)	23	71.72 ± 0.90
Tè nero decaffeinato-1 (BTID-1)	14	79.87 ± 0.60



**Figura 5.3** – Contenuto di polifenoli totali nei campioni analizzati

Il saggio di Folin-Ciocalteu, utilizzato per determinare il contenuto totale di polifenoli (TPC), è un test rapido che può essere utilizzato come primo screening nella caratterizzazione di una vasta gamma di campioni di origine naturale.

Il metodo, tuttavia, non è specifico, poiché molti composti si comportano da interferenti, reagendo con il reattivo e dando come risultato finale una concentrazione apparentemente più elevata (Prior et al., 2005).

Il tè, oltre alle catechine, contiene numerosi altri composti fenolici come acido gallico, quercetina e kempferolo, che contribuiscono a determinare il contenuto totale di polifenoli. Quest'ultimo, ingenerale, risulta maggiore nei tè verdi; ciò potrebbe essere dovuto alla maggiore quantità di catechine e altri composti fenolici presenti nel tè non fermentato rispetto a quello fermentato.

Nei campioni analizzati il contenuto di polifenoli totali è risultato, come atteso, più elevato nei campioni di tè verde rispetto a quelli di tè nero. In particolare, per i tè verdi, il contenuto fenolico è risultato, in ordine decrescente: tè verde 1 > tè verde commerciale > tè verde 2 > tè verde decaffeinato 2, > tè verde 3 > tè verde decaffeinato 1.

Il tè verde decaffeinato 1 presenta un contenuto di polifenoli molto basso, (45.30 mg GA/g), addirittura inferiore a quello relativo ai tè neri. Ciò potrebbe essere dovuto a diversi fattori, come l'origine, la coltivazione e la lavorazione delle foglie e il processo di decaffeinizzazione; purtroppo le informazioni sulla provenienza dei tè sono molto scarse e non è stato possibile determinare con esattezza le condizioni che hanno influito sul contenuto in componenti attivi. Tra i campioni di tè nero non è stata rilevata ampia variabilità: il contenuto fenolico è compreso tra 71.72 e 117.22 mg GA/g.

Per quanto riguarda il tempo alla scadenza, è possibile osservare che, in linea generale, non sembra essere presente una correlazione tra data di scadenza e il contenuto fenolico (Figura 5.2). Infatti, se si considerano i campioni di tè verde, il tè verde-1, pur essendo più vicino alla scadenza (8 mesi) rispetto agli altri campioni, presenta un contenuto fenolico più elevato. Similmente, il campione di tè verde decaffeinato 2 (tempo alla scadenza = 13 mesi) presenta un contenuto fenolico maggiore rispetto al tè verde 3 (tempo alla scadenza = 24 mesi). Per

quanto riguarda i tè neri, data la minore numerosità dei campioni, risulta difficile stabilire la presenza di una correlazione tra contenuto in polifenoli totali e il tempo alla scadenza; tuttavia, si può osservare che il tè nero 1 presenta un tempo alla scadenza e un contenuto fenolico maggiore (23 mesi e 117.22 mg GA/g, rispettivamente) rispetto al tè nero decaffeinato 1, più vicino alla scadenza (14 mesi) e con un contenuto di polifenoli inferiore (79.87 mg GA/g). Il tè nero 1 e il tè nero 2 presentano, invece, un quantitativo fenolico molto differente pur mancando, per entrambi, 23 mesi alla scadenza. Questi dati sottolineano, nuovamente, l'influenza dei fattori legati alla coltivazione, raccolta e conservazione sulla qualità delle foglie di partenza e, di conseguenza, sul contenuto di principi attivi.

## **5.12 Analisi cromatografica**

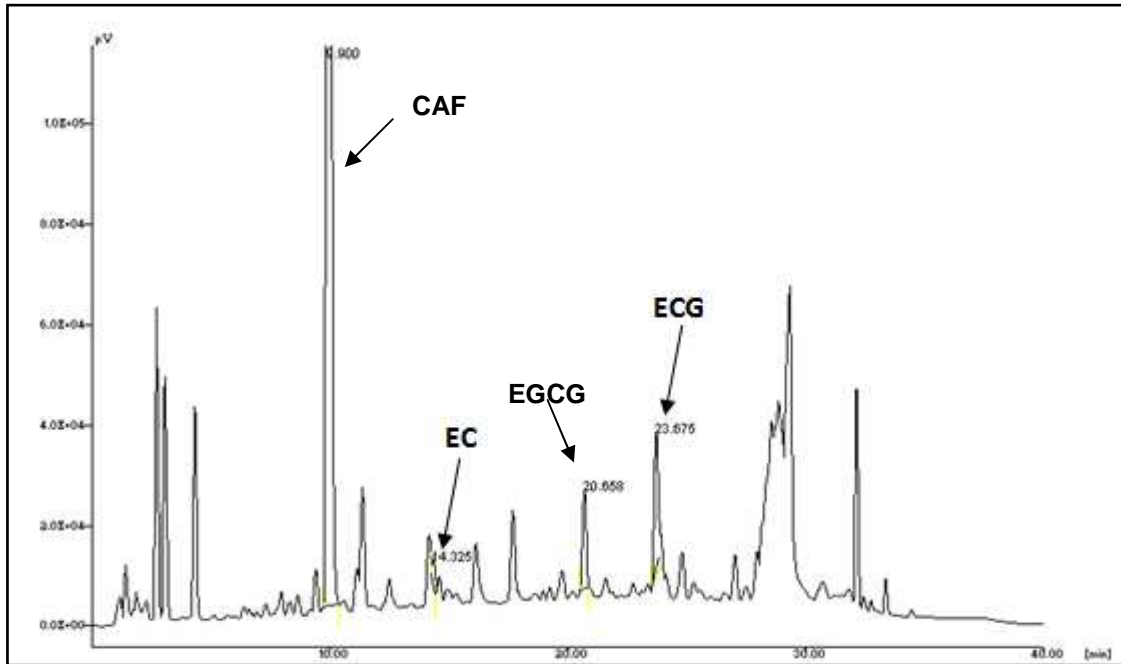
### **5.12.1 Messa a punto e dati di validazione del metodo in HPLC**

#### Separazione cromatografica ed idoneità del sistema

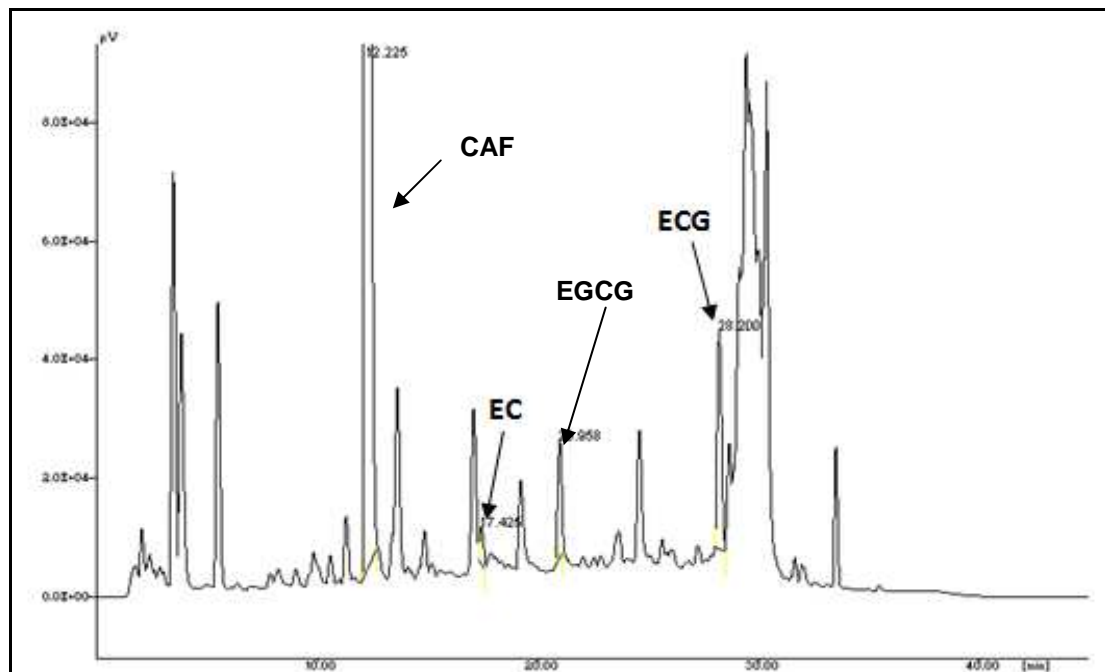
Per l'analisi cromatografica, come riportato nel capitolo "Metodi", sono stati utilizzati due gradienti diversi, uno per i tè verdi (gradiente 1) e uno per i tè neri (gradiente 2).

I tè neri, infatti, presentano un rapporto segnale/disturbo minore rispetto ai tè verdi, contenendo delle sostanze che interferiscono con le catechine; per questo motivo è stato da noi messo a punto un gradiente più adatto, in modo da ottimizzare la separazione e l'identificazione dei picchi.

Nelle Figure 5.4 e 5.5 sono illustrati i cromatogrammi relativi all'iniezione di un campione di tè nero, rispettivamente con l'utilizzo del gradiente 1 e del gradiente 2.



**Figura 5.4** - Cromatogramma relativo all'iniezione di un campione di estratto di tè nero ottenuto con il gradiente 1



**Figura 5.5** - Cromatogramma relativo all'iniezione di un campione di estratto di tè nero ottenuto con il gradiente 2

Come si evidenzia dai cromatogrammi, tramite l'utilizzo del gradiente 2 è stato possibile migliorare la separazione e identificazione delle sostanze oggetto del nostro studio.

Per costruire le rette di calibrazione sono state iniettate le soluzioni standard in triplo. A titolo rappresentativo, sono riportati i cromatogrammi relativi all'iniezione di una soluzione standard con concentrazione pari a 100 µg/mL, ottenuti con il gradiente 1 e 2, rispettivamente (Figure 5.6-5.7).

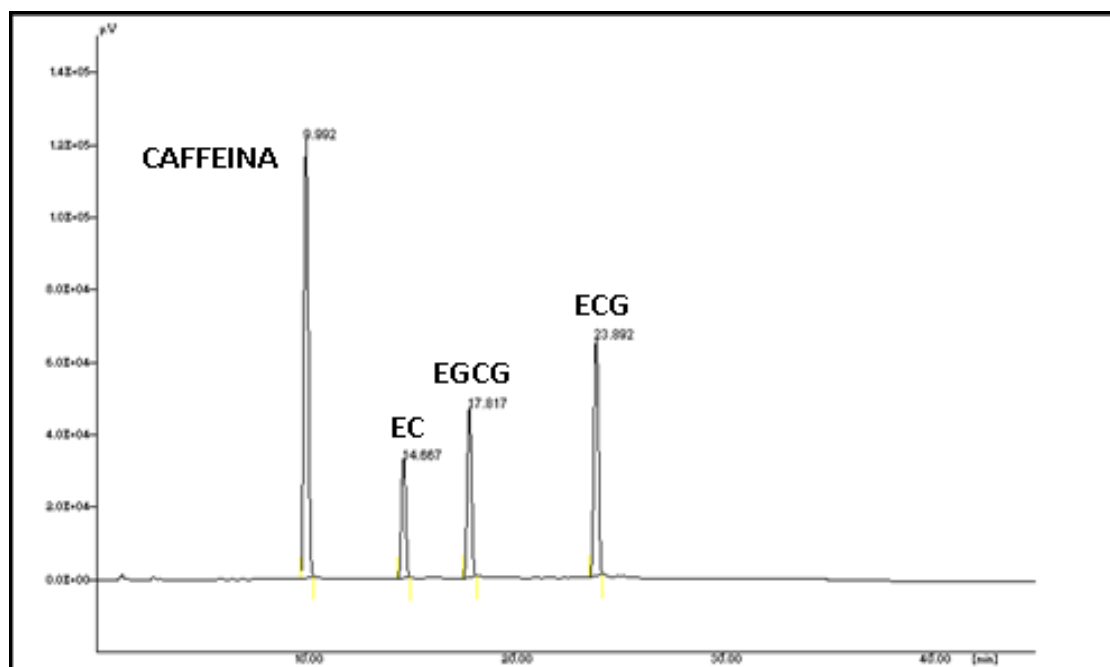
Nelle Tabelle 5.16 e 5.17 sono riportati a confronto i tempi di ritenzione ( $T_r$ ) a seconda del gradiente impiegato per l'analisi.

**Tab. 5.16** – Tempi di ritenzione degli standard ottenuti con il gradiente 1

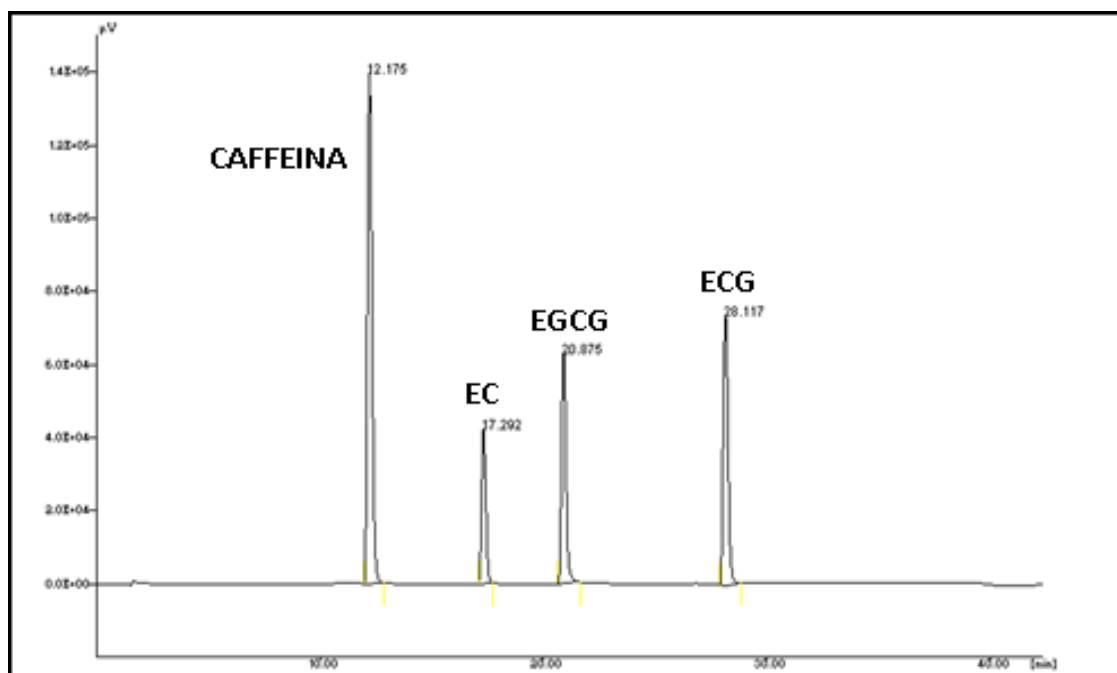
Campioni	$T_r$ (min)
Caffeina	10,3
Epicatechina	15,2
Epigallocatechina-3-gallato	18,1
Epicatechina gallato	23,2

**Tab. 5.17** – Tempi di ritenzione degli standard ottenuti con il gradiente 2

Campioni	$T_r$ (min)
Caffeina	13,1
Epicatechina	18,1
Epigallocatechina-3-gallato	21,2
Epicatechina gallato	30,9



**Figura 5.6** – Cromatogramma relativo all'iniezione di una miscela di standard (100 µg/mL ciascuno) ottenuto con il gradiente 1



**Figura 5.7** – Cromatogramma relativo all'iniezione di una miscela di standard (100 µg/mL ciascuno) ottenuto con il gradiente 2

Il sistema cromatografico è stato giornalmente verificato applicando un test di idoneità i cui risultati sono riportati in Tabella 5.18.

**Tabella 5.18** – Risultati del test di idoneità ottenuti durante l'analisi di campioni di tè verde (media di 3 determinazioni)

Analita	$T_r$ (min) (media±DS)	$K^{(1)}$ (media±DS)	$\alpha^{(2)}$ (media±DS)	Fattore di simmetria	N. di piatti teorici (N) (media±DS)
CAF	10.30 ± 0.01	6.2	1.12	1.098	112002
EGCG	18.34 ± 0.15	10.6	1.16	1.502	110009
EC	15.97 ± 0.02	9.8	1.14	1.109	126094
ECG	24.40 ± 0.03	15.2	1.03	1.193	211728

<sup>(1)</sup> Fattore di ritenzione ( $K$ ) =  $(T_r - T_0)/t_0$  dove  $T_r$  e  $t_0$  sono rispettivamente il tempo di ritenzione dei componenti del campione e del solvente.

<sup>(2)</sup> Fattore di separazione ( $\alpha$ ) =  $(T_{r2} - T_0)/(T_{r1} - T_0)$ , dove  $T_{r2}$  e  $T_{r1}$  sono i tempi di ritenzione di due picchi vicini.

Dai dati riportati in Tabella 5.18 si osserva che il sistema cromatografico utilizzato è risultato idoneo per la separazione e quantificazione degli analiti di interesse. Infatti, i picchi cromatografici presentano un'elevata riproducibilità nei tempi di ritenzione (CV% compreso tra 0.23 e 0.82%), il fattore di ritenzione ( $K^1$ ) risulta elevato, (compreso tra 9.8 e 10.6), indicando una distanza ideale tra picco cromatografico relativo al solvente e quello dell'analita; inoltre, la risoluzione di due picchi adiacenti e il fattore di simmetria vicino ad 1 ed il numero di piatti teorici maggiore di 2840 sono in accordo con le linee guida dell'FDA e con i dati di letteratura (FDA, 2001; Burana-osot e Yanpaisan, 2012).

### **Sensibilità**

I dati relativi alla sensibilità del metodo sono riportati nelle Tabelle 5.19 e 5.20.

Per tutte le catechine sono stati calcolati i Limiti di Determinazione (LOD) e i Limiti di Quantificazione (LOQ) utilizzando entrambi i gradienti.

**Tabella 5.19** - LOD degli analiti ottenuti tramite gradiente 1 e 2

<b>Analita</b>	<b>Gradiente 1</b>	<b>Gradiente 2</b>
<b>CAFFEINA</b>	0.60 µg/mL	0.60 µg/mL
<b>EC</b>	0.10 µg/ml	0.08 µg/ml
<b>EGCG</b>	0.08 µg/ml	0.07 µg/ml
<b>ECG</b>	0.03 µg/ml	0.03 µg/ml

**Tabella 5.20** - LOQ degli analiti ottenuti tramite gradiente 1 e 2

<b>Analita</b>	<b>Gradiente 1</b>	<b>Gradiente 2</b>
<b>CAFFEINA</b>	2.00 µg/mL	2.00 µg/mL
<b>EC</b>	0.34 µg/ml	0.26 µg/ml
<b>EGCG</b>	0.26 µg/ml	0.24 µg/ml
<b>ECG</b>	0.11 µg/ml	0.09 µg/ml

Il Limite di Determinazione (LOD) è risultato compreso, per le catechine, tra 0.03 e 0.10 µg/mL per il gradiente 1 e tra 0.03 e 0.08 µg/mL per il gradiente 2, mentre per la caffeina è risultato pari a 0.6 µg/mL per entrambi i gradienti. Tali range sono considerati accettabili in accordo con le linee guida dell'FDA (FDA, 2001) e con i dati di letteratura. Infatti, sono riportati valori di LOD compresi tra 0.005 e 3 µg/mL in analisi di matrici simili (tè in foglie) e che prevedono l'utilizzo del medesimo sistema cromatografico (Hu et al., 2008; Unachukwu et al., 2010; Burana-osot e Yanpaisan, 2012). Per quanto riguarda il limite di Quantificazione (LOQ), esso è risultato compreso, per le catechine, tra 0.11 e 0.34 µg/mL per il gradiente 1 e tra 0.09 e 0.26 µg/mL, in accordo con quanto riportato in letteratura, ovvero un range compreso tra 0.1 e 5.0 µg/mL (Hu et al., 2008; Unachukwu et al., 2010). Per la caffeina, il LOQ è risultato pari a 2.00 µg/mL per entrambi i gradienti, comparabile a quello riscontrato in letteratura (Burana-osot e Yanpaisan, 2012).

### **Recupero**

In Tabella 5.21 sono riportati i risultati analitici degli standard a 3 concentrazioni estratti rispetto agli standard puri. Le medie dei recuperi percentuali sono risultate  $99.07 \pm 4.18$  per la caffeina,  $93.50 \pm 10.62$  per EGCG,  $96.14 \pm 8.73$  per ECG e  $99.80 \pm 4.91$ .

**Tabella 5.21** – Recuperi percentuali degli analiti effettuati a 3 concentrazioni

<b>Concentrazione (µg/mL)</b>	<b>Recupero CAF (%) (media±DS)</b>	<b>Recupero EC (%) (media±DS)</b>	<b>Recupero ECG (%) (media±DS)</b>	<b>Recupero EGCG (%) (media±DS)</b>
LOQ	98.43±4.55	96.01±5.61	102.22±5.38	90.51±1.83
10	103.53±1.98	105.35±2.00	100.07±3.12	84.70±1.11
65	95.24±1.76	98.05±2.77	86.14±3.35	105.29±2.28
Media±DS	99.07±4.18	99.80±4.91	96.14 ±8.73	93.50±10.62



I test di recupero sono stati eseguiti confrontando i risultati analitici di campioni a tre concentrazioni diverse (comprendente il LOQ, una concentrazione media e una alta, scelte sulla base delle quantità di catechine presenti nei campioni), estratti in triplicato, rispetto ai valori dello standard non estratto. Il recupero percentuale è risultato compreso tra l'80 e il 115%, in accordo con le linee guida dell'FDA e dell'AOAC (FDA, 2001; AOAC, 2002).

## **Linearità**

In seguito all'iniezione delle soluzioni standard, realizzate sia con il gradiente 1 sia con il gradiente 2, sono state costruite le rette di calibrazione per ciascuno standard (caffaina, EC, EGCG, ECG) nell'intervallo di concentrazioni tra il LOQ e 100 µg/mL. Ogni punto della retta è il risultato della media di tre iniezioni.

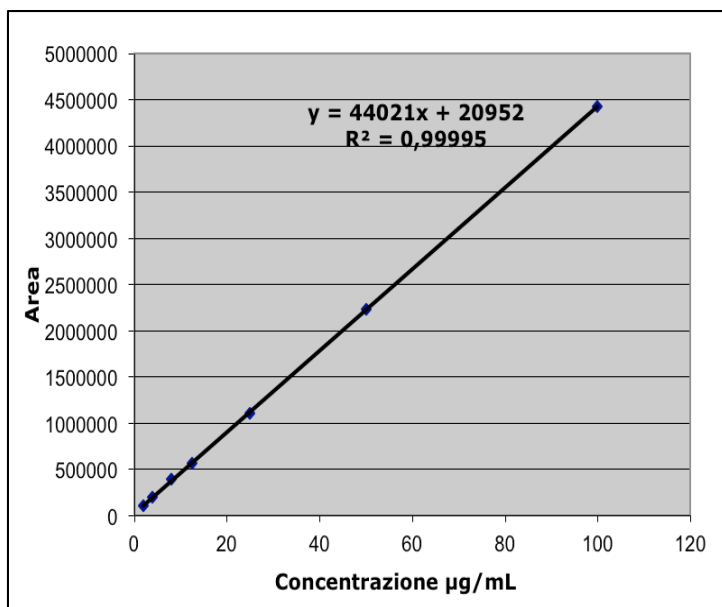
### **Rette di calibrazione ottenute con l'utilizzo del gradiente 1**

#### ➤ Caffaina

Nella Tabella 5.22 sono elencate le concentrazioni delle soluzioni di caffeina iniettate e le aree del picco corrispondente, mentre la retta di calibrazione ottenuta è illustrata nella Figura 5.8.

<b>CONCENTRAZIONE (µg/mL)</b>	<b>AREA PICCO</b>
2	103674
4	196943
8	393995
12,5	567999
25	1105747
50	2223477
100	4425145

**Tabella 5.22** – Concentrazioni di caffeina standard iniettate e relativa area del picco cromatografico



**Figura 5.8** – Retta di calibrazione per il dosaggio della caffeina nell'intervallo 2-100 µg/mL (gradiente 1)

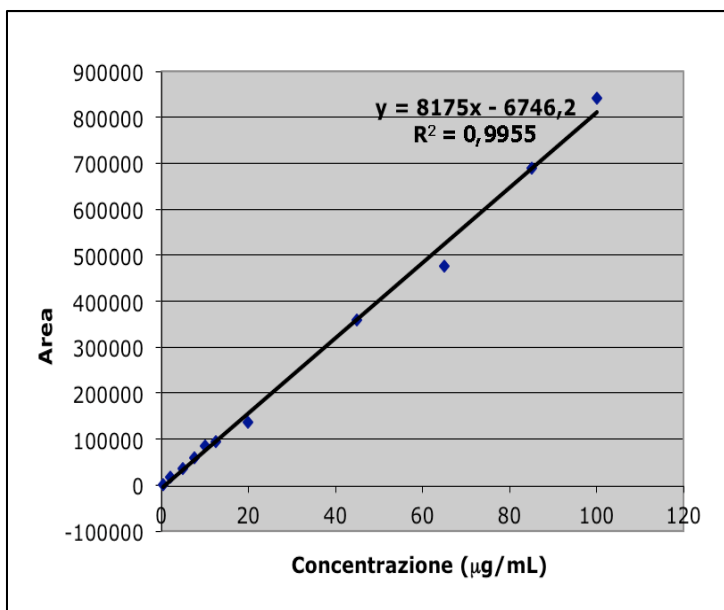
Il coefficiente di correlazione  $R^2$ , vicino a 1 (0.99995) indica una risposta lineare ottimale per l'intervallo di concentrazioni considerate.

➤ **Epicatechina (EC)**

Nella Tabella 5.23 sono elencate le concentrazioni delle soluzioni di EC iniettate e le aree del picco corrispondente, mentre la retta di calibrazione ottenuta è illustrata nella Figura 5.9.

CONCENTRAZIONE (µg/mL)	AREA PICCO	CONCENTRAZIONE (µg/mL)	AREA PICCO
0,34	2346	20	138282
2	18325	45	359655
5	36841	65	476564
7,5	59844	85	690762
10	85477	100	842298
12,5	95776		

**Tabella 5.23** – Concentrazioni di EC standard iniettate e relative area del picco cromatografico



**Figura 5.9:** retta di calibrazione EC relativa alle concentrazioni tra 0.34 µg/mL e 100 µg/mL (gradiente 1).

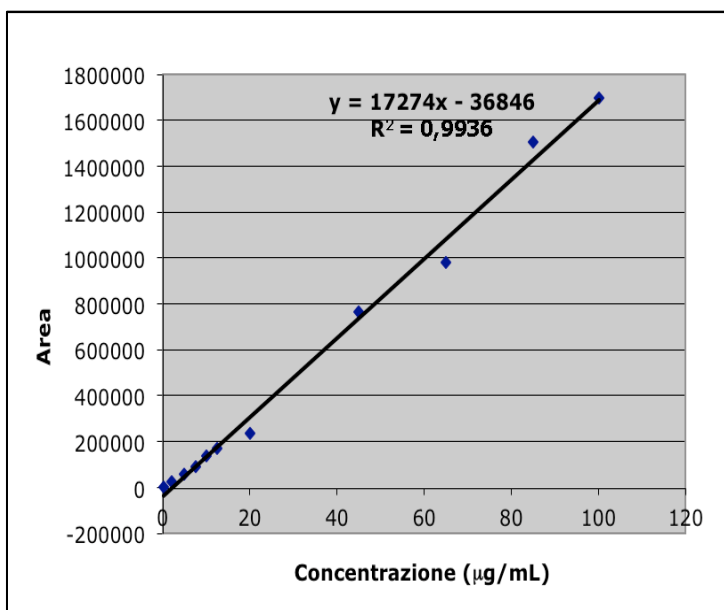
Il coefficiente di correlazione  $R^2$ , vicino a 1 (0,9955), indica una risposta lineare ottimale per l'intervallo di concentrazioni considerate.

➤ Epigallocatechina gallato (EGCG)

Nella Tabella 5.24 sono elencate le concentrazioni delle soluzioni di EGCG iniettate e le aree del picco corrispondente, mentre la retta di calibrazione ottenuta è illustrata nella Figura 5.10.

CONCENTRAZIONE (µg/mL)	AREA PICCO	CONCENTRAZIONE (µg/mL)	AREA PICCO
0,26	2880	20	237785
2	27864	45	768493
5	57493	65	980297
7,5	92685	85	1505428
10	137574	100	1697536
12,5	171495		

**Tabella 5.24** - Concentrazioni di EGCG standard iniettate e relative area del picco cromatografico



**Figura 5.10:** retta di calibrazione EGCG relativa alle concentrazioni tra 0.26 µg/mL e 100 µg/mL (gradiente 1).

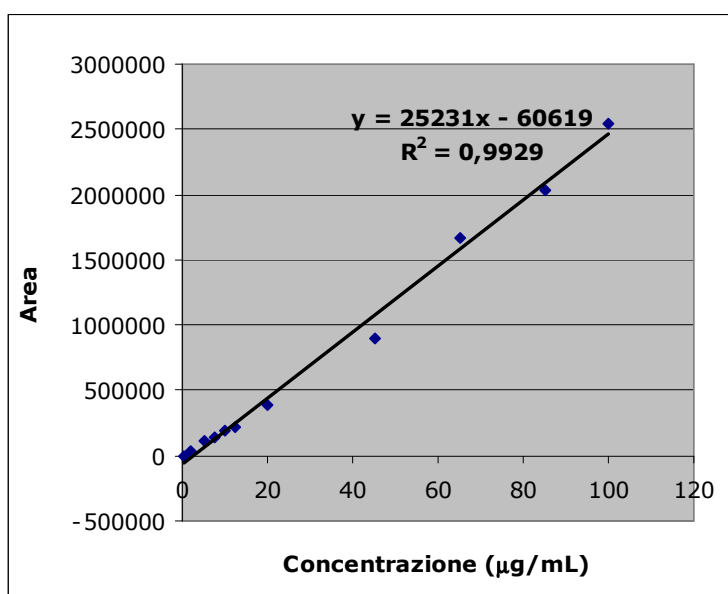
Il coefficiente di correlazione  $R^2$ , vicino a 1 (0,9936), indica una risposta lineare ottimale per l'intervallo di concentrazioni considerate.

➤ Epicatechina gallato (ECG)

Nella Tabella 5.25 sono elencate le concentrazioni delle soluzioni di ECG iniettate e le aree del picco corrispondente, mentre la retta di calibrazione ottenuta è illustrata nella Figura 5.11.

CONCENTRAZIONE (µg/mL)	AREA PICCO	CONCENTRAZIONE (µg/mL)	AREA PICCO
0,11	1576	20	383440
2	37912	45	900045
5	108447	65	1663783
7,5	139846	85	2032024
10	189380	100	2542922
12,5	221841		

**Tabella 5.25** - Concentrazioni di ECG standard iniettate e relative area del picco cromatografico



**Figura 5.11:** retta di calibrazione ECG relativa alle concentrazioni tra 0.11 µg/mL e 100 µg/mL (gradiente 1).

Il coefficiente di correlazione  $R^2$ , vicino a 1 (0,9929), indica una risposta lineare ottimale per l'intervallo di concentrazioni considerate.

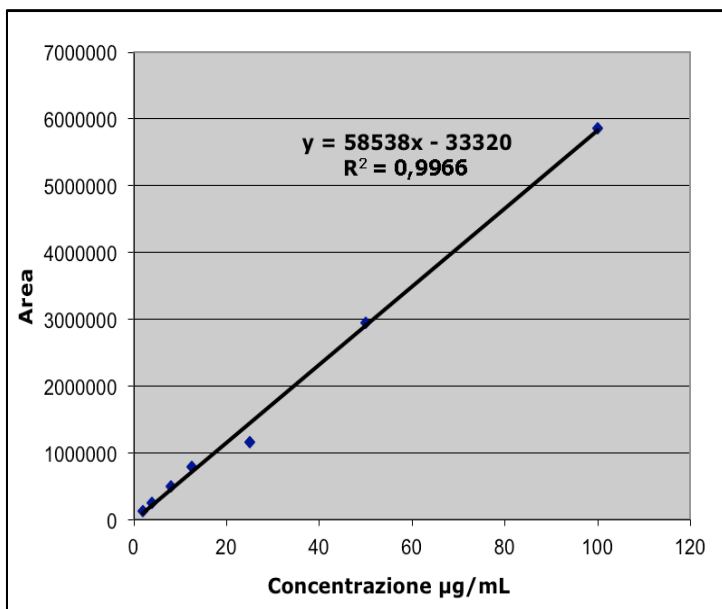
### Rette di calibrazione ottenute con l'utilizzo del gradiente 2

#### ➤ Caffaina

Nella Tabella 5.26 sono elencate le concentrazioni delle soluzioni di caffeina iniettate e le aree del picco corrispondente, mentre la retta di calibrazione ottenuta è illustrata nella Figura 5.12.

CONCENTRAZIONE ( $\mu\text{g/mL}$ )	AREA PICCO
2	117436
4	236079
8	482070
12,5	781194
25	1157597
50	2937176
100	5850616

**Tabella 5.26** – Concentrazioni di caffeina standard iniettate e relativa area del picco cromatografico



**Figura 5.12** – Retta di calibrazione per il dosaggio della caffeina nell'intervallo 2-100  $\mu\text{g/mL}$  (gradiente 2)

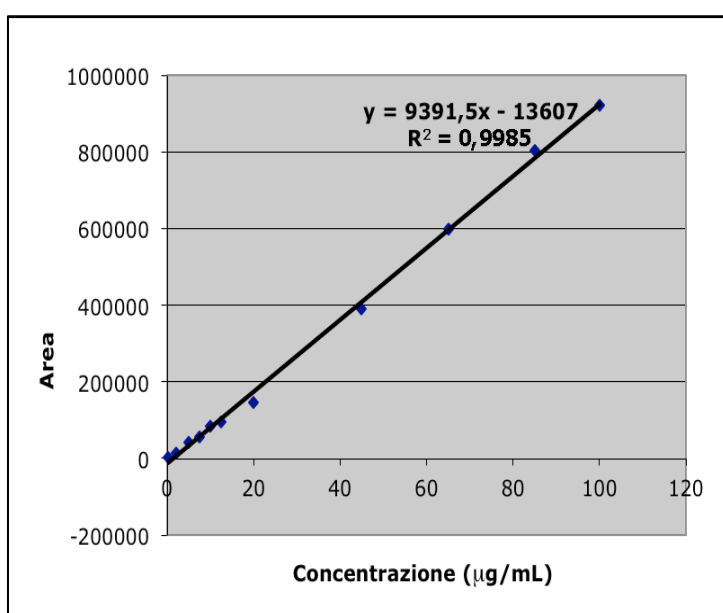
Il coefficiente di correlazione  $R^2$ , vicino a 1 (0,9966), indica una risposta lineare ottimale per l'intervallo di concentrazioni considerate.

➤ Epicatechina (EC)

Nella Tabella 5.27 sono elencate le concentrazioni delle soluzioni di EC iniettate e le aree del picco corrispondente, mentre la retta di calibrazione ottenuta è illustrata nella Figure 5.13.

CONCENTRAZIONE (µg/mL)	AREA PICCO	CONCENTRAZIONE (µg/mL)	AREA PICCO
0,26	2353	20	147508
2	13814	45	391886
5	43470	65	597814
7,5	57586	85	802523
10	83229	100	922736
12,5	95650		

**Tabella 5.27** - Concentrazioni di EC standard iniettate e relative area del picco cromatografico



**Figura 5.13:** retta di calibrazione EC relativa alle concentrazioni tra 0,26 µg/mL e 100 µg/mL (gradiente 2).

Il coefficiente di correlazione  $R^2$ , vicino a 1 (0,9985), indica una risposta lineare ottimale per l'intervallo di concentrazioni considerate.

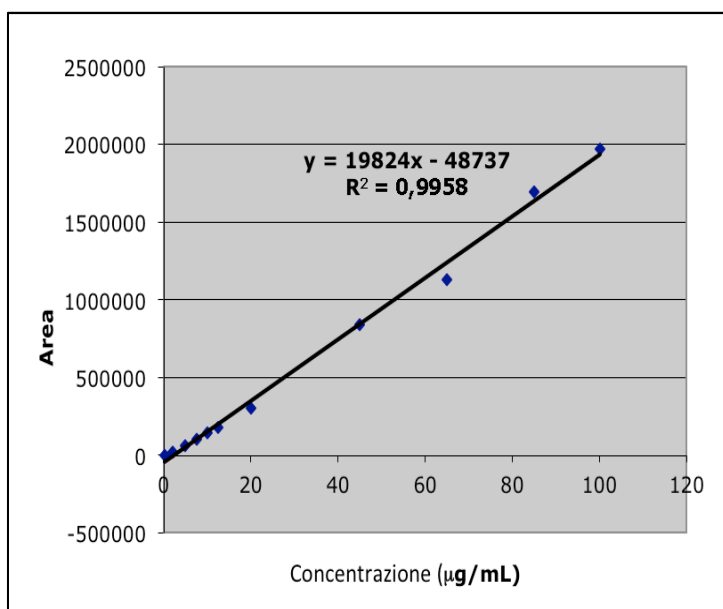


➤ Epigallocatechina gallato (EGCG)

Nella Tabella 5.28 sono elencate le concentrazioni delle soluzioni di EGCG iniettate e le aree del picco corrispondente, mentre la retta di calibrazione ottenuta è illustrata nella Figura 5.14.

CONCENTRAZIONE (µg/mL)	AREA PICCO	CONCENTRAZIONE (µg/mL)	AREA PICCO
0,24	1886	20	302601
2	20372	45	837192
5	60382	65	1131811
7,5	104454	85	1691275
10	146579	100	1969906
12,5	180484		

**Tabella 5.28** - Concentrazioni di EGCG standard iniettate e relative area del picco cromatografico



**Figura 5.14:** retta di calibrazione EGCG relativa alle concentrazioni tra 0.24 µg/mL e 100 µg/mL (gradiente 2).

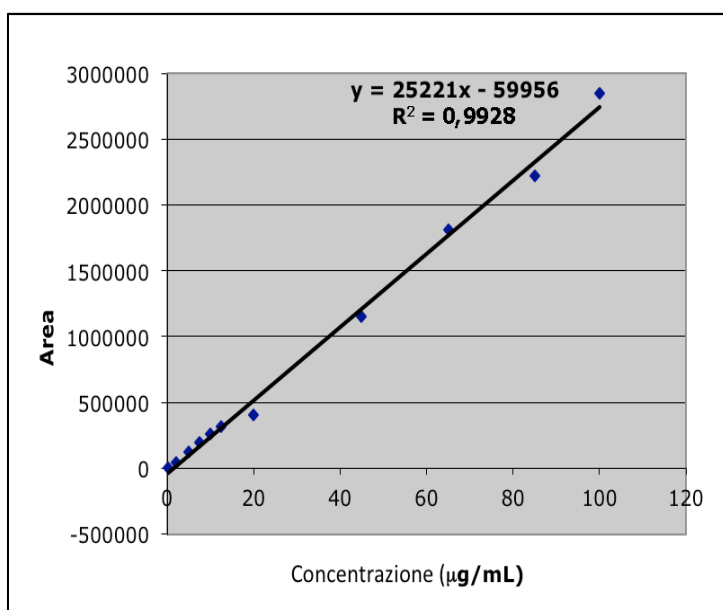
Il coefficiente di correlazione  $R^2$ , vicino a 1 (0,9958), indica una risposta lineare ottimale per l'intervallo di concentrazioni considerate.

➤ Epicatechina gallato (ECG)

Nella Tabella 5.29 sono elencate le concentrazioni delle soluzioni di ECG iniettate e le aree del picco corrispondente, mentre la retta di calibrazione ottenuta è illustrata nella Figura 5.15.

CONCENTRAZIONE (µg/mL)	AREA PICCO	CONCENTRAZIONE (µg/mL)	AREA PICCO
0,09	1892	20	407490
2	44420	45	1156282
5	125507	65	1815218
7,5	196629	85	2221825
10	262239	100	2852825
12,5	320239		

**Tabella 5.29** - Concentrazioni di ECG standard iniettate e relative area del picco cromatografico



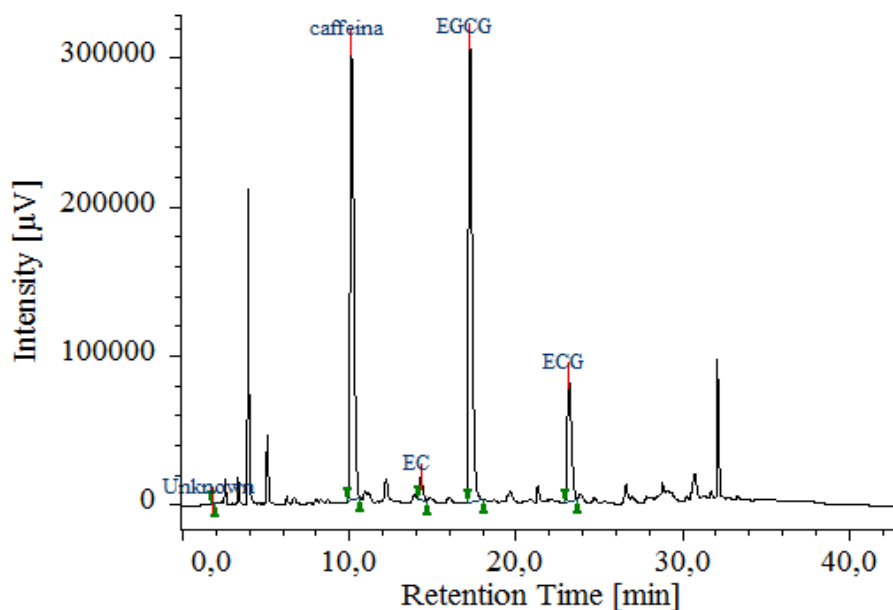
**Figura 5.15:** retta di calibrazione ECG relativa alle concentrazioni tra 0.09 µg/mL e 100 µg/mL (gradiente 2).

Il coefficiente di correlazione  $R^2$ , vicino a 1 (0,9928), indica una risposta lineare ottimale per l'intervallo di concentrazioni considerate.

### 5.12.2 Analisi dei campioni

I campioni, allestiti come descritto nella sezione “Metodi”, sono stati iniettati tramite autocampionatore (20  $\mu$ L) in HPLC e in seguito, dai cromatogrammi ottenuti, sono state ricavate le aree. Ogni campione è stato iniettato tre volte. Il valore delle aree è stato successivamente utilizzato per la determinazione della concentrazione di caffeina e catechine, attraverso le rette di calibrazione.

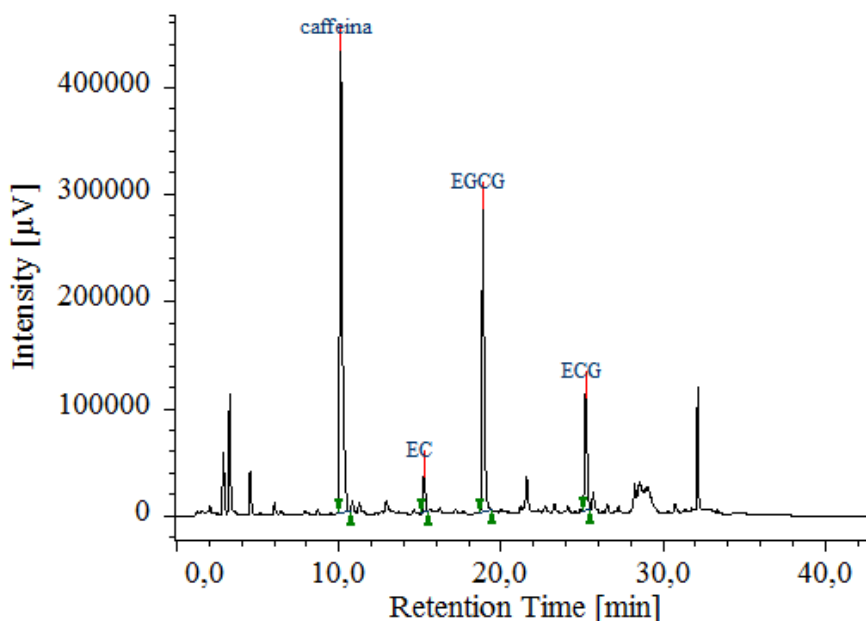
Di seguito sono riportati i cromatogrammi relativi ai campioni analizzati (Figure 5.16-5.24).



**Figura 5.16** – Cromatogramma relativo all'estratto commerciale di tè verde (GTE)

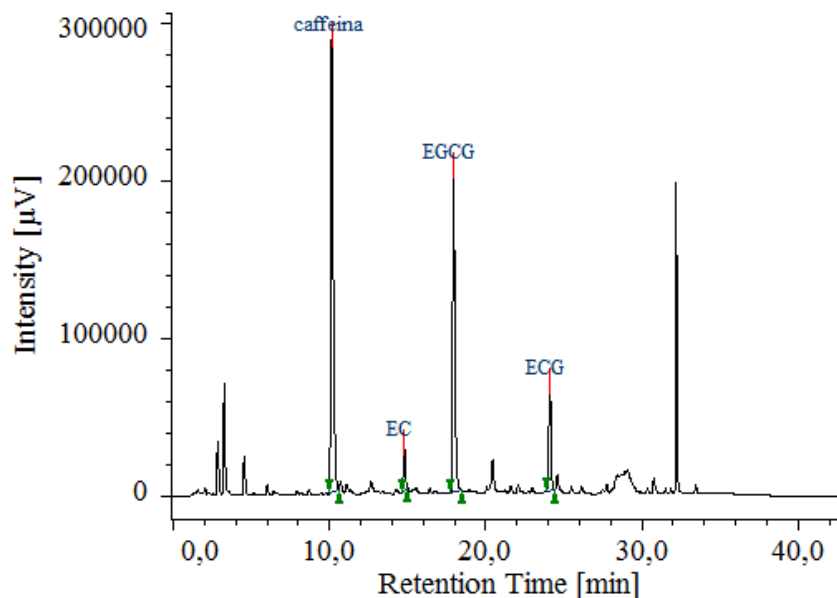
In Figura 5.16 è riportato il cromatogramma relativo all'estratto di tè verde commerciale (GTE), nel quale è possibile osservare che la caffeina e l'EGCG rappresentano gli analiti presenti in maggiore quantità, seguiti dall'ECG e dall'EC. Le aree dei picchi relativi alla caffeina, EC, EGCG ed ECG sono state elaborate

mediante regressione lineare ottenendo così le concentrazioni relative nel campione. I quantitativi degli analiti ricercati sono risultati:  $71.95 \pm 5.10$  mg/g per la caffeina,  $88.53 \pm 5.54$  mg/g per l'EGCG,  $27.22 \pm 1.40$  mg/g per l'ECG e  $17.95 \pm 1.17$  mg/g per l'EC. Il quantitativo totale di catechine è risultato pari a  $133.71 \pm 8.10$ .



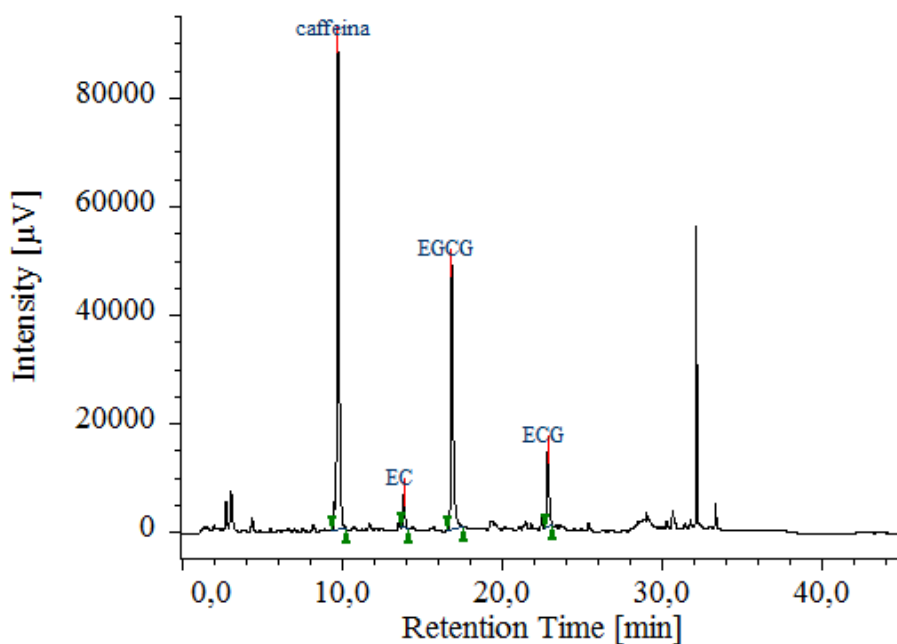
**Figura 5.17** – Cromatogramma relativo all'estratto di tè verde 1 (GTI-1)

In Figura 5.17 è riportato il cromatogramma relativo all'estratto di tè verde 1 (GT-1). Si può subito notare, come nel caso dell'estratto di tè verde commerciale, che l'EGCG è l'analita che presenta un picco con area maggiore, seguito da quello relativo alla caffeina, all'ECG e all'EC. Le aree dei picchi relativi alla caffeina, EC, EGCG ed ECG sono state elaborate mediante regressione lineare ottenendo così le concentrazioni relative nel campione. I quantitativi degli analiti ricercati sono risultati:  $29.39 \pm 0.77$  mg/g per la caffeina,  $56.14 \pm 5.59$  mg/g per l'EGCG,  $20.48 \pm 1.06$  mg/g per l'ECG e  $9.41 \pm 0.41$  mg/g per l'EC. Il quantitativo totale di catechine è risultato pari a  $86.03 \pm 6.91$ , circa la metà rispetto al quantitativo riscontrato nell'estratto commerciale.



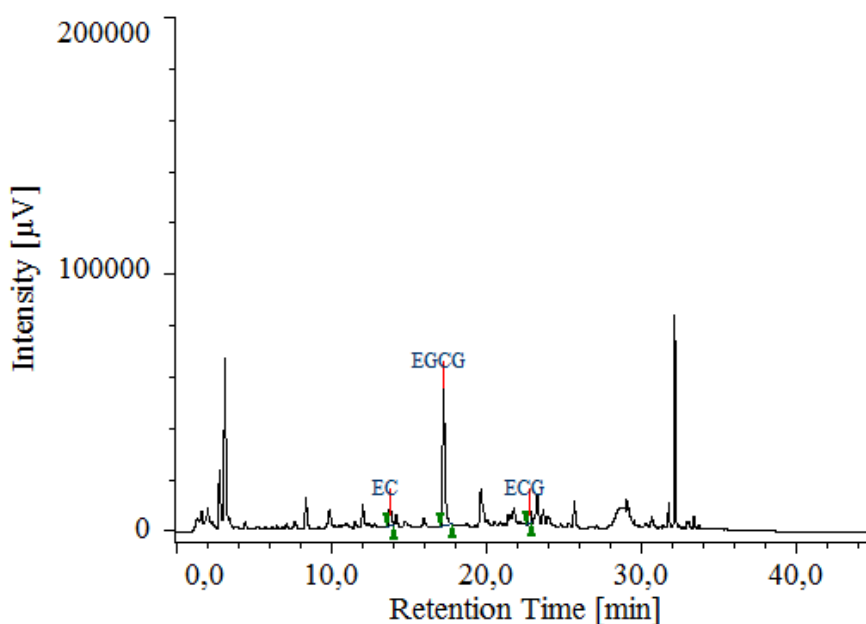
**Figura 5.18** – Cromatogramma relativo all'estratto di tè verde 2 (GTI-2)

In Figura 5.18 è riportato il cromatogramma relativo all'estratto di tè verde 2 (GTI-2). Anche in questo caso, è possibile osservare che l'EGCG risulta essere l'analita più abbondante, seppur non differisca significativamente, dal punto di vista visivo, dalla caffeina. Anche l'EC e l'ECG presentano picchi con altezza molto simile. Infatti, I quantitativi degli analiti ricercati, ottenuti tramite utilizzo della regressione lineare sono risultati:  $33.62 \pm 3.03$  mg/g per la caffeina,  $38.77 \pm 3.72$  mg/g per l'EGCG,  $7.63 \pm 0.65$  mg/g per l'ECG e  $6.05 \pm 0.47$  mg/g per l'EC. Il quantitativo totale di catechine è risultato pari a  $52.45 \pm 4.77$ . I valori di ECG, in particolare, risultano particolarmente bassi se confrontati con gli altri campioni di tè verde.



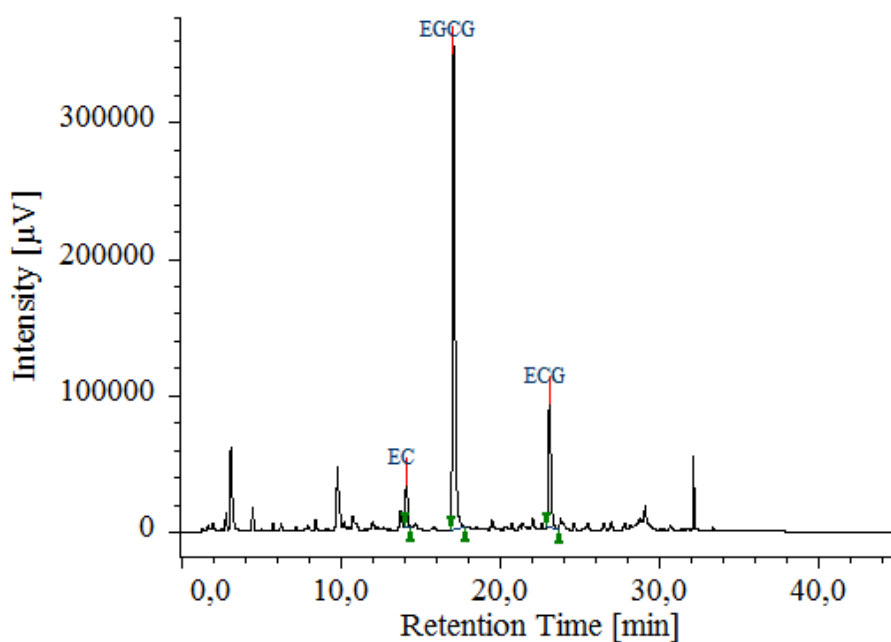
**Figura 5.19** – Cromatogramma relativo all'estratto di tè verde GTI-3

In Figura 5.19 è riportato il cromatogramma relativo al tè verde 3 (GTI-3). Come è possibile osservare, a differenza degli altri tè verdi la caffeina rappresenta l'analita che presenta il picco cromatografico con area maggiore, seguito dall'EGCG, ECG ed EC. Tali osservazioni sono state confermate dalle concentrazioni ottenute tramite l'elaborazione delle aree dei picchi cromatografici mediante regressione lineare; infatti, la caffeina è risultata l'analita più abbondante ( $47.57 \pm 0.39$  mg/g) seguita dall'EGCG ( $42.65 \pm 4.12$  mg/g) e dall'ECG ( $14.25 \pm 0.13$  mg/g), Il quantitativo totale di catechine è risultato pari a  $68.25 \pm 4.20$ .



**Figura 5.20** – Cromatogramma relativo all'estratto di tè verde decaffeinato 1 (GTID-1)

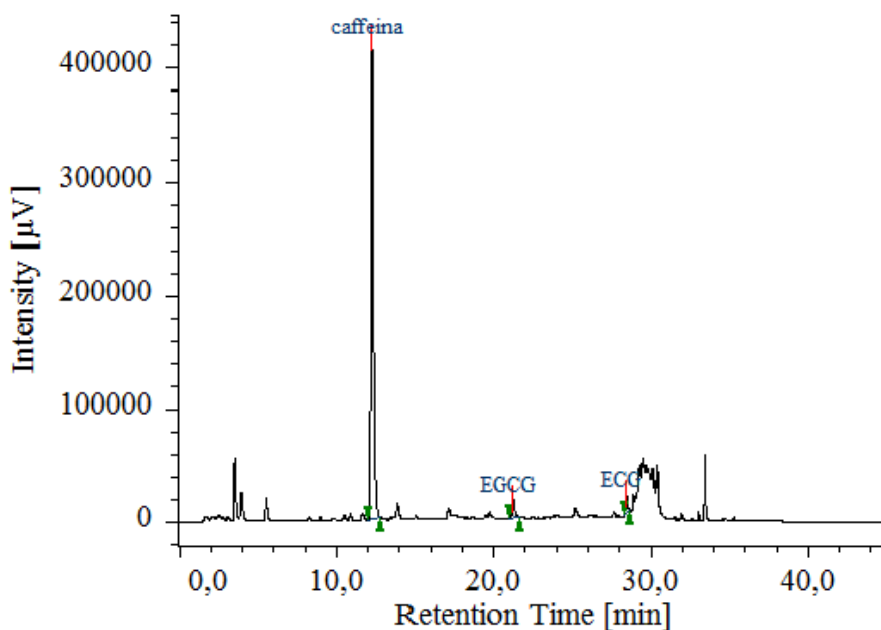
In Figura 5.20 è riportato il cromatogramma relativo al tè verde decaffeinato 1 (GTID-1). E' possibile osservare, rispetto agli altri campioni di tè verde, lo scarso contenuto di catechine deducibile dalla ridotta altezza dei picchi cromatografici corrispondenti. Tali osservazioni sono state confermate dalle concentrazioni ottenute tramite l'elaborazione delle aree dei picchi cromatografici mediante regressione lineare; infatti, l'EGCG è risultata pari a  $6.79 \pm 0.07$  mg/g, l'EC a  $0.62 \pm 0.004$  mg/g e all'ECG  $0.94 \pm 0.06$  mg/g. La caffeina, come atteso, è risultata non determinabile, ovvero inferiore al Limite di Determinazione (LOD) ( $0.60 \mu\text{g/mL}$ ).



**Figura 5.21** – Cromatogramma relativo all'estratto di tè verde decaffeinato GTID-2

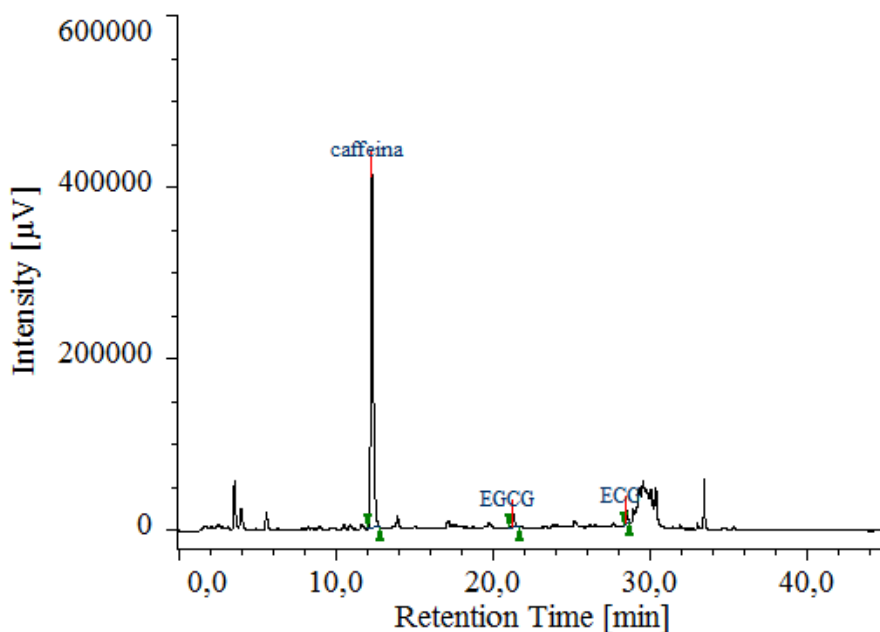
In Figura 5.21 è riportato il cromatogramma relativo al tè verde decaffeinato 2 (GTID-2). Come atteso, essendo un tè decaffeinato, la caffeina non risulta visibile; l'EGCG è la catechina che presenta un picco con area maggiore, seguita dall'ECG e dall'EC. Tali osservazioni sono state confermate dalle concentrazioni ottenute tramite l'elaborazione delle aree dei picchi cromatografici mediante regressione lineare; infatti, la caffeina è risultata non determinabile, ovvero inferiore al LOD ( $0.60 \mu\text{g/mL}$ ). L'EGCG è risultata la catechina più abbondante ( $57.54 \pm 5.57 \text{ mg/g}$ ) seguita dall'EC ( $10.03 \pm 0.47 \text{ mg/g}$ ) e dall'ECG ( $18.39 \pm 0.03 \text{ mg/g}$ ). Il quantitativo totale di catechine è risultato pari a  $85.96 \pm 5.96$ , circa otto volte maggiore rispetto al tè verde decaffeinato 1.





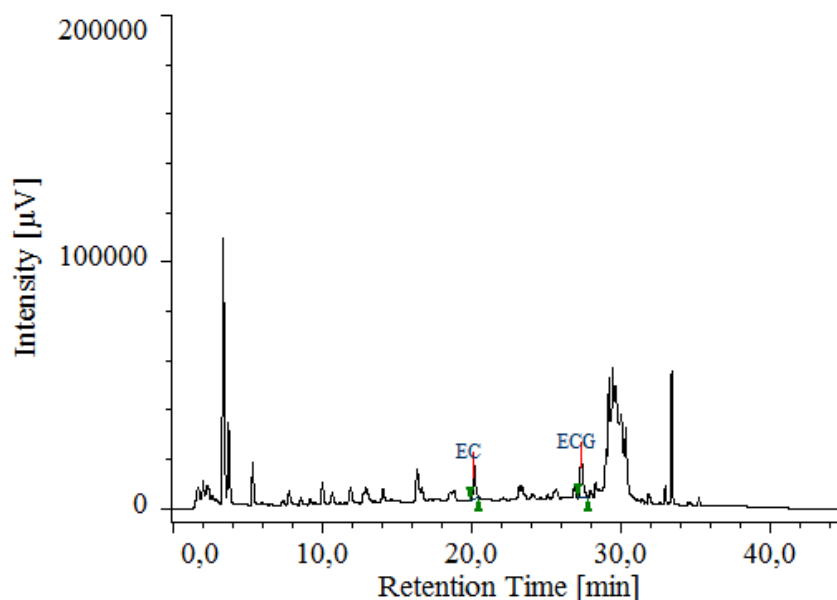
**Figura 5.22** – Cromatogramma relativo all'estratto di tè nero BTI-1

In Figura 5.22 è riportato il cromatogramma relativo al tè nero 1 (BTI-1). Rispetto ai campioni di tè verde, si può subito notare subito la minor altezza dei picchi cromatografici relativi alle catechine; il picco della caffeina, invece, non sembra essere significativamente differente rispetto ai campioni di tè verde. I quantitativi degli analiti, ottenuti tramite regressione lineare, sono infatti risultati pari a  $46.33 \pm 1.17$  mg/g per la caffeina,  $7.47 \pm 0.55$  mg/g per l'EGCG e  $4.74 \pm 0.43$  mg/g per l'ECG. L'EC è invece risultata non determinabile, ovvero inferiore al valore del Limite di Determinazione (LOD) ( $0.10 \mu\text{g/mL}$ ). Il quantitativo totale di catechine è risultato pari a  $12.21 \pm 0.98$  mg/g.



**Figura 5.23** – Cromatogramma relativo all'estratto di tè nero BTI-2

In Figura 5.23 è riportato il cromatogramma relativo al tè nero 2 (BTI-2). Rispetto ai campioni di tè verde, si può subito notare subito la minor altezza dei picchi cromatografici relativi alle catechine; il picco della caffeina, invece, non sembra essere significativamente differente rispetto ai campioni di tè verde. I quantitativi degli analiti, ottenuti tramite regressione lineare, sono infatti risultati pari a  $46.73 \pm 2.34$  mg/g per la caffeina,  $2.76 \pm 0.16$  mg/g per l'EGCG e  $1.85 \pm 0.04$  mg/g per l'ECG. L'EC è invece risultata non determinabile, ovvero inferiore al valore del Limite di Determinazione (LOD) ( $0.10 \mu\text{g/mL}$ ). Il quantitativo totale di catechine è risultato pari a  $4.61 \pm 0.19$  mg/g. Se confrontato con il tè nero 1, i quantitativi di caffeina sono risultati molto simili tra loro, mentre quelli di catechine sono circa tre volte inferiori, sebbene i due tè abbiano la medesima data di scadenza. Ciò sottolinea ancora una volta l'influenza dei fattori legati alla qualità e alle tecniche di lavorazione delle foglie di partenza.



**Figura 5.24** – Cromatogramma relativo all’estratto di tè nero decaffeinato BTID-1

In Figura 5.24 è riportato il cromatogramma relativo al tè nero decaffeinato 1 (BTID-1). I picchi cromatografici relativi alle catechine appaiono molto simili a quelli riscontrati nel tè nero 2 (BTI-2). Invece, come atteso, il picco relativo alla caffeina non risulta visibile trattandosi di un tè nero decaffeinato. I quantitativi degli analiti, ottenuti tramite regressione lineare, sono infatti risultati molto simili a quelli ottenuti per il tè nero 2, ovvero:  $2.85 \pm 0.27$  mg/g per l’EGCG e  $1.71 \pm 0.16$  mg/g per l’ECG. L’EC, come per gli altri tè neri, è risultata non determinabile, ovvero inferiore al valore del Limite di Determinazione (LOD) ( $0.10 \mu\text{g/mL}$ ) così come la caffeina (inferiore al LOD,  $0.60 \mu\text{g/mL}$ ). Il quantitativo totale di catechine è risultato pari a  $4.56 \pm 0.16$  mg/g.

In Tabella 5.30 sono riportati i dati riassuntivi relativi ai quantitativi delle catechine totali e delle singole catechine per ciascun campione.

**Tabella 5.30** – Tabella riassuntiva del contenuto (mg/g) di catechine totali e delle singole catechine nei campioni analizzati

Campione	Contenuto di catechine totali mg/g (media ± DS)	EGCG (mg/g) (media ± DS)	ECG (mg/g) (media ± DS)	EC (mg/g) (media ± DS)	CAF (mg/g) (media ± DS)
GTE	133.71 ± 8.10	88.53 ± 5.54	27.22 ± 1.40	17.95 ± 1.17	71.95 ± 5.10
GTI-1	86.03 ± 6.91	56.14 ± 5.59	20.48 ± 1.06	9.41 ± 0.41	29.39 ± 0.77
GTI-2	52.45 ± 4.77	38.77 ± 3.72	7.63 ± 0.65	6.05 ± 0.47	33.62 ± 3.03
GTI-3	68.25 ± 4.20	42.65 ± 4.12	14.25 ± 0.13	11.35 ± 0.04	47.57 ± 0.39
GTID-1	8.35 ± 0.05	6.79 ± 0.07	0.94 ± 0.06	0.62 ± 0.004	N.D.**
GTID-2	85.96 ± 5.96	57.54 ± 5.57	18.39 ± 0.03	10.03 ± 0.47	N.D.**
BTI-1	12.21 ± 0.98	7.47 ± 0.55	4.74 ± 0.43	N.D.*	46.33 ± 1.17
BTI-2	4.61 ± 0.19	2.76 ± 0.16	1.85 ± 0.04	N.D.*	46.73 ± 2.34
BTID-1	4.56 ± 0.16	2.85 ± 0.27	1.71 ± 0.16	N.D.*	N.D.**

\*N.D. = Non determinabile (inferiore al LOD, 0.10 µg/mL)

\*\* N.D. = Non determinabile (inferiore al LOD, 0.60 µg/mL)

Come è possibile osservare in Tabella 5.30 e dai cromatogrammi sopra riportati, gli estratti di tè verde contengono, in linea generale, un maggior contenuto di catechine rispetto a quelli di tè nero (in media 60.2 vs 7.1 mg/g, rispettivamente), mentre il contenuto di caffeina non è significativamente differente nelle due tipologie di tè (ad esclusione dei tè decaffeinati). Ciò è ascrivibile in gran parte al fatto che durante la lavorazione del tè verde, a differenza di quella del tè nero, non avviene il processo di fermentazione che porta alla liberazione dell'enzima polifenolo ossidasi (presente nella parte più superficiale della foglia), responsabile dell'ossidazione delle catechine (Subramanian et al., 1999). A ciò indubbiamente si aggiungono altri fattori come

l'origine geografica, la stagione di raccolta delle foglie e la qualità di quest'ultime, nel determinare i livelli di catechine ed altri polifenoli nel prodotto finale. L'EGCG è la catechina presente in maggiore quantità in tutti i campioni analizzati, mentre l'EC quella meno rappresentata; nei campioni di tè nero, in particolare, essa è risultata non determinabile, ovvero inferiore al Limite di Determinazione (LOD) di 0.10 µg/mL. Il campione decaffeinato GTID-1, pur essendo verde, presenta, un quantitativo di catechine inferiore dalle 6 e le 10 volte rispetto agli altri campioni di tè verde. È stato ipotizzato che in parte ciò possa essere dovuto al metodo usato per rimuovere la caffeina, il quale, soprattutto se basato sull'utilizzo di solventi organici, può significativamente ridurre il contenuto fenolico (Kim et al., 2008). Il contenuto di caffeina è risultato compreso tra 29.4 e 47.6 mg/g nei campioni di tè verde e nero e, come atteso, non determinabile nei campioni decaffeinati, ovvero inferiore al Limite di Determinazione (LOD) di 0.60 µg/mL. Il contenuto più elevato di catechine e caffeina è stato riscontrato nell'estratto di tè verde commerciale, seguito dal GTI-1 e GTID-2.

### **5.13 Attività biologica**

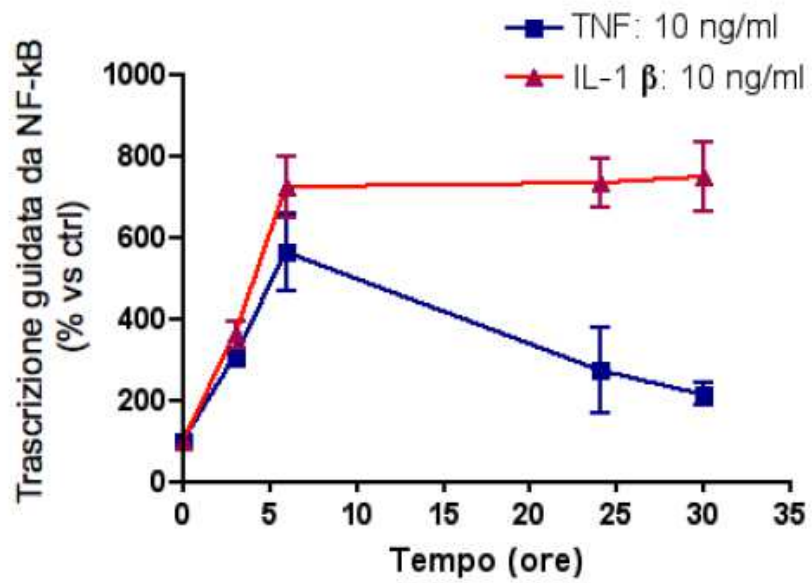
L'attività anti-infiammatoria degli estratti a livello gastrico è stata valutata in cellule AGS umane stimulate con TNF. Alcuni studi hanno riportato un effetto positivo di estratti acquosi o idroalcolici di tè verde o nero sull'infiammazione gastrica (Gutierrez-Orozeo et al., 2010), sul danno alla mucosa gastrica indotto da etanolo (Lee et al., 2005) e sull'inibizione della crescita dell'*Helicobacter pylori in vitro* ed *in vivo* (Ruggiero et al., 2007; Stoicov et al., 2009). Tuttavia, ad oggi, nessuno studio è stato ancora effettuato utilizzando gli infusi, che rappresentano la principale e più diffusa modalità di consumo di tè verde e nero. Prima di effettuare i saggi biologici è stata valutata la citotossicità degli estratti e delle singole catechine sulle cellule AGS.

#### **5.13.1 Saggi di citotossicità**

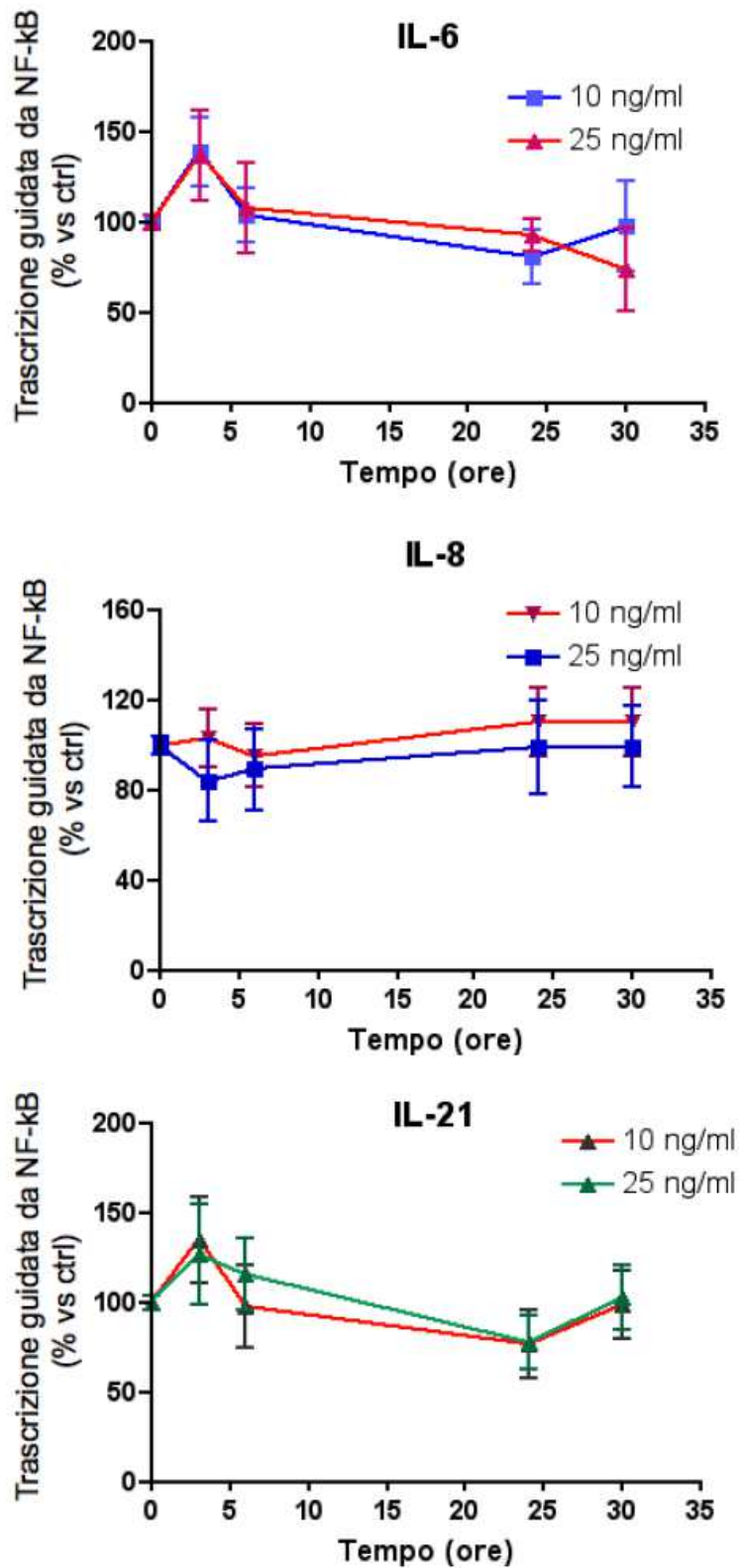
L'effetto esercitato dagli estratti di tè sulla vitalità cellulare è stato valutato attraverso la quantificazione dell'attività della succinato deidrogenasi mitocondriale (test dell'MTT) e attraverso il test del Trypan blue. I risultati di questi esperimenti hanno evidenziato che né gli estratti né i singoli analiti (caffeina e catechine) hanno causato effetti citotossici sulle cellule AGS nell'intervallo di concentrazioni utilizzato (0.1 – 25 µg/mL per gli estratti e 0.1-10 µM per i singoli composti).

#### **5.13.2 Effetto delle citochine pro-infiammatorie sulla trascrizione mediata da NF-kB in cellule gastriche umane (AGS)**

Al fine di valutare l'effetto di alcune citochine pro-infiammatorie sulla trascrizione mediata da NF-kB nella linea cellulare AGS, sono stati condotti i time-course a 3, 6, 24 e 30 ore, utilizzando diverse citochine (TNF, l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-21 e l'IL-8) alla concentrazione di 10 ng/mL, concentrazione che si ritiene raggiungibile a livello gastrico durante il processo infiammatorio. La trascrizione mediata da NF-kB è stata valutata quantificando, tramite luminometro, l'attività luciferasica in cellule AGS precedentemente sottoposte ad una procedura di trasfezione transiente, come descritto nel capitolo "Metodi". I risultati di questi esperimenti sono riportati nelle figure 5.25-5.26.



**Figura 5.25** - Effetto del TNF (10 ng/mL) e dell'IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) sulla trascrizione mediata da NF-kB nelle cellule AGS. L'analisi è stata effettuata mediante il saggio della luciferasi ed i dati sono espressi in percentuale rispetto al controllo, a cui è stato assegnato arbitrariamente il valore del 100%.



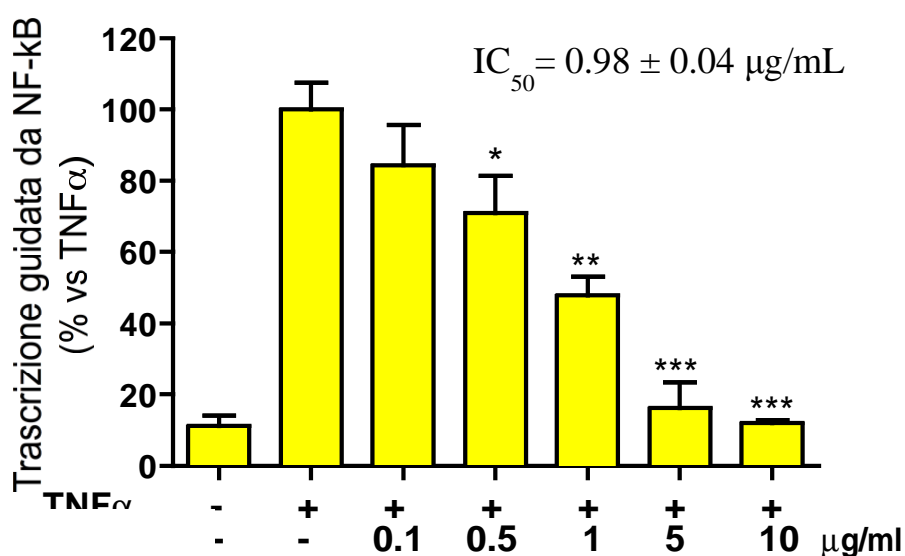
**Figura 5.26** - Effetto dell'IL-6, dell'IL-8 e dell'IL-21 (10 ng/mL e 25 ng/mL) sulla trascrizione mediata da NF-kB nelle cellule AGS. L'analisi è stata effettuata mediante il saggio della luciferasi ed i dati sono espressi in percentuale rispetto al controllo, a cui è stato assegnato arbitrariamente il valore del 100%.



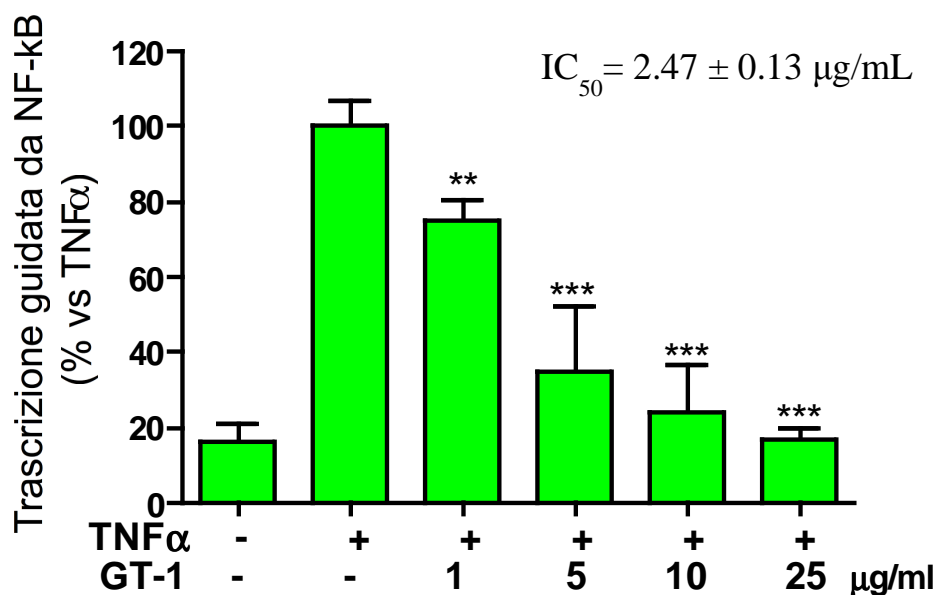
Dai grafici riportati nelle Figure 5.25-5.26 si evidenzia che solo il TNF e l'IL-1 $\beta$  sono in grado di stimolare la trascrizione mediata da NF-kB nelle cellule AGS; tale stimolazione si osserva già dopo 3 ore dall'inizio del trattamento (con un aumento della trascrizione di circa 3 volte rispetto al controllo) e, sia per il TNF che per l'IL-1 $\beta$ , l'effetto massimale si manifesta dopo 6 ore di trattamento (aumento di 5.6 volte per il TNF; aumento di 7.2 volte per l'IL-1 $\beta$ ). Trascorso tale tempo, l'effetto stimolatorio indotto dal TNF decresce sensibilmente mentre quello indotto dall'IL-1 $\beta$  rimane relativamente costante sino alle 30 ore (massimo tempo valutato). L'IL-6, l'IL-21 e l'IL-8, invece, non si sono rivelate in grado di stimolare la trascrizione mediata da NF-kB nel modello cellulare di epitelio gastrico da noi utilizzato, anche quando queste citochine erano utilizzate a concentrazioni più elevate (25 ng/mL); pertanto, tutti gli esperimenti successivi sono stati condotti utilizzando come stimolo infiammatorio il TNF alla concentrazione di 10 ng/mL per 6 ore.

### **5.13.3 Effetto degli estratti acquosi di tè verde e nero sulla trascrizione mediata da NF-kB in cellule AGS stimulate con TNF**

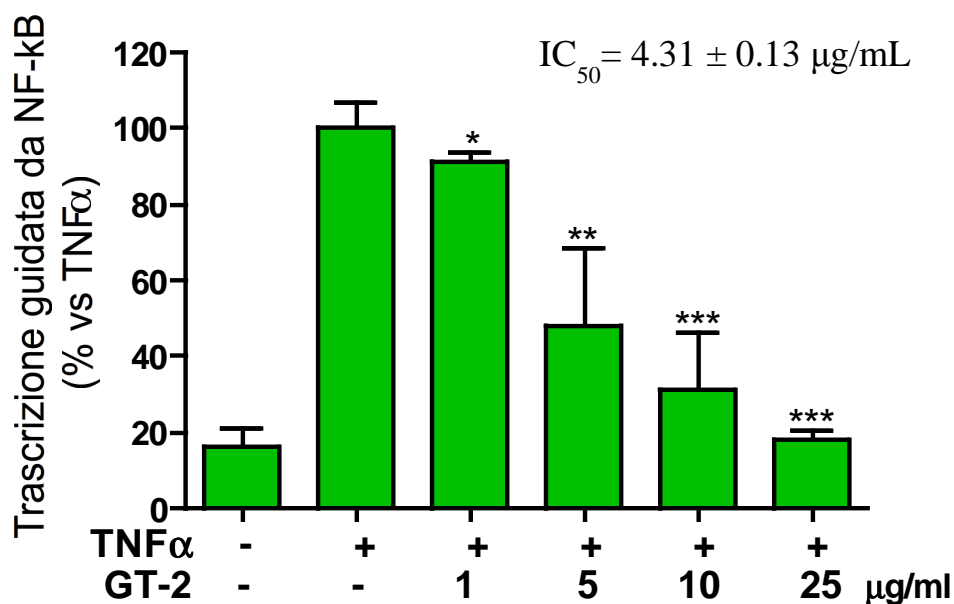
Al fine di valutare il potenziale effetto antinfiammatorio degli estratti di tè verde e nero, abbiamo saggiato la capacità di tali composti nell'inibire la trascrizione mediata da NF-kB in cellule AGS sottoposte a stimolo infiammatorio (TNF). Attraverso il saggio dell'attività luciferasica è stato perciò valutato se gli estratti fossero in grado di ridurre l'espressione NF-kB-dipendente del gene reporter utilizzato. I risultati sono riportati nelle Figure 5.27-5.35.



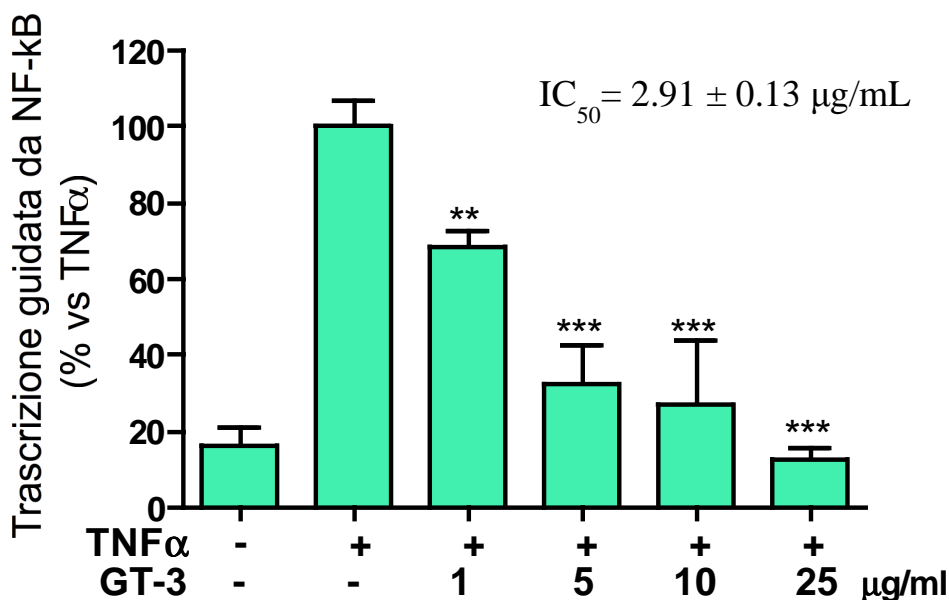
**Figura 5.27** – Effetto dell’ estratto commerciale di tè verde (GTE) sulla trascrizione mediata da NF-kB in cellule AGS sottoposte a stimolazione pro-infiammatoria con Tumor Necrosis Factor alfa (TNF- $\alpha$  (10 ng/mL). L’analisi è stata effettuata mediante saggio della luciferasi. I dati sono espressi in percentuale rispetto al controllo stimolato (cellule sottoposte esclusivamente a stimolo infiammatorio), a cui è stato assegnato arbitrariamente il valore del 100%.  $IC_{50}$  = concentrazione di estratto necessaria ad inibire del 50% la trascrizione guidata da NF-kB. \* $p < 0.05$  \*\*;  $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .



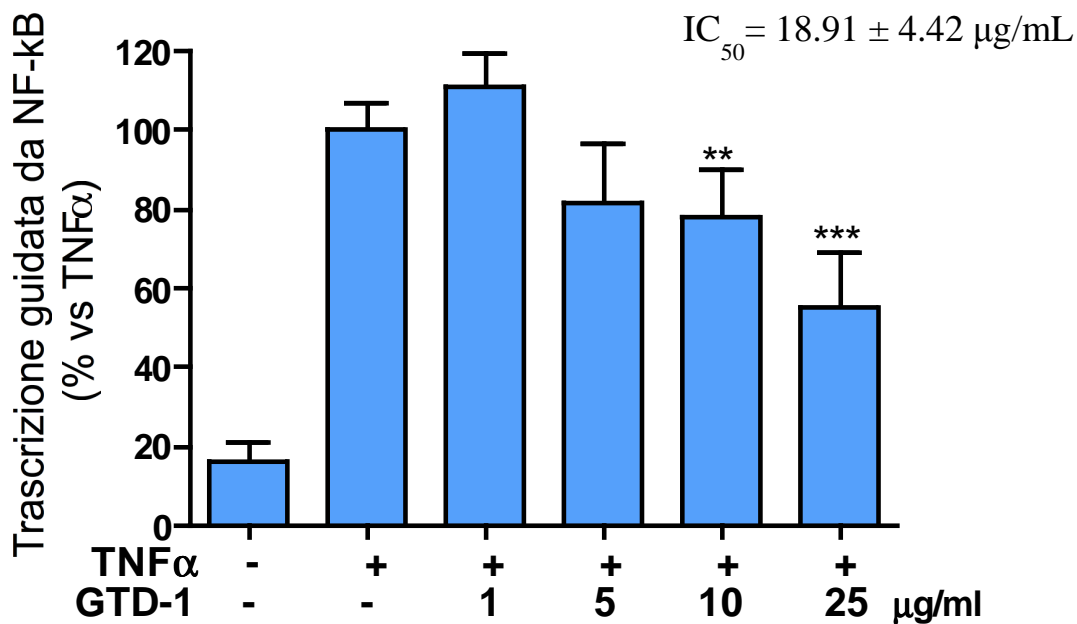
**Figura 5.28** – Effetto dell’ estratto commerciale di tè verde 1 (GTI-1) sulla trascrizione mediata da NF-kB in cellule AGS sottoposte a stimolazione pro-infiammatoria con Tumor Necrosis Factor alfa (TNF- $\alpha$  (10 ng/mL). L’analisi è stata effettuata mediante saggio della luciferasi. I dati sono espressi in percentuale rispetto al controllo stimolato (cellule sottoposte esclusivamente a stimolo infiammatorio), a cui è stato assegnato arbitrariamente il valore del 100%.  $IC_{50}$  = concentrazione di estratto necessaria ad inibire del 50% la trascrizione guidata da NF-kB.  $p < 0.05$  \*\*;  $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .



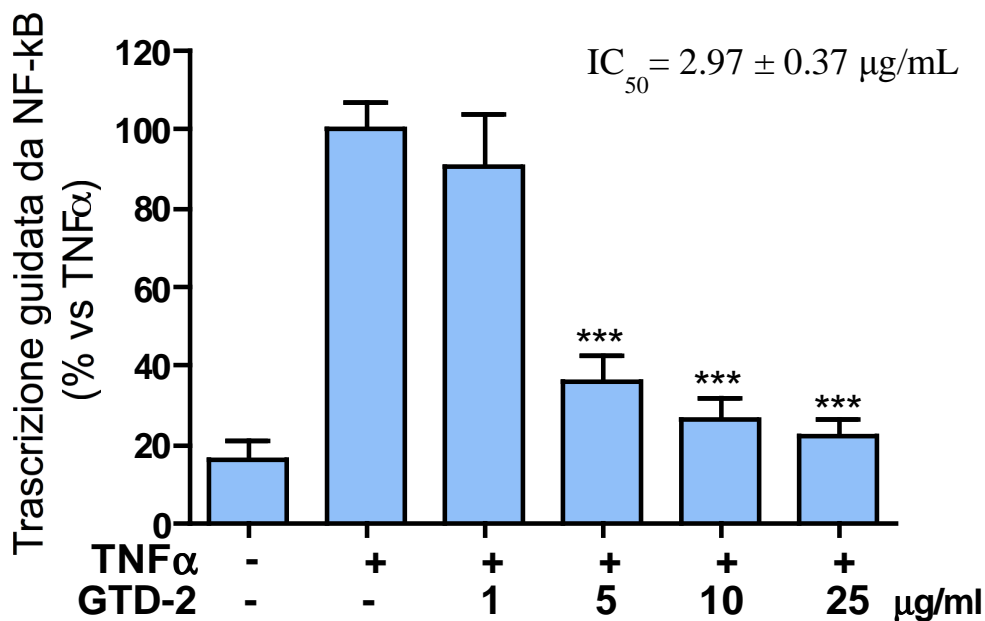
**Figura 5.29** – Effetto dell’ estratto commerciale di tè verde 2 (GTI-2) sulla trascrizione mediata da NF-kB in cellule AGS sottoposte a stimolazione pro-infiammatoria con Tumor Necrosis Factor alfa (TNF- $\alpha$  (10 ng/mL). L’analisi è stata effettuata mediante saggio della luciferasi. I dati sono espressi in percentuale rispetto al controllo stimolato (cellule sottoposte esclusivamente a stimolo infiammatorio), a cui è stato assegnato arbitrariamente il valore del 100%. IC<sub>50</sub> = concentrazione di estratto necessaria ad inibire del 50% la trascrizione guidata da NF-kB. p<0.05 \*\*; p<0.01; \*\*\*p<0.001.



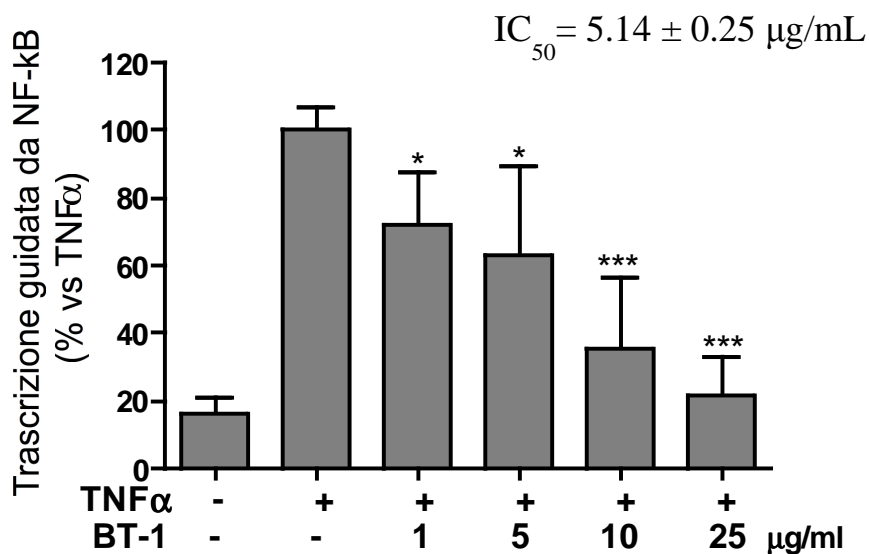
**Figura 5.30** – Effetto dell’ estratto commerciale di tè verde 3 (GTI-3) sulla trascrizione mediata da NF-kB in cellule AGS sottoposte a stimolazione pro-infiammatoria con Tumor Necrosis Factor alfa (TNF- $\alpha$  (10 ng/mL). L’analisi è stata effettuata mediante saggio della luciferasi. I dati sono espressi in percentuale rispetto al controllo stimolato (cellule sottoposte esclusivamente a stimolo infiammatorio), a cui è stato assegnato arbitrariamente il valore del 100%. IC<sub>50</sub> = concentrazione di estratto necessaria ad inibire del 50% la trascrizione guidata da NF-kB. p<0.05 \*\*; p<0.01; \*\*\*p<0.001.



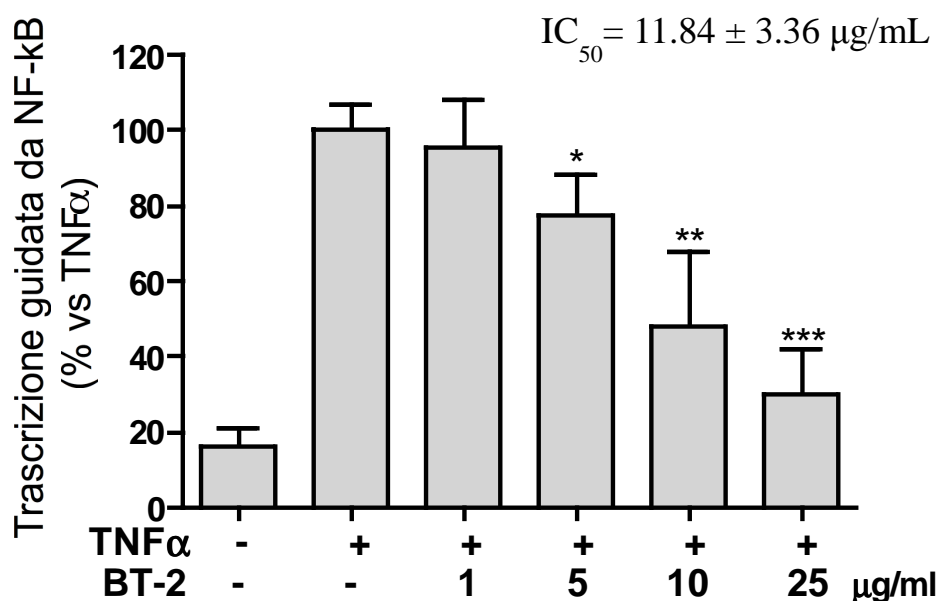
**Figura 5.31** – Effetto dell' estratto commerciale di tè verde decaffeinato 1 (GTID-1) sulla trascrizione mediata da NF-kB in cellule AGS sottoposte a stimolazione pro-infiammatoria con Tumor Necrosis Factor alfa (TNF- $\alpha$  (10 ng/mL). L'analisi è stata effettuata mediante saggio della luciferasi. I dati sono espressi in percentuale rispetto al controllo stimolato (cellule sottoposte esclusivamente a stimolo infiammatorio), a cui è stato assegnato arbitrariamente il valore del 100%.  $IC_{50}$  = concentrazione di estratto necessaria ad inibire del 50% la trascrizione guidata da NF-kB.  $p < 0.05$  \*\*;  $p < 0.01$ ; \*\* $p < 0.001$ .



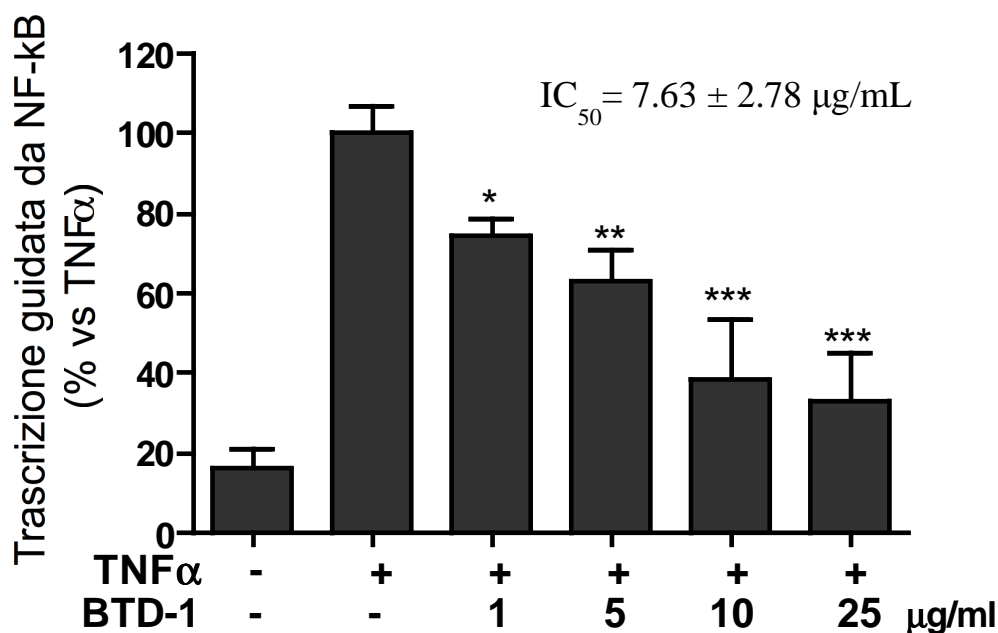
**Figura 5.32** – Effetto dell' estratto commerciale di tè verde decaffeinato 2 (GTID-2) sulla trascrizione mediata da NF-kB in cellule AGS sottoposte a stimolazione pro-infiammatoria con Tumor Necrosis Factor alfa (TNF- $\alpha$  (10 ng/mL). L'analisi è stata effettuata mediante saggio della luciferasi. I dati sono espressi in percentuale rispetto al controllo stimolato (cellule sottoposte esclusivamente a stimolo infiammatorio), a cui è stato assegnato arbitrariamente il valore del 100%.  $IC_{50}$  = concentrazione di estratto necessaria ad inibire del 50% la trascrizione guidata da NF-kB.  $p < 0.05$  \*\*;  $p < 0.01$ ; \*\* $p < 0.001$ .



**Figura 5.33** – Effetto dell’ estratto commerciale di tè nero 1 (BTI-1) sulla trascrizione mediata da NF-kB in cellule AGS sottoposte a stimolazione pro-infiammatoria con Tumor Necrosis Factor alfa (TNF- $\alpha$  (10 ng/mL). L’analisi è stata effettuata mediante saggio della luciferasi. I dati sono espressi in percentuale rispetto al controllo stimolato (cellule sottoposte esclusivamente a stimolo infiammatorio), a cui è stato assegnato arbitrariamente il valore del 100%. IC<sub>50</sub> = concentrazione di estratto necessaria ad inibire del 50% la trascrizione guidata da NF-kB. p<0.05 \*\*; p<0.01; \*\*\*p<0.001.



**Figura 5.34** – Effetto dell’ estratto commerciale di tè nero 2 (BTI-2) sulla trascrizione mediata da NF-kB in cellule AGS sottoposte a stimolazione pro-infiammatoria con Tumor Necrosis Factor alfa (TNF- $\alpha$  (10 ng/mL). L’analisi è stata effettuata mediante saggio della luciferasi. I dati sono espressi in percentuale rispetto al controllo stimolato (cellule sottoposte esclusivamente a stimolo infiammatorio), a cui è stato assegnato arbitrariamente il valore del 100%. IC<sub>50</sub> = concentrazione di estratto necessaria ad inibire del 50% la trascrizione guidata da NF-kB. p<0.05 \*\*; p<0.01; \*\*\*p<0.001.



**Figura 5.35** – Effetto dell’ estratto commerciale di tè nero decaffeinato 1 (BTD-1) sulla trascrizione mediata da NF-kB in cellule AGS sottoposte a stimolazione pro-infiammatoria con Tumor Necrosis Factor alfa (TNF- $\alpha$ ) (10 ng/mL). L’analisi è stata effettuata mediante saggio della luciferasi. I dati sono espressi in percentuale rispetto al controllo stimolato (cellule sottoposte esclusivamente a stimolo infiammatorio), a cui è stato assegnato arbitrariamente il valore del 100%. IC<sub>50</sub> = concentrazione di estratto necessaria ad inibire del 50% la trascrizione guidata da NF-kB. p<0.05 \*\*; p<0.01; \*\*\*p<0.001.

Considerati i risultati contrastanti degli studi d’intervento nell’uomo relativi all’attività anti-infiammatoria del tè verde e nero e la necessità di studiare modelli alternativi *in vitro* che possano, quindi, mimare le condizioni *in vivo*, è stata valutato l’effetto esercitato di estratti acquosi di tè verde e nero su un modello cellulare di infiammazione gastrica: cellule di adenocarcinoma gastrico umano sottoposte a stimolazione con TNF alla concentrazione di 10 ng/mL, citochina pro-infiammatoria rilasciata in abbondante quantità dalle cellule del sistema immunitario in presenza di una infezione da parte dell’*Helicobacter pylori*; la scelta di utilizzare tale citochina pro-infiammatoria ha, come razionale, il tentativo di mimare il più possibile l’infiammazione gastrica indotta dall’infezione da tale patogeno (gastrite Hp-correlata). Come già accennato, gli effetti degli infusi di tè verde e nero non sono ancora stati studiati a livello gastrico; inoltre, considerando

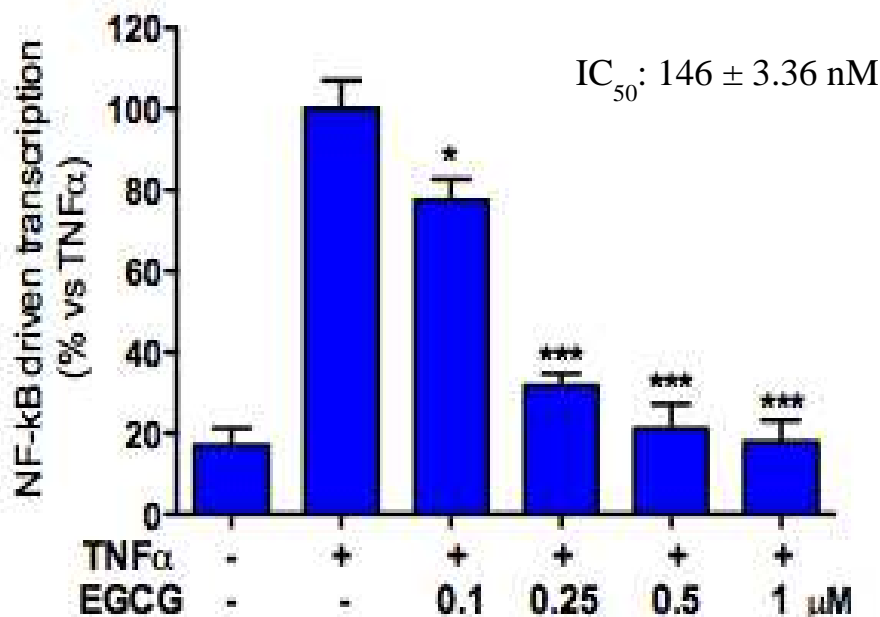
anche alcune evidenze epidemiologiche circa l'effetto di riduzione del rischio di sviluppare gastrite cronica associato al consumo di tè nero, la nostra attenzione si è focalizzata al livello gastrico sulla modulazione, da parte degli estratti tè verde e nero, del pathway di NF-kB, notoriamente coinvolto nei processi infiammatori. Tutti gli estratti, seppure con diverso grado di attività (valori di  $IC_{50}$  compresi tra 2.47 e 18.91  $\mu\text{g/mL}$ ), presentano un'inibizione concentrazione dipendente sulla trascrizione guidata da NF-kB. Infatti, alla concentrazione massima di 25  $\mu\text{g/mL}$  (10  $\mu\text{g/mL}$  per l'estratto di tè verde commerciale), la trascrizione risulta totalmente inibita e torna ai livelli basali, ovvero a quelli del controllo non stimolato. Ciò risulta particolarmente evidente per gli estratti di verde; tra questi l'estratto di tè verde commerciale è risultato il più attivo, seguito dal tè verde 3, tè verde 1 e tè verde 2. Infatti, l'estratto di tè verde commerciale ha ridotto la trascrizione guidata da NF-kB alla concentrazione di 0.98  $\mu\text{g/mL}$  ( $IC_{50} = 0.98 \mu\text{g/mL}$ ), mentre il tè verde 3, 1 e 2 alla concentrazione di 2.47  $\mu\text{g/mL}$ , 2,91  $\mu\text{g/mL}$  e 4.31  $\mu\text{g/mL}$ , rispettivamente. I due tè decaffeinati verdi presentano un grado di attività molto differente: i valori di  $IC_{50}$  sono risultati 18.91  $\mu\text{g/mL}$  per il GTID-1 rispetto a 2.97  $\mu\text{g/mL}$  per il GTID-2, quest'ultimo molto simile agli estratti di tè verde. Ciò è probabilmente dovuto ai bassi livelli di catechine e altri composti fenolici nel GTDI-1. Per quanto riguarda gli estratti di tè nero, pur essendo meno attivi di quelli di tè verde, essi sono risultati comunque attivi nell'inibire la trascrizione guidata da NF-kB (valori di  $IC_{50}$  compresi tra 5.14 e 11.84  $\mu\text{g/mL}$ ). Il BTE-1, in particolare, è risultato in grado di inibire del 50% la trascrizione di NF-kB alla concentrazione di 5.14  $\mu\text{g/mL}$  ( $IC_{50}$ ), e di riportarla ai livelli basali (corrispondenti all'assenza di stimolazione), alla concentrazione massima testata di 25  $\mu\text{g/mL}$ . Il tè nero 2 (BTI-2) è risultato quello meno attivo; infatti, ha inibito del 50% la trascrizione guidata da NF-kB alla concentrazione di 11.84  $\mu\text{g/mL}$  ( $IC_{50}$ ). Tali risultati, sebbene debbano essere confermati *in vivo*, possono in parte giustificare e supportare i dati epidemiologici relativi agli effetti benefici del tè nero.

Il meccanismo d'azione alla base dell'effetto dell'inibizione della trascrizione guidata da NF-kB è ancora ignoto, ma è possibile ipotizzare che le sostanze attive

(catechine) agiscono a monte della fase di traslocazione di NF- $\kappa$ B a livello nucleare. Infatti, tutti gli estratti di tè sono in grado di ridurre la trascrizione mediata da NF- $\kappa$ B nel modello cellulare utilizzato. Tale tipo di analisi, ovvero la valutazione dell'inibizione della trascrizione dei geni target di NF- $\kappa$ B, tuttavia, impedisce di sapere a che livello le sostanze sono in grado di agire. Le sostanze potrebbero infatti interferire sia a livello del legame del fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B con il DNA che più a monte, impedendo, ad esempio, la traslocazione di NF- $\kappa$ B a livello nucleare o il legame delle citochine pro-infiammatorie utilizzate come stimolo ai loro specifici recettori (TNFR1 per il Tumor Necrosis Factor). E' importante sottolineare che l'attività antinfiammatoria esercitata dagli estratti, sia di tè verde che nero, si manifesta a concentrazioni estremamente basse, in molti casi addirittura inferiori a 25  $\mu$ g/mL (come nel caso dell'estratto commerciale di tè verde), valori che si ritengono facilmente raggiungibili in seguito all'ingestione di una tazza di infuso di tè (circa 200 mL), specie se si considera che le catechine presenti in una tale porzione sono in media circa 70 mg per il tè verde e 15 mg per il tè nero (Cabrera et al., 2006) e che, considerando la diluizione dovuta alla presenza del succo gastrico (circa 20 mL) si ottiene una concentrazione di circa 3.5 mg/mL per il tè verde e 0.75 mg/mL per il tè nero, molto più elevata rispetto alle concentrazioni a cui osserviamo l'attività biologica. Inoltre, bisogna considerare che tali sostanze, per raggiungere il distretto gastrico, non necessitano di alcun assorbimento né la loro concentrazione è ridotta da processi metabolici.

Per verificare il contributo delle singole catechine all'attività biologica, è stato effettuato il saggio di NF- $\kappa$ B utilizzando i composti puri alle concentrazioni comprese tra 0.1 e 10  $\mu$ M. I risultati sono rappresentati in Figura 5.36.





**EGC: 30% inibizione alla concentrazione di 10 μM**

**EC: inattiva alla concentrazione di 10 μM**

**Caffeina: inattiva alla concentrazione di 10 μM**

**Figura 5.36** - Effetto dell'EGCG sulla trascrizione mediata da NF-kB in cellule AGS sottoposte a stimolazione pro-infiammatoria con TNF (10 ng/mL). L'analisi è stata effettuata mediante saggio della luciferasi. I dati sono espressi in percentuale rispetto al controllo stimolato (cellule sottoposte esclusivamente a stimolo infiammatorio), a cui è stato assegnato arbitrariamente il valore del 100%. IC<sub>50</sub> = concentrazione di catechina necessaria ad inibire del 50% la trascrizione guidata da NF-kB. p<0.05 \*\*; p<0.01; \*\*\*p<0.001.

L'EGCG è risultata la catechina più attiva nell'inibizione della trascrizione guidata da NF-kB (IC<sub>50</sub> = 146 nM); invece, l'EGC, alla concentrazione di 10 μM, ha determinato solo il 30% dell'inibizione, mentre l'EC e la caffeina sono risultate inattive alle medesime concentrazioni (non mostrato). Considerando i quantitativi di EGCG nei campioni analizzati e il suo valore di IC<sub>50</sub> sull'attività dell'NF-kB, è possibile dedurre che tale catechina sia l'unica responsabile dell'effetto biologico *in vitro*. L'elevata potenza dell'EGCG nell'inibizione della trascrizione guidata da NF-kB potrebbe quindi spiegare il motivo per cui gli estratti di nero, pur presentando un basso quantitativo di EGCG, risultino comunque attivi. Da queste osservazioni possiamo quindi concludere che il modello *in vitro* utilizzato in questo studio può rappresentare un'utile alternativa agli studi nell'uomo che, come già ricordato, risultano di difficile esecuzione sia in termini di costi che di oggettiva complessità

nella definizione di parametri fisiologici. Negli studi *in vivo* raccolti, infatti, è stata evidenziata un'elevata variabilità nei risultati, dipendente da diversi fattori quali ad esempio, il tipo di estratto utilizzato (spesso non caratterizzato), la presenza di patologie concomitanti e lo stile di vita.

In questo senso, emerge il potenziale degli studi *in vitro* che prevedano anche l'utilizzo di estratti ben caratterizzati.

#### **5.13.4 Determinazione dell'attività antiossidante**

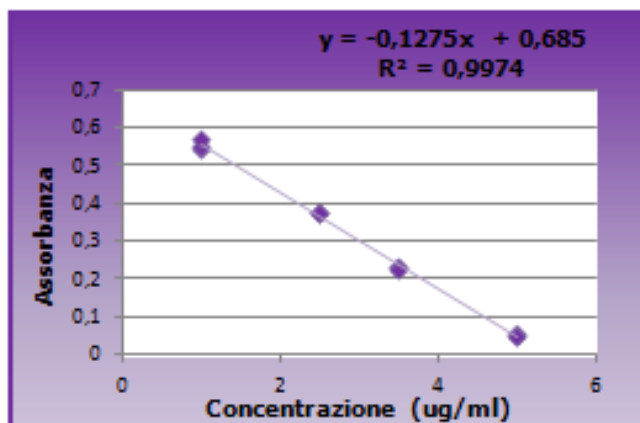
Numerose evidenze scientifiche suggeriscono che i processi infiammatori portano ad una elevata produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), tra cui il perossido di idrogeno, e che l'ossidazione di NF-kB da parte di tali specie radicaliche determina l'inibizione del legame al DNA di tale fattore nucleare (Toledano e Leonard, 1991). Di conseguenza, composti che presentino attività scavenger nei confronti delle specie radicaliche e proprietà anti-infiammatorie, potrebbero risultare utili nella riduzione del rischio di sviluppare l'infiammazione gastrica. È stata quindi testata la capacità antiossidante degli estratti di tè verde e nero attraverso il saggio del DPPH. I vantaggi di questo tipo di test sono riconducibili alla semplicità, all'applicabilità ad analisi di routine e alla possibilità di effettuazione a differenti pH. Gli svantaggi, invece, sono attribuibili al fatto che il risultato spesso dipende non solo dalla capacità antiossidante del campione, ma anche dal comportamento cinetico delle sostanze antiossidanti che lo compongono. Il radicale DPPH è artificiale, non presente cioè in ambiente fisiologico, e può dare risposte a volte differenti e non confrontabili tra loro se vengono comparati antiossidanti diversi tra loro per struttura e meccanismo d'azione (Prior et al., 2005).

### 5.13.4.1 Retta di calibrazione per il dosaggio del potere antiossidante e analisi dei campioni

Innanzitutto è stata costruita la retta di calibrazione per la determinazione del potere antiossidante dei campioni in esame. Le concentrazioni standard di acido gallico sono state correlate alle letture spettrofotometriche ed integrate mediante regressione lineare. Ogni analisi è stata effettuata in triplo. Nella Tabella 5.31 sono riportate le concentrazioni delle soluzioni standard di acido gallico utilizzate per l'analisi spettrofotometrica e i valori di assorbanza corrispondenti, mentre la retta di calibrazione ottenuta è illustrata nella Figura 5.37.

**Tabella 5.31** – Concentrazioni di acido gallico standard utilizzate e relativa assorbanza

Concentrazione (µg/mL)	Assorbanza
1	0,5435
1	0,5501
1	0,5729
2,5	0,3723
2,5	0,3752
2,5	0,3786
3,5	0,2321
3,5	0,2308
3,5	0,2249
5	0,0529
5	0,0496
5	0,0483



**Figura 5.37** – Retta di calibrazione per il dosaggio del potere antiossidante

Il coefficiente di correlazione,  $R^2$ , vicino a 1 (0,9974), indica una risposta lineare ottimale per l'intervallo di concentrazioni considerate.

#### 5.13.4.2 Attività antiossidante dei campioni

Sui campioni, allestiti come descritto nella sezione “Metodi”, è stata eseguita, in triplicato, la reazione colorimetrica per la determinazione del potere antiossidante; mediante lo spettrofotometro, è stata effettuata la lettura dell’assorbanza, a 517 nm, dei campioni e, successivamente, utilizzando la retta di calibrazione, è stata calcolata la capacità antiossidante. In Tabella 5.32 sono riportati i valori di attività antiossidante dei campioni, espressi come mg GA/g; essi sono stati confrontati con i valori di IC<sub>50</sub> di ciascun campione, ovvero con la concentrazione necessaria ad inibire del 50% la trascrizione guidata da NF-κB.

**Tabella 5.32** – Relazione tra attività anti-infiammatoria e attività antiossidante degli estratti di tè verde e nero

Campione	Valori di IC <sub>50</sub> relativi alla trascrizione guidata da NF-κB μg/mL (media ± DS)	Attività antiossidante (DPPH) mg GA/g (media ± DS)
GTE	0.98 ± 0.04	451.15 ± 6.97
GTI-1	2.91 ± 0.13	196.30 ± 13.03
GTI-2	4.31 ± 0.13	202.00 ± 2.52
GTI-3	2.47 ± 0.36	69.40 ± 0.06
GTID-1	18.91 ± 4.42	19.3 ± 0.41
GTID-2	297 ± 0.37	135.7 ± 1.46
BTI-1	5.14 ± 0.25	48.70 ± 0.07
BTI-2	11.84 ± 3.36	28.5 ± 0.78
BTID-1	7.63 ± 2.78	46.2 ± 1.97

Dai dati riportati in Tabella 5.32 è possibile osservare che, in linea generale, gli estratti di tè verde presentano un’elevata capacità antiossidante, mentre quella relativa agli estratti di tè nero è risultata di circa 4 volte inferiore. L’attività antiossidante è determinata principalmente dalle catechine; infatti, dati di letteratura

riportano che l'EGCG presenta un'attività scavenger molto elevata a concentrazioni molto basse, comprese nell'intervallo 1-10  $\mu\text{M}$  (Chen e Ho, 1995), concentrazioni senza dubbio riscontrabili negli estratti analizzati. Tali dati sono stati confermati sperimentalmente: l'EGCG, infatti, ha determinato un abbattimento radicalico del 50% alla concentrazione di 3.92  $\mu\text{M}$ , seguita dall'ECG (4.86  $\mu\text{M}$ ) e dall'EC (5.50  $\mu\text{M}$ ). L'estratto di tè verde commerciale è quello che ha presentato una capacità antiossidante maggiore: ciò è probabilmente dovuto al più elevato contenuto in catechine e composti fenolici. Inoltre, l'attività anti-infiammatoria è risultata inversamente correlata all'attività antiossidante in tutti i campioni analizzati ( $r = 0.64$ ). Lo studio *in vitro* dell'attività antiossidante del tè verde risulta in accordo con gli studi *in vivo* raccolti. Infatti, la riduzione dello stress ossidativo, in particolare in soggetti sani, è stata evidenziata in un numero elevato di studi nell'uomo (Erba, 2005; Nantz, et al., 2009; Oyama, 2010; Freese, 1999; Nagaya, et al., 2004; Klaunig, 1999; Nagao, et al., 2005; Panza, 2008; Hodgson, 2000), confermando, ancora una volta, l'utilità dei modelli *in vitro* nella valutazione di parametri fisiologici di più difficile esecuzione in condizioni *in vivo*. Inoltre, i dati ottenuti saranno integrati da ulteriori studi biologici che tengano conto del metabolismo dei principi attivi a livello gastro-intestinale.

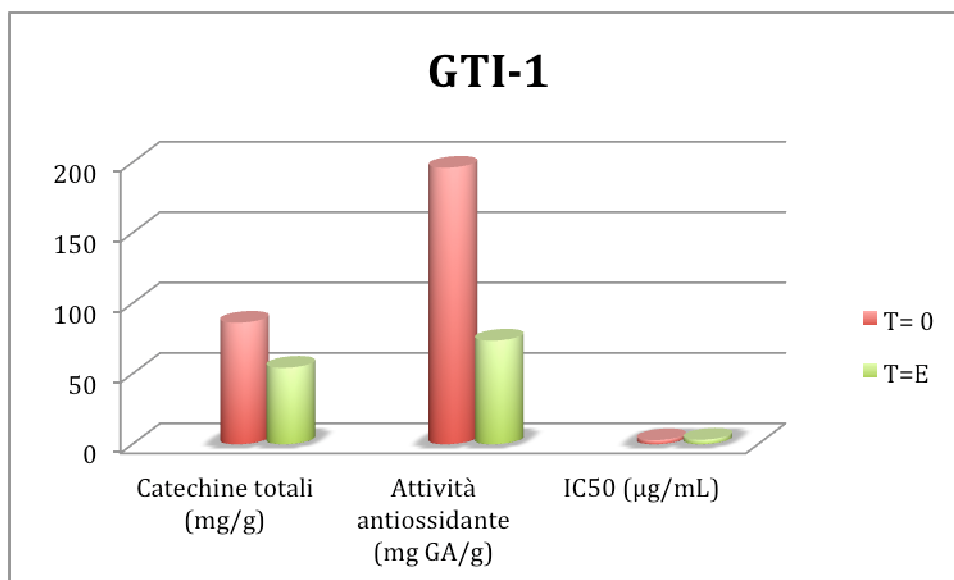
#### **5.14 Valutazione della stabilità delle catechine**

Alcuni campioni di tè verde (il tè verde 1 e il tè verde decaffeinato 2) sono stati analizzati anche alla data di scadenza riportata sulla confezione al fine di valutare la stabilità delle catechine e l'eventuale effetto della diminuzione dei livelli di tali composti sull'attività biologica e antiossidante. La scelta di questi campioni si è basata sull'elevato quantitativo di catechine presente, che consente di apprezzare in misura maggiore le eventuali variazioni di composti attivi nel tempo.

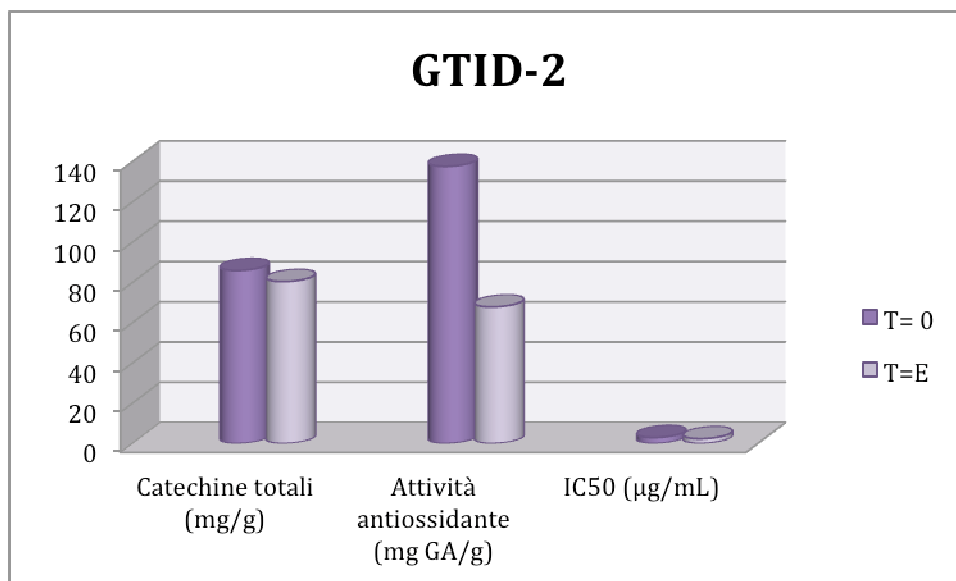
I risultati sono riportati in Tabella 5.33 e rappresentati nelle Figure 5.38 e 5.39.

**Tabella 5.33** – Contenuto di catechine totali (mg/g), valori di IC<sub>50</sub> (μg/mL) e attività antiossidante (mg GA/g) di due estratti di tè verde analizzati il giorno dell'apertura della confezione (T=0) e alla scadenza (T=E)

Campione	Catechine totali mg/g (media ± DS)	Attività antiossidante	Trascrizione guidata da NF-κB IC <sub>50</sub> μg/mL (media ± DS)
		mg GA/g (media ± DS)	
GT-1 T 0	86.03 ± 6.91	196.3 ± 13.03	2.91 ± 0.13
GTI-1 T E	54.35 ± 1.13	73.6 ± 2.3	3.22 ± 0.47
GTID-2 T 0	85.96 ± 5.96	135.7 ± 1.46	2.97 ± 0.37
GTID-2 T E	80.48 ± 4.82	67.8 ± 0.09	2.37 ± 0.36



**Figura 5.38** – Contenuto di catechine totali (mg/g), valori di IC<sub>50</sub> (μg/mL) e attività antiossidante (mg GA/g) dell'estratto di tè verde GTI-1 analizzato il giorno dell'apertura della confezione (T=0) e alla scadenza (T=E)



**Figura 5.39** – Contenuto di catechine totali (mg/g), valori di IC<sub>50</sub> (µg/mL) e attività antiossidante (mg GA/g) dell’estratto di tè verde GTID-2 analizzato il giorno dell’apertura della confezione (T=0) e alla scadenza (T=E)

Dai dati riportati in Tabella 5.33 e dai grafici nelle Figure 5.38 e 5.39, alla scadenza del campione GTI-1 si osserva, rispetto al T=0, corrispondente ai mesi che mancavano alla scadenza al momento dell’apertura della confezione (8 e 13 mesi per il GT-1 e GTID-2, rispettivamente) una riduzione del quantitativo totale di catechine del 37%, mentre nel campione GTID-2 tale riduzione risulta trascurabile (6%). Ad oggi, la stabilità delle catechine è stata ancora poco studiata. Nello studio di Friedman et al. (2009) è stata valutata la stabilità delle catechine in otto campioni di tè commerciali durante i primi sei mesi dopo l’apertura della confezione. L’autore riporta una riduzione totale del 32% dopo due mesi di conservazione, mentre nei rimanenti quattro mesi non sono state evidenziate ulteriori diminuzioni (Friedman et al., 2009). Nel presente studio, la diminuzione più elevata si verifica nel tè che inizialmente era più vicino alla scadenza (GT-1), in accordo con quanto riportato nello studio di Friedman et al. (2009), mentre per il GTID-2 i risultati di discostano da quanto riportato in letteratura. E’ possibile che ciò dipenda anche dalla quantità di altri antiossidanti come la vitamina C, miracetina e kemferolo in quanto

sono riportate elevate differenze quantitative di questi composti tra tè prodotti in zone e climi differenti (Friedman et al., 2009).

L'attività antiossidante risulta diminuita in entrambi i campioni analizzati (62% nel GTI-1 e 51% nel GTDI-2) indipendentemente dal contenuto di catechine, suggerendo che probabilmente altri composti contribuiscono all'attività antiossidante. Per quanto riguarda l'attività anti-infiammatoria, l'effetto sulla trascrizione guidata da NF-kB non sembra diminuire al T=E; infatti, i valori di IC<sub>50</sub> non risultano essere significativamente differenti rispetto al T=0, suggerendo che l'EGCG raggiunge ancora le concentrazioni necessarie per influenzare l'attività dell'NF-kB. Tuttavia, nel GTI-1 la riduzione delle catechine è associata ad un aumento, seppur non significativo, del valore di IC<sub>50</sub>.



## 6. CONCLUSIONI

Il mercato degli integratori alimentari a base erboristica ha subito, negli ultimi anni, una rapida espansione dovuta principalmente alla percezione, da parte del consumatore, di numerosi vantaggi quali l'efficacia, la sicurezza ed un costo relativamente contenuto. Essi sono regolamentati, a livello europeo, dalla Direttiva 2002/46/CE che ha permesso una parziale armonizzazione di questi prodotti a livello comunitario. Tuttavia, rimangono molte problematiche ancora irrisolte circa la valutazione della sicurezza e del beneficio relativi all'uso di tali prodotti. Infatti, molto spesso gli integratori a base vegetale possono contenere differenti tipi di sostanze (fitocomplessi), derivanti dal metabolismo primario e secondario della pianta, che possono influenzare (in maniera non sempre positiva) l'attività biologica e la biodisponibilità dei principi attivi. Sono presenti, inoltre, altre problematiche inerenti alla sicurezza degli integratori alimentari a base vegetale; esse includono: 1) la corretta identificazione delle specie botaniche e delle varietà utilizzate negli integratori; 2) l'estrema variabilità dei fitocomplessi derivanti da una stessa specie, varietà e parte della pianta utilizzata, dovuta alle caratteristiche della zona di coltivazione, fase di sviluppo della pianta, condizioni di conservazione dopo la raccolta e processi di lavorazione; 3) possibile contaminazione della matrice vegetale di partenza con altre piante; 4) la presenza, nel materiale vegetale di partenza, di sostanze tossiche o comunque non desiderabili.

A ciò si aggiunge la problematica, spesso sottovalutata, degli effetti avversi, dovuta in parte al fatto che i consumatori, essendo gli integratori alimentari prodotti di libera vendita, tendono spesso a non consultare o informare il medico circa l'utilizzo di questi prodotti. A questo proposito, sono molti gli esempi, descritti in letteratura, di eventi avversi causati da interazioni tra piante e farmaci o tra diverse tipologie di ingredienti vegetali.

Inoltre, occorre sottolineare che per molte piante non esistono ancora dati scientifici validati nell'uomo. Ciò è dovuto principalmente al fatto che molte piante hanno una lunga tradizione d'uso nei Paesi europei, e pertanto, secondo la normativa comunitaria, per esse non sono previsti studi nell'uomo al fine di

valutarne l'efficacia e la sicurezza. I dati nell'uomo relativi agli aspetti benefici, sono tuttavia richiesti dall'EFSA per i claims salutistici che le aziende intendono utilizzare.

In quest'ambito è stato inquadrato il progetto europeo PlantLIBRA, il quale si pone come principali obiettivi l'ampliamento della conoscenza relativa agli integratori alimentari a base erboristica e alle piante utilizzate come ingredienti in tali prodotti, in relazione alla loro efficacia e sicurezza. A questo scopo il progetto ha previsto una prima fase di ricerca dei dati già pubblicati relativi alla composizione fitochimica, ai metodi analitici per la caratterizzazione degli ingredienti vegetali di integratori e ai metodi per la valutazione degli effetti benefici e negativi associati al consumo di tali prodotti. Questi dati saranno integrati con nuovi studi per la valutazione dell'efficacia e della sicurezza soprattutto relativamente a quelle piante per le quali le evidenze scientifiche sono ancora scarse.

Nell'ambito della valutazione del beneficio sono state identificate alcune aree di studio, tra cui quella infiammatoria, e dieci piante considerate rilevanti in ogni area di interesse. Per l'area infiammatoria le piante selezionate sono: *Olea europea* L., *Camellia sinensis* L., *Vitis vinifera* L., *Matricaria recutita* L., *Boswellia serrata* L., *Curcuma longa* L., *Calendula officinalis* L., *Symphytum officinalis* L., *Harpagophytum procumbens* L., *Urtica dioica* L.

Per queste piante è stata eseguita una revisione sistematica della letteratura che ha permesso di evidenziare alcuni aspetti:

- 1) le principali condizioni nelle quali le piante oggetto di studio sono utilizzate includono l'osteoartrite, patologie gastrointestinali (pancreatite, colite ulcerosa, gastrite), diabete di tipo II e infiammazione associata a patologie cardiovascolari ed epatiche;
- 2) la necessità, nonostante le evidenze positive, di ulteriori studi relativi alla *Vitis vinifera* L., *Matricaria recutita* L., *Olea europea* L., *Urtica dioica* L., *Harpagophytum procumbens* L. e *Boswellia serrata* L. Roxb.;
- 3) la *Camellia sinensis* L. (in particolare il tè verde), nonostante numerosi studi in diverse aree ne riportino gli effetti benefici, ha dato risultati contrastanti nel ridurre le condizioni infiammatorie in patologie croniche come il diabete

e il sindrome metabolica. Qualche evidenza positiva sembra invece emergere per quanto riguarda la riduzione dello stress ossidativo sia per il tè verde che per il tè nero e nella riduzione del rischio di sviluppare gastrite per il tè nero;

- 4) la *Curcuma longa*, la quale, pur riducendo alcuni parametri infiammatori, non sembra apportare benefici in termini di miglioramento della sintomatologia associata all'infiammazione in patologie osteoarticolari.

Oltre alla scarsità degli studi, i fattori principali che ostacolano la valutazione degli effetti benefici sono l'insufficiente caratterizzazione fitochimica degli estratti o della matrice vegetale, l'elevata eterogeneità delle posologie utilizzate negli studi. Inoltre, esiste un'oggettiva difficoltà nell'esecuzione di studi nell'uomo sia in termini di costi che di complessità nella definizione di parametri fisiologici. Da qui deriva l'importanza di modelli alternativi che possano mimare le condizioni fisiologiche *in vivo* e consentire, quindi, di ottenere dati significativi per eventuali claims salutistici. Negli studi *in vivo* raccolti, infatti, è stata evidenziata un'elevata variabilità nei risultati, dipendente da diversi fattori quali ad esempio, il tipo di estratto utilizzato (spesso non caratterizzato), la presenza di patologie concomitanti e lo stile di vita. L'effetto del tè, sia verde che nero, sul TNF- $\alpha$ , quale parametro indicante l'attivazione endoteliale in soggetti sani fumatori, è stato valutato solo in uno studio (de Maat et al., 2000) che tuttavia, non ha evidenziato effetti positivi. Gli effetti del consumo di tè sul rischio di sviluppare gastrite atrofica sono stati investigati in alcuni studi epidemiologici (Setiawan et al., 2000; Shibata, 2001; Kuhawara et al., 2000) dando risultati contrastanti. Ciò è comprensibile, se si considera che gli studi riguardano popolazioni con differenti stili di vita e abitudini alimentari (es. popolazione giapponese e belga), ed è molto probabile che la tipologia di tè consumata presenti un contenuto fenolico differente.

Da tali studi emerge la necessità di sviluppare modelli *in vitro* che, oltre a riprodurre le condizioni fisiologiche *in vivo*, prevedano anche l'utilizzo di estratti ben caratterizzati.

Partendo da questi presupposti, nel presente studio è stata valutata l'attività anti-infiammatoria (tramite il saggio di NF-kB) di estratti acquosi di tè verde e nero su

cellule di adenocarcinoma gastrico umane (AGS) stimulate con TNF, partendo dall'analisi della composizione fitochimica degli estratti tramite HPLC. I dati relativi all'attività biologica sono stati correlati con l'attività antiossidante degli estratti. Per quanto riguarda l'indagine analitica, i nostri risultati confermano quanto riportato in letteratura, ovvero il maggior livello di catechine e polifenoli nel tè verde rispetto al tè nero, seppur con qualche eccezione. Infatti, un campione di tè verde decaffeinato, ha presentato un contenuto di catechine e polifenoli molto basso (8.35 mg/g e 45.30 mg/g, rispettivamente). I fattori che possono influire sulla variabilità del contenuto di composti fenolici sono diversi; tra questi, assumono particolare importanza la qualità delle foglie di partenza, la stagione della raccolta e le condizioni di conservazione. Nonostante l'ampia variabilità, entrambe le tipologie di tè si sono mostrate attive nell'inibire la trascrizione guidata da NF- $\kappa$ B indotta da TNF a livello gastrico, e l'effetto su questo importante mediatore della risposta infiammatoria cellulare è risultato strettamente correlato al contenuto di catechine e all'attività antiossidante dei campioni analizzati. Lo studio *in vitro* dell'attività antiossidante del tè verde risulta in accordo con gli studi *in vivo* raccolti. Infatti, la riduzione dello stress ossidativo, in particolare in soggetti sani, è stata evidenziata in un numero elevato di studi nell'uomo (Erba, 2005; Nantz, et al., 2009; Oyama, 2010; Freese, 1999; Nagaya, et al., 2004; Klaunig, 1999; Nagao, et al., 2005; Panza, 2008; Hodgson, 2000), confermando, ancora una volta, l'utilità dei modelli *in vitro* nella valutazione di parametri fisiologici di più difficile esecuzione in condizioni *in vivo*.

La valutazione dell'attività biologica delle singole catechine ha permesso di evidenziare che l'EGCG risulta essere la maggiore responsabile dell'attività anti-infiammatoria degli estratti; infatti, essa è risultata attiva a concentrazioni nanomolari. I risultati ottenuti sembrano quindi, in parte, supportare i dati epidemiologici positivi relativi al tè nero suggerendo un potenziale effetto preventivo nei confronti dell'infiammazione gastrica. Inoltre, possono risultare utili anche alle aziende nell'ottica di richiesta di eventuali claims nutrizionali in quanto il modello *in vitro* presentato in alternativa agli studi *in vivo*. Infine, i dati

ottenuti saranno integrati da ulteriori studi biologici che tengano conto del metabolismo dei principi attivi a livello gastro-intestinale.

## BIBLIOGRAFIA

**Abidov M.**, Jimenez Del Rio M., Ramazanov A., Kalyuzhin O., Chkhikvishvili I. (2006). Efficiency of pharmacologically-active antioxidant phytomedicine Radical Fruits in treatment hypercholesteremia at men. *Georgian Med. News* **140**: 78-83.

**Adams L.S.**, Seeram N.P., Aggarwal B.B., Takada Y., Sand D., Heber D. (2006). Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 980-985.

**Aderem A.**, Ulevitch R.J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**: 782–787.

**AIIPA** - Associazione Italiana Industrie Prodotti Alimentari. (2011). Integratori alimentari e ruolo negli stili di vita. Disponibile al sito: [http://www.integratoriebenessere.it/integrazione\\_alimentare/integratori-alimentari-e-ruolo-negli-stili-di-vita\\_1\\_1.htm](http://www.integratoriebenessere.it/integrazione_alimentare/integratori-alimentari-e-ruolo-negli-stili-di-vita_1_1.htm). Ultima consultazione 03-11-2012.

**Akira S.**, Uematsu S., Takeuchi O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**: 783–801.

**Albensi B.C.**, Mattson M.P. (2000). Evidence for the involvement of TNF and NF  $\kappa$ B in hippocampal synaptic plasticity. *Synapse* **35**: 151–159.

**Albers, A.R.**, Varghese S., Vitseva O., Vita J.A., Freedman J.E. (2004). The antiinflammatory effects of purple grape juice consumption in subjects with stable coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**: e179-180.

**Ankolekar C.**, Johnson D., Pinto Mda S., Johnson K., Labbe R., Shetty K. (2011). Inhibitory potential of tea polyphenolics and influence of extraction time against *Helicobacter pylori* and lack of inhibition of beneficial lactic acid bacteria. *Journal of Medicinal Food* **14**: 1321- 1329.

**Apostolakis R.**, Vogiatzi K., Amanatidou V., Spandidos D.A. (2009). Interleukin 8 and cardiovascular disease. *Cardiovascular Research* **84**: 353–360.

**Bailey R.**, Gahche J., Lentino C., Dwyer J., Engel J., Thomas P., Betz J., Sempos C., Picciano M. (2011). Dietary supplements use in the United States. *J Nutr* **141**:261-266.

**Bakker G.C.**, van Erk M.J., Pellis L., Wopereis S., Rubingh C.M., Cnubben N.H., Kooistra T., van Ommen B., Hendriks H.F. (2010). An antiinflammatory dietary mix modulates inflammation and oxidative and metabolic stress in overweight men: a nutrigenomics approach. *Am. J. Clin. Nutr.* **91**: 1044-1059.

**Baldwin A.S.** (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insight. *Annu. Rev. Immunol.* **14**: 649–681.

**Bardia A.**, Nisly N., Zimmerman M., Gryzlak B., Wallace R. (2007). Use of herbs among adults based on evidence-based indications: findings from the National Health Interview Survey. *Mayo Clin. Proc.* **82**: 561-566.

**Barkett M.**, Gilmore T.D. (1999). Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**: 6910–6923.

**Basu A.**, Du M., Sanchez K., Leyva M.J., Betts N.M., Blevins S., Wu M., Aston C.E., Lyons T.J. (2011). Green tea minimally affects biomarkers of inflammation in obese subjects with metabolic syndrome. *Nutrition* **27**: 206-213.

**Becker B.**, Kuhn U., Hardewig-Budny B. (2006). Double-blind, randomized evaluation of clinical efficacy and tolerability of an apple pectin-chamomile extract in children with unspecific diarrhea. *Arzneimittelforschung* **56**: 387-393.

**Bellisle F.**, Diplock A.T., Hornstra G., Kolezko B., Roberfroid M.B., Salminen S., Saris W.H.M. (1998). Functional food science in Europe. *Brit. J. Nutr.* **80**: 1–193.

**Biesalski H.K.**, Aggett P.J., Anton R., Bernstein P.S., Blumberg J., Heaney R.P., Henry J., Nolan J.M., Richardson D.P., van Ommen B., Witkamp R.F., Rijkers G.T.,

Zöllner I. (2011). 26th Hohenheim Consensus Conference, September 11, 2010  
Scientific substantiation of health claims: evidence-based nutrition. *Nutrition* **27**:  
S1-20.

**Bitler** C.M., Matt K., Irving M., Hook G., Yusen J., Eagar F., Kirschner K., Walker B., Crea R. (2007). Olive extract supplement decreases pain and improves daily activities in adults with osteoarthritis and decreases plasma homocysteine in those with rheumatoid arthritis. *Nutr. Res.* **27**: 470-477.

**Bonizzi** G., Karin M. (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* **25**: 280-288.

**Bodger** K., Crabtree J.E. (1998). *Helicobacter pylori* and gastric inflammation *Br. Med. Bull.* **54**: 139–150.

**Braca** A., Dal Piaz F., Marzocco S., Autore G., Vassallo A., De Tommasi N. (2011). Triterpene derivatives as inhibitors of protein involved in the inflammatory process: molecules interfering with phospholipase A2, cyclooxygenase, and lipoxygenase. *Curr. Drug Targets* **12**: 302-321.

**Brandt** S., Kwok T., Hartig R., König W., Backert S. (2005). NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* **102**: 9300-9305.

**Bremner** P., Heinrich M. (2002). Natural products as targeted modulators of the nuclear factor-kappaB pathway. *J. Pharm. Pharmacol.* **54**: 453–472.

**Bucchini** L., Rodarte A., Restani P. (2011). The PlantLIBRA Project: how we intend to innovate the science of botanicals. *Food & Function* **2**: 769-773.

**Buendía** B., Gil M.I., Tudela J.A., Gady A.L., Medina J.J., Soria C., López J.M. Tomás- Barberán F.A. (2010). HPLC-MS analysis of proanthocyanidin oligomers and other phenolics in 15 strawberry cultivars. *J Agric Food Chem.* **58**: 3916–3926.



**Cabrera C.**, Artacho R., Gimenez R. (2006). Beneficial effects of green tea-a review. *Journal of the American College of Nutrition* **25**: 79-99.

**Capasso F.**, Borrelli F., Castaldo S., Grandolini G. (2006). Fitofarmacovigilanza. Springer ed., Capitolo 8.

**Castilla P.**, Davalos A., Teruel J.L., Cerrato F., Fernandez-Lucas M., Merino J.L., Sanchez- Martin C.C., Ortuno J., Lasuncion M.A. (2008). Comparative effects of dietary supplementation with red grape juice and vitamin E on production of superoxide by circulating neutrophil NADPH oxidase in hemodialysis patients. *Am. J. Clin. Nutr.* **87**: 1053-1061.

**Castilla P.**, Echarri R., Davalos A., Cerrato F., Ortega H., Teruel J.L., Lucas M.F., Gomez-Coronado D., Ortuno J., Lasuncion, M.A. (2006). Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **84**: 252-262.

**Censini S.**, Lange C., Xiang Z., Crabtree J.E., Ghiara P., Borodovsky M., Rappuoli R. Covacci A. (1996). cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 14648–14653.

**Chainani-Wu N.**, Silverman Jr S., Reingold A., Bostrom A., Mc Culloch C., Lozada-Nur F., Weintraub J. (2007). A randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial of curcuminoids in oral lichen planus. *Phytomedicine* **14**: 437-446.

**Chan E. W. C.**, Lim Y. Y., Chew Y. L. (2007). Antioxidant activity of *Camellia sinensis* leaves and tea from a lowland plantation in Malaysia. *Food Chemistry* **102**: 1214-1222

**Chantre P.**, Cappelaere A., Leblan D., Guedon D., Vandermander J., and Fournie B. (2000). Efficacy and tolerance of *Harpagophytum procumbens* versus diacerhein in treatment of osteoarthritis. *Phytomedicine* **7**: 177-183.

- Chen C.-W.**, Ho C. T. (1995). Antioxidant properties of 265 polyphenols extracted from green and black teas. *Journal of Food Lipids* **2**: 35-46.
- Chen F.E.**, Ghosh G. (1995). Regulation of DNA binding by Rel/NF-kappaB transcription factors: structural views. *Oncogene* **18**: 6845–6852.
- Chen Z.**, Hagler J., Palombella V.J., Melandri F., Scherer D., Ballard D., Maniatis T. (1995). Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* **9**: 1586–1597.
- Chiu A.E.**, Chan J.L., Kern D.G., Kohler S., Rehmus W.E., Kimball A.B. (2005). Doubleblinded, placebo-controlled trial of green tea extracts in the clinical and histologic appearance of photoaging skin. *Dermatol. Surg.* **31**: 855-860.
- Chrubasik J.E.**, Junck H., Breitschwerdt H., Conradt C., Zappe H. (1999). Effectiveness of *Harpagophytum* extract WS 1531 in the treatment of exacerbation of low back pain: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Eur. J. Anaesthesiol.* **16**: 118-129.
- Chrubasik S.**, Enderlein W., Bauer R., Grabner W. (1997). Evidence for antirheumatic effectiveness of Herba *Urticae dioicae* in acute arthritis: a pilot study. *Phytomedicine* **4**: 105-108.
- Chrubasik S.**, Kunzel O., Thanner J., Conradt C., Black A. (2005). A 1-year follow-up after a pilot study with Doloteffin for low back pain. *Phytomedicine* **12**: 1-9.
- Chrubasik S.**, Model A., Black A., Pollak S. (2003). A randomized double-blind pilot study comparing Doloteffin and Vioxx in the treatment of low back pain. *Rheumatology (Oxford)* **42**: 141-148.
- Chrubasik S.**, Zimpfer C., Schutt U., Ziegler R. (1996). Effectiveness of *Harpagophytum procumbens* in treatment of acute low back pain. *Phytomedicine* **1**: 1-10.

**Chun** O.K., Chung S.J., Claycombe K.J., Song, W.O. (2008). Serum C-reactive protein concentrations are inversely associated with dietary flavonoid intake in U.S. adults. *J. Nutr.* **138**: 753-760.

**Cochrane Collaboration** (2008). Cochrane Handbook: Assessing Risk of Bias in Included Studies (Chapter 8). Access online at: <http://www.cochranehandbook.org/>.

**Cohen** P.A., Ernst E. (2010). Safety of Herbal Supplements: A Guide for Cardiologists. *Cardiovascular Therapeutics* **28**: 246–253.

**Coppens** P., Delmulle L., Gulati O., Richardson D. P., Ruthsatz M., Sievers H., Sidani S. (2006). Use of Botanicals in Food Supplements. *Ann. Nutr. Metab.* **50**: 538–554.

**Corella** D., Gonzalez J.I., Bullo M., Carrasco P., Portoles O., Diez-Espino J., Covas M.I., Ruiz-Gutierrez V., Gomez-Gracia E., Aros F., Fiol M., Herrera M.C., Santos J.M., Saez G., Lamuela R., Lahoz C., Vinyoles E., Ros E., Estruch, R. (2009). Polymorphisms cyclooxygenase-2 -765G>C and interleukin-6 -174G>C are associated with serum inflammation markers in a high cardiovascular risk population and do not modify the response to a Mediterranean diet supplemented with virgin olive oil or nuts. *J. Nutr.* **139**: 128-134.

**Correa** P., Piazzuelo M.B., Camargo M.C. (2006). Etiopathogenesis of gastric cancer. *Scand. J. Surg.* **95**: 218–224.

**Covacci** A., Falkow S., Berg D.E., Rappuoli R. (1997). Did the inheritance of a pathogenicity island modify the virulence of *Helicobacter pylori*? *Trends Microbiol.* **5**:205–208.

**Crabtree** J.E., Figura N., Taylor J.D., Bugnoli M., Armellini D., Tompkins D.S. (1992). Expression of 120 kilodalton protein and cytotoxicity in *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Pathol.* **45**: 733–734.

**Cullen D.J., Collins B.J., Christiansen K.J., Epis J., Warren J.R., Surveyor I., Cullen K.J. (1993).** When is *Helicobacter pylori* infection acquired?. *Gut*. **34**: 1681–1682.

**De Bacquer D., Clays E., Delanghe J., De Backer G. (2006).** Epidemiological evidence for an association between habitual tea consumption and markers of chronic inflammation. *Atherosclerosis* **189**: 428-435.

**Decreto legislativo 27 gennaio 1992, n. 111.** Attuazione della direttiva 89/398/CEE concernente i prodotti alimentari destinati ad un'alimentazione particolare.

**Decreto legislativo 21 maggio 2004, n.169.** Attuazione della direttiva 2002/46/CE relativa agli integratori alimentari.

**Decreto legislativo 09 aprile 2009, n. 82.** Regolamento concernente l'attuazione della direttiva 2006/141/CE per la parte riguardante gli alimenti per lattanti e gli alimenti di proseguimento destinati alla Comunita' europea ed all'esportazione presso Paesi terzi.

**Decreto Ministeriale 14 maggio 2005.** Norme per l'attuazione della direttiva 2003/13/CE che modifica la direttiva 96/5/CE sugli alimenti a base di cereali e gli altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini.

**Decreto Ministeriale 07 ottobre 1998 n. 519.** Regolamento recante norme concernenti l'attuazione della Direttiva 96/8/CE della Commissione del 26 febbraio 1996 sugli alimenti destinati a diete ipocaloriche volte alla riduzione del peso.

**D.P.R 20 marzo 2002, n. 57.** Regolamento di attuazione della direttiva 1999/21/CE sugli alimenti dietetici destinati a fini medici speciali.

**Dell'Agli M., Di Lorenzo C., Badea M., Sangiovanni E., Dima L., Bosisio E., Restani P. (2013).** Plant Food Supplement with anti-inflammatory properties: a systematic review (I). *Crit. Rev. Food Sci. and Nutrition* **53**: 4 (in press).

**de Maat M.P.**, Pijl H., Kluit C., Princen H.M. (2000). Consumption of black and green tea had no effect on inflammation, haemostasis and endothelial markers in smoking healthy individuals. *Eur. J. Clin. Nutr.* **54**: 757-763.

**Denizot F.**, Lang R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods* **89**: 271-277.

**Di Lorenzo C.**, Dell'Agli M., Badea M., Sangiovanni E., Dima L., Colombo E., Restani P., Bosisio E. (2013). Plant Food Supplement with anti-inflammatory properties: a systematic review (II). *Crit. Rev. Food Sci. and Nutrition* **53**: 5 (in press).

**Direttiva 2002/46/CE** del Parlamento Europeo e del Consiglio del 10 Giugno 2002 concernente il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri relative agli integratori alimentari. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea. L136/85, 12-7-2002.

**Direttiva 2004/24/EC** del Parlamento Europeo e del Consiglio del 31 Marzo 2004 concernente la modifica, per quanto riguarda i medicinali vegetali tradizionali, della direttiva 2001/83/CE recante un codice comunitario relativo ai medicinali per uso umano. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea L136/85, 30-4-2004. Ultima consultazione: 03 novembre 2012.

**Direttiva Europea 1924/200/EC** riguardante i claims nutrizionali e salutistici degli alimenti. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea L12/3-L12/18. Disponibile al sito: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:012:0003:0018:EN:pdf>. Ultima consultazione: 03 novembre 2012.

**Dorer M.S.**, Talarico S., Salama N.R. (2009). *Helicobacter pylori*'s unconventional role in health and disease. *PLoS. Pathog.* **5**: 1-6.

**Durgaprasad S.**, Ganesh Pai C., Vasanthkumar Alvres J.F., Sanjeeva, Namitha (2005). A pilot study of the antioxidant effect of curcumin in tropical pancreatitis. *Indian J. Med. Res.* **122**: 315-318.

**Eichenberger P.**, Mettler S., Arnold M., Colombani P.C. (2010). No effects of three-week consumption of a green tea extract on time trial performance in endurance-trained men. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **80**: 54-64.

**Eisenberg D.**, Davis R., Ettner S., Appel S., Wilkey S., Van Rompey M., Kessler R. (1998). Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997. *J. Am. Med. Assoc.* **280**: 1569-1575.

**Elder N.**, Gillcrist A., Mionz R. (1997). Use of alternative health care by family practice patients. *Arch. Fam. Med.* **6**: 181-184.

**Erba D.**, Riso P., Bordoni A., Foti P., Biagi P.L., Testolin G. (2005). Effectiveness of moderate green tea consumption on oxidative status and plasma lipid profile in humans. *J. Nutr. Biochem.* **16**: 144-149.

**Ernst E.** (2008). Frankincense: systematic review. *BMJ.* **337**: 1-4.

**ESCOP** (2009). ESCOP Monographs: the scientific foundation for herbal medicinal 326 products. Georg Thieme Verlag.

**Esmailzadeh A.**, Azadbakht L. (2008). Home use of vegetable oils, markers of systemic inflammation, and endothelial dysfunction among women. *Am. J. Clin. Nutr.* **88**: 913-921.

**EU (2010) Food**: Commission reviews the progressive adoption of the list of permitted health claims. IP/10/1176. Consultabile al sito: <http://europa.eu/rapid/pressReleasesAction.do?reference=IP/10/1176>. Ultimo accesso 3 novembre 2012.

**European Food Safety Authority (EFSA)**. (2011). Scientific and technical guidance for the preparation and presentation of an application for authorisation of a health claim (revision 1). *EFSA Journal* **9**: 2135.

**FDA** – Food and Drug Administration. (2001). Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation, Disponibile al sito: (<http://www.labcompliance.de/documents/FDA/FDA-Others/Laboratory/f-507-bioanalytical-4252fnl.pdf>). Ultima consultazione 12-10-2012.

**Feghali C.A., Wright T.M.** (1997). Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front. Biosci.* **2**: 12-26.

**Fenercioglu A.K., Saler T., Genc E., Sabuncu H., Altuntas, Y.** (2010). The effects of polyphenol-containing antioxidants on oxidative stress and lipid peroxidation in Type 2 diabetes mellitus without complications. *J. Endocrinol. Invest.* **33**: 118-124.

**Fennell D.** (2004). Determinants of supplement usage. *Prev. Med.* **39**: 932-939.

**Fenwick C., Na S.Y., Voll R.E., Zhong H., Im S.Y., Lee J.W., Ghosh S.** (2000). A subclass of Ras proteins that regulate the degradation of I $\kappa$ B. *Science* **287**: 869–873.

**Foynes S., Dorrell N., Ward S.J., Stabler R.A., McColm A.A., Rycroft A.N., Wren B.W.** (2000). *Helicobacter pylori* possesses two CheY response regulators and a histidine kinase sensor, CheA, which are essential for chemotaxis and colonization of the gastric mucosa. *Infect. Immun.* **68**: 2016–2023.

**Freese R., Basu S., Hietanen E., Nair J., Nakachi K., Bartsch H., Mutanen M.** (1999). Green tea extract decreases plasma malondialdehyde concentration but does not affect other indicators of oxidative stress, nitric oxide production, or hemostatic factors during a high-linoleic acid diet in healthy females. *Eur. J. Nutr.* **38**: 149-157.

**Friedman M., Levin C. E., Lee S. U., Kozukue N.** (2009). Stability of green tea catechins in commercial tea leaves during storage for 6 months. *Journal of Food Science.* **74**: H47-51.

**Fuentes F., Lopez-Miranda J., Perez-Martinez P., Jimenez Y., Marin C., Gomez P., Fernandez J.M., Caballero J., Delgado-Lista J., Perez-Jimenez F.** (2008). Chronic effects of a high-fat diet enriched with virgin olive oil and a low-fat diet enriched

with alpha-linolenic acid on postprandial endothelial function in healthy men. *British J. Nutr.* **100**: 159-165.

**Fukino** Y., Shimbo M., Aoki N., Okubo T., Iso H. (2005). Randomized controlled trial for an effect of green tea consumption on insulin resistance and inflammation markers. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **51**: 335-342.

**Gagnier** J.J., van Tulder M., Berman B., Bombardier C. (2006). Herbal medicine for low back pain. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD004504.

**Gagnier** J.J., van Tulder M.W., Berman B., Bombardier C. (2007). Herbal medicine for low back pain: a Cochrane review. *Spine (Phila Pa 1976)* **32**: 82-92.

**Garcia** V., Arts I.C., Sterne J.A., Thompson R.L., Shaheen, S.O. (2005). Dietary intake of flavonoids and asthma in adults. *Eur. Respir. J.* **26**: 449-452.

**Gilmore** T.D. (1990). NF- $\kappa$ B, KBF1, dorsal, and related matters. *Cell* **62**: 841–843.

**Gilmore** T.D. (1999). The Rel/NF- $\kappa$ B signal transduction pathway: introduction. *Oncogene*, **18**: 6842–6844.

**Gilmore** T.D. (2006). Introduction to NF- $\kappa$ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, **25**: 6680–6684

**Golias** C.H., Tsoutsi A., Matziridis<sup>2</sup> P., Makridis<sup>2</sup> A., Batistatou<sup>3</sup>, Charalabopoulos<sup>1</sup> K. (2007). Leukocyte and Endothelial Cell Adhesion Molecules in Inflammation Focusing on Inflammatory Heart Disease. *In vivo* **21**:757-770

**Gonzalez-Gallego** J., Garcia-Mediavilla M.V., Sanchez-Campos S., Tunon M.J. (2010). Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *Br. J. Nutr.* **104**: S15-27.

**Goudev** A., Kyurkchiev S., Gergova V., Karshelova E., Georgiev D., Atar D., Kehayov I., Nachev C. (2000). Reduced concentrations of soluble adhesion molecules after antioxidant supplementation in postmenopausal women with high cardiovascular risk profiles - a randomized double-blind study. *Cardiology* **94**: 227-232.



**Graham H. N.** (1992). Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Preventive Medicine* **21**: 334-350.

**Green R. J., Murphy A. S., Schulz B., Watkins B. A., Ferruzzi M. G.** (2007). Common tea formulations modulate in vitro digestive recovery of green tea catechins. *Molecular Nutrition and Food Research*. **51**: 1152-1162.

**Gupta I., Gupta V., Parihar A., Gupta S., Ludtke R., Safayhi H., Ammon H.P.** (1998). Effects of *Boswellia serrata* gum resin in patients with bronchial asthma: results of a double-blind, placebo-controlled, 6-week clinical study. *Eur. J. Med. Res.* **3**: 511-514.

**Gupta I., Parihar A., Malhotra P., Gupta S., Ludtke R., Safayhi H., Ammon, H.P.** (2001) Effects of gum resin of *Boswellia serrata* in patients with chronic colitis. *Planta Med.* **67**: 391-395.

**Gupta I., Parihar A., Malhotra P., Singh G.B., Ludtke R., Safayhi H., Ammon, H.P.** (1997). Effects of *Boswellia serrata* gum resin in patients with ulcerative colitis. *Eur. J. Med Res* **2**: 37-43.

**Gupta M., Shaw B.P., Mukherjee A.** (2008). Evaluation of antipyretic effect of a traditional polyherbal preparation: a double-blind, randomized clinical trial. *Int. J. Pharmacol.* **4**: 190-195.

**Gutierrez-Orozco F., Stephens B. R., Neilson A. P., Green R., Ferruzzi M. G., Bomser J. A.** (2010). Green and black tea inhibit cytokine-induced IL-8 production and secretion in AGS gastric cancer cells via inhibition of NF-kappaB activity. *Planta Medica.* **76**: 1659-1665.

**Hamblin L., Laird A., Parkes E., Walker A.F.** (2008). Improved arthritic knee health in a pilot RCT of phytotherapy. *J. R. Soc. Promot. Health* **128**: 255-262.

**Han J. Y., Kim C. S., Lim K. H., Kim J. H., Kim S., Yun Y. P., Hong J. T., Oh K. W.** (2011). Increases in blood pressure and heart rate induced by caffeine are inhibited by (-)-epigallocatechin-3-O-gallate: involvement of catecholamines.

*Journal of Cardiovascular Pharmacology*. **58**: 446-449.

**Hanai H.**, Iida T., Takeuchi K., Watanabe F., Maruyama Y., Andoh A., Tsujikawa T., Fujiyama Y., Mitsuyama K., Sata M., Yamada M., Iwaoka Y., Kanke K., Hiraishi H., Hirayama K., Arai H., Yoshii S., Uchijima M., Nagata T., Koide Y. (2006). Curcumin Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis: Randomized, Multicenter, Double- Blind, Placebo-Controlled Trial. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **4**: 1502-1506.

**Hayden M.S.**, Ghosh S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*, **132**:344–362.

**Hirano-Ohmori R.**, Takahashi R., Momiyama Y., Hiroaki T., Yonemura A., Tamai S., Umegaki K., Nakamura H., Kondo K., Ohsuku F. (2005). Green Tea Consumption and Serum Malondialdehyde-Modified LDL Concentrations in Healthy Subjects. *J. Am. Coll. Nutr.* **24**:342-346.

**Hodgson J.M.**, Puddey I.B., Croft K.D., Burke V., Mori T.A., Caccetta R.A., Beilin L.J. (2000). acute effects of ingestion of black and green tea on lipoprotein oxidation. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**: 1103-1107.

**Hodgson J.M.**, Puddey I.B., Mori T.A., Burke V., Baker R.I., Beilin L.J. (2001). Effects of regular ingestion of black tea on haemostasis and cell adhesion molecules in humans. *Eur. J. Clin. Nutr.* **55**: 881-886.

**Hodgson J.M.**, Croft K.D., Mori T.A., Burke V., Beilin L.J., Puddey I.B. (2002). Regular ingestion of tea does not inhibit in vivo lipid peroxidation in humans. *J. Nutr.* **132**: 55-58.

**Houssen M.E.**, Ragab A., Mesbah A., El-Samanoudy A.Z., Othman G., A F.M., Badria F.A. (2010). Natural anti-inflammatory products and leukotriene inhibitors as complementary therapy for bronchial asthma. *Clin. Biochem.* **43**: 887-890.

**Huang** T.T., Kudo N., Yoshida M., Miyamoto S. (2000). A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of I B controls cytoplasmic localization of inactive NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ Ba complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 1014–1019.

**Huxford** T., Huang D.-B., Malek S., Ghosh G. (1998). The crystal structure of the I $\kappa$ Ba/NF- $\kappa$ B complex reveals mechanisms of NF- $\kappa$ B Inactivation. *Cell*, **95**: 759–770.

**Igarashi** K., Honma K., Yoshinari O., Nanjo F., Hara Y. (2007). Effects of dietary catechins on glucose tolerance, blood pressure and oxidative status in Goto-Kakizaki rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo)* **53**: 496-500.

**Jacobs** M.D., Harrison S.C. (1998). Structure of an I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B complex. *Cell*. **95**: 749–758.

**Jacquet** A., Girodet P.O., Pariente A., Forest K., Mallet L., Moore N. (351 2009). Phytalgic, a food supplement, vs placebo in patients with osteoarthritis of the knee or hip: a randomised double-blind placebo-controlled clinical trial. *Arthritis Res. Ther.* **11**: R192.

**Jadad** A.R., Moore R.A., Carroll D., et al. (1996). Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? *Control. Clin. Trials* **17**: 1–12.

**Janjua** R., Munoz C., Gorell E., Rehmus W., Egbert B., Kern D., Chang A.L. (2009). A two-year, double-blind, randomized placebo-controlled trial of oral green tea polyphenols on the long-term clinical and histologic appearance of photoaging skin. *Dermatol. Surg.* **35**:1057-1065.

**Jochmann** N., Baumann G., Stangl V. (2008). Green 291 tea and cardiovascular disease: from molecular targets towards human health. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care.* **11**: 758-765.

- Johnson C., Van Antwerp D., Hope T.J.** (1999). An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of I $\kappa$ B $\alpha$ . *EMBO J.* **18**: 6682–6693.
- Kalfin R., Righi A., Del Rosso A., Bagchi D., Generini S., Cerinic M.M., Das D.K.** (2002). Activin, a grape seed-derived proanthocyanidin extract, reduces plasma levels of oxidative stress and adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin) in systemic sclerosis. *Free Radic. Res.* **36**: 819-825.
- Kar P., Laight D., Shaw K.M., Cummings M.H.** (2006). Flavonoid-rich grape seed extracts: a new approach in high cardiovascular risk patients? *Int. J. Clin. Pract.* **60**: 1484-1492.
- Karin M., Lawrence T., Nizet V.** (2006). Innate immunity gone away: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell.* **124**: 823-835.
- Kaufman D., Kelly J., Rosenberg L., Anderson T., Mitchell A.** (2002). Recent patterns of medication use in the ambulatory adult population of the United States. *J. Am. Med. Assoc.* **287**: 337-344.
- Kavermann H., Burns B.P., Angermuller K., Odenbreit S., Fischer W., Melchers K., Haas R.** (2003). Identification and characterization of *Helicobacter pylori* genes essential for gastric colonization. *J. Exp. Med.* **197**: 813–822.
- Kim A., Chiu A., Barone M. K., Avino D., Wang F., Coleman C. I., Phung O. J.** (2011). Green tea catechins decrease total and low-density lipoprotein cholesterol: a systematic review and meta-analysis. *Journal of American Dietetic Association.* **111**: 1720-1729.
- Kim J.S., Chang J.H., Chung S.I., Yum J.S.** (1999). Molecular cloning and characterization of the *Helicobacter pylori* fliD gene, an essential factor in flagellar structure and motility. *J. Bacteriol.*, **181**: 6969–6976.
- Kim W.-J., Kim J.-D., Kim J., Oh S.-G., Lee Y.-W.** (2008). Selective caffeine

removal from green tea using supercritical carbon dioxide extraction. *Journal of Food Engineering*. **89**: 303-309.

**Kim** Y. J., Houg S. J., Kim J. H., Kim Y. R., Ji H. G., Lee S. J. (2012). Nanoemulsified green tea extract shows improved hypocholesterolemic effects in C57BL/6 mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*. **23**: 186-191.

**Kimmatkar** N., Thawani V., Hingorani L., Khiyani R., (2003). Efficacy and tolerability of *Boswellia serrata* extract in treatment of osteoarthritis of knee--a randomized double blind placebo controlled trial. *Phytomedicine*. **10**: 3-7.

**Klaunig** J.E., Xu Y., Han C., Kamendulis L.M., Chen J., Heiser C., Gordon M.S., Mohler E.R. (1999). The effect of tea consumption on oxidative stress in smokers and nonsmokers. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **220**: 249-254.

**Ko** R.J. (1998). Adulterants in Asian Patent Medicines. *New England Journal of Medicine*. **339**: 847.

**Konstantinidou** V., Covas M.-I., Munoz-Aguayo D., Khymenets O., de la Torre R., Saez G., Tormos M.d.C., Toledo E., Marti A., Ruiz-Gutierrez V., Mendez M.V.R., Fito M. (2010). In vivo nutrigenomic effects of virgin olive oil polyphenols within the frame of the mediterranean diet: a randomized controlled trial. *FASEB J.* **24**: 2546-2557.

**Kositchaiwat** C., Kositchaiwat S., and Havanondha J., (1993). *Curcuma longa* Linn. in the treatment of gastric ulcer comparison to liquid antacid: A controlled clinical trial. *J. Med. Assoc. Thailand* **76**: 601-605.

**Kostrzynska** M., Betts J.D., Austin J.W., Trust T.J. (1991). Identification, characterization, and spatial localization of two flagellin species in *Helicobacter pylori* flagella. *J Bacteriol.* **173**: 937-946.

**Kulkarni** R.R., Patki P.S., Jog V.P., Gandage S.G., Patwardhan B., (1991). Treatment of osteoarthritis with a herbomineral formulation: a double-blind, placebo-controlled, cross366 over study. *J. Ethnopharmacol.* **33**: 91-95.

- Kushiya** M., Shimazaki Y., Murakami M., Yamashita Y. (2009). Relationship between intake of green tea and periodontal disease. *J. Periodontol.* **80**: 372-377.
- Kuwahara** Y., Kono S., Eguchi H., Hamada H., Shinchi K., Imanishi K. (2000). Relationship between serologically diagnosed chronic atrophic gastritis, *Helicobacter pylori*, and environmental factors in Japanese men. *Scand. J. Gastroenterol.* **35**: 476-481.
- Lavon** I., Goldberg I., Amit S., Landsman L., Jung S., Tsuberi B.Z., Barshack I., Kopolovic J., Galun E., Bujard H., Ben-Neriah Y. (2000). High susceptibility to bacterial infection, but no liver dysfunction, in mice compromised for hepatocyte NF- $\kappa$ B activation. *Nature Med.* **6**: 573–577.
- Leblan** D., Chantre P., Fournie B. (2000). *Harpagophytum procumbens* in the treatment of knee and hip osteoarthritis. Four-month results of a prospective, multicenter, double-blind trial versus diacerhein. *Joint Bone Spine* **67**: 462-467.
- Lee** J. S., Oh T. Y., Kim Y. K., Baik J. H., So S., Hahm K. B., Surh Y. J. (2005). Protective effects of green tea polyphenol extracts against ethanol-induced gastric mucosal damages in rats: stress-responsive transcription factors and MAP kinases as potential targets. *Mutation Reserch.* **579**: 214-224.
- Lee** S.H., Hannink M. (2002). Characterization of the nuclear import and export functions of IkBe. *J. Biol. Chem.* **277**: 23358 - 23366.
- Leong** L. P., Shui G. (2001). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chemistry* **76**: 69-75.
- Lepper** P.M., Triantafilou M., Schumann C., Schneider E.M., Triantafilou K. (2005). Lipopolysaccharides from *Helicobacter pylori* can act as antagonists for Toll-like receptor 4. *Cell Microbiol.* **7**: 519–528.
- Lievens** D., Zerneck A., Seijkens T., Soehnlein O., Beckers L., Munnix I. C. A., Wijnands E., Goossens P., van Kruchten R., Thevissen L., Boon L., Flavell R. A.,

Noelle R. J., Gerdes N., Biessen E. A., Daemen M. J. A. P., Heemskerk J. W. M., Weber C., Lutgens E. (2010). Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis. *Blood*. **116**: 4317-4327.

**Lin** G., Zhou K.Y., Zhao X.G., Wang Z.T., But P.P. (1998). Determination of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids by on-line high performance liquid chromatography mass spectrometry with an electrospray interphase. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **12**: 1445- 1456.

**Lindholm** C., Quiding-Jarbrink M., Lonroth H., Svennerholm A.M. (2001). Induction of chemokine and cytokine responses by *Helicobacter pylori* in human stomach explants. *Scand. J. Gastroenterol.* **36**: 1022–1029.

**Lindholm** C., Quiding-Jarbrink M., Lonroth H., Hamlet A., Svennerholm A.M. (1998). Local cytokine response in *Helicobacter pylori*-infected subjects. *Infect. Immun.* **66**: 5964–5971.

**Linos** A., Kaklamanis E., Kontomerkos A., Koumantaki Y., Gazi S., Vaiopoulos G., Tsokos G.C., Kaklamanis P. (1991). The effect of olive oil and fish consumption on rheumatoid arthritis-a case control study. *Scand. J. Rheumatol.* **20**: 419-426.

**Linos** A., Kaklamani V.G., Kaklamani E., Koumantaki Y., Giziaki E., Papazoglou S., Mantzoros C.S. (1999). Dietary factors in relation to rheumatoid arthritis: a role for olive oil and cooked vegetables. *Am. J. Clin. Nutr.* **70**: 1077-1082.

**Lucas** L., Russell A., Keast R. (2011). Molecular mechanisms of inflammation. Anti-inflammatory benefits of virgin olive oil and the phenolic compound oleocanthal. *Curr. Pharm. Des.* **17**: 754-768.

**Maki** T., Pham N.M., Yoshida D., Yin G., Ohnaka K., Takayanagi R., Kono S. (2010). The relationship of coffee and green tea consumption with high-sensitivity C-reactive protein in Japanese men and women. *Clin. Chem. Lab. Med.* **48**: 849-854.

**Malaty** H.M., Engstrand L., Pedersen N.L., Graham D.Y. (1994). *Helicobacter pylori* infection: genetic and environmental influences. A study of twins. *Ann. Intern. Med.* **120**: 982–986.

**Malek** S., Chen Y., Huxford T., Ghosh G. (2001). I $\kappa$ B $\beta$ , but not I $\kappa$ B $\alpha$ , functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF- $\kappa$ B dimers by masking both NF- $\kappa$ B nuclear localization sequences in resting cells. *J. Biol. Chem.* **276**: 45225–45235.

**Mallery** S.R., Zwick J.C., Pei P., Tong M., Larsen P.E., Shumway B.S., Lu B., Fields H.W., Mumper R.J., Stoner G.D. (2008). Topical application of a bioadhesive black raspberry gel modulates gene expression and reduces cyclooxygenase 2 protein in human premalignant oral lesions. *Cancer Res.* **68** : 4945–4957.

**Manach** C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability *Am. J. Clin. Nutr.* **79**: 727–747.

**Manach** C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Rémésy C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**: S230–242.

**May** M.J., Ghosh S. (1997). Rel/NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: an overview. *Semin. Cancer Biol.* **8**: 63–73.

**Mena** M.P., Sacanella E., Vazquez-Agell M., Morales M., Fito M., Escoda R., Serrano-Martinez M., Salas-Salvado J., Benages N., Casas R., Lamuela-Raventos R.M., Masanes F., Ros E., Estruch R. (2009). Inhibition of circulating immune cell activation: a molecular antiinflammatory effect of the Mediterranean diet. *Am. J. Clin. Nutr.* **89**: 248-256.

**Mittman** P. (1990). Randomized, double-blind study of freeze-dried *Urtica dioica* in the treatment of allergic rhinitis. *Planta Med.* **56**: 44-47.

**Mohammadi** M., Czinn S., Redline R., Nedrud J. (1996). *Helicobacter* specific cell-mediated immune responses display a predominant Th1 phenotype and



promote a delayedtype hypersensitivity response in the stomachs of mice. *J. Immunol.* **156**: 4729–4738.

**Mohammadi M.**, Nedrud J., Redline R., Lycke N., Czinn S.J. (1997). Murine CD4 T cell response to *Helicobacter* infection: TH1 cells enhance gastritis and TH2 cells reduce bacterial load. *Gastroenterology.* **113**: 1848–1857.

**Montecucco C.**, Rappuoli R. (2001). Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**: 457–466.

**Montecucco C.**, Papini E., de Bernard M., Zoratti M. (1999). Molecular and cellular activities of *Helicobacter pylori* pathogenic factors. *FEBS Lett.* **452**: 16–21.

**Moreau M.**, Maria Siqueira E.P. (2008). Tossicologia analitica. Ed. Guanabara Koogan. Cap. 2-3.

**Morrow J.D.**, Minton T.A., Roberts L.J. 2nd. (1992). The F2-isoprostane, 8-epi-prostaglandin F2 alpha, a potent agonist of the vascular thromboxane/endoperoxide receptor, is a platelet thromboxane/endoperoxide receptor antagonist. *Prostaglandins.* **44**: 155-63.

**Moussard C.**, Alber D., Toubin M.M., Thevenon N., Henry J.C. (1992). A drug used in traditional medicine, *Harpagophytum procumbens*: no evidence for NSAID-like effect on whole blood eicosanoid production in human. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty acids.* **46**: 283-286.

**Mukamal K.J.**, MacDermott K., Vinson J.A., Oyama N., Manning W.J., Mittleman M.A. (2007). A 6-month randomized pilot study of black tea and cardiovascular risk factors. *Am. Heart J.* **154**: 724e1–724e6.

**Myers S.P.**, Stevenson L., Cheras P.A., O'Connor J., Brooks L., Rolfe M., Conellan P., Morris C. (2010). A forced titration study of the antioxidant and immunomodulatory effects of Ambrotose AO supplement. *BMC Complement. Altern. Med.* **10**: 1-16.

**Nagao T.**, Komine Y., Soga S., Meguro S., Hase T., Tanaka Y., Tokimitsu I. (2005). Ingestion of a tea rich in catechins leads to a reduction in body fat and malondialdehydemodified LDL in men. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**: 122-129.

**Nagaya N.**, Yamamoto H., Uematsu M., Itoh T., Nakagawa K., Miyazawa T., Kangawa K., Miyatake K. (2004). Green tea reverses endothelial dysfunction in healthy smokers. *Heart* **90**: 1485-1486.

**Nam N.H.** (2006). Naturally occurring NF-kappaB inhibitors. *Mini Rev. Med. Chem.* **6**: 945–951.

**Nanjo F.**, Goto K., Seto R., Suzuki M., Sakai M., Hara Y. (1996). Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radical Biology and Medicine.* **21**: 895-902.

**Nantz M.P.**, Rowe C.A., Bukowski J.F., Percival S.S. (2009). Standardized capsule of *Camellia sinensis* lowers cardiovascular risk factors in a randomized, double-blind, placebo controlled study. *Nutrition* **25**: 147-154.

**National Health Interview Survey (NHIS).** (2002). Public use data release Hyatsville, Md: USA Dept of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Consultabile al sito: [ftp://ftp.cdc.gov/pub/Health\\_Statistics/NCHS/Dataset\\_Documentation/NHIS/2002/srvydesc.pdf](ftp://ftp.cdc.gov/pub/Health_Statistics/NCHS/Dataset_Documentation/NHIS/2002/srvydesc.pdf). Ultimo accesso: 03 novembre 2012.

**National Centre for Health Statistics (NHIS).** (2007). Public use data release Hyatsville. Md: USA Dept of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Consultabile al sito: [ftp://ftp.cdc.gov/pub/Health\\_Statistics/NCHS/Dataset\\_Documentation/NHIS/2007/srvydesc.pdf](ftp://ftp.cdc.gov/pub/Health_Statistics/NCHS/Dataset_Documentation/NHIS/2007/srvydesc.pdf). Ultimo accesso 3 novembre 2012.

**Nelson D.E.**, Ihekweba A.E., Elliott M., Johnson J.R., Gibney C.A., Foreman B.E., Nelson G., See V., Horton C.A., Spiller D.G., Edwards S.W., McDowell H.P., Unitt J.F., Sullivan E., Grimley R., Benson N., Broomhead D., Kell D.B., White M.R.

(2004). Oscillations in NF- $\kappa$ B signaling control the dynamics of gene expression. *Science* **306**: 704-708.

**Noach** L.A., Bosma N.B., Jansen J., Hoek F.J., van Deventer S.J., Tytgat G.N. (1994). Mucosal tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 production in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Scand. J. Gastroenterol.* **29**: 425-429.

**Ohmori** R., Iwamoto T., Tago M., Takeo T., Unno T., Itakura H., & Kondo K. (2005). Antioxidant activity of various teas against free radicals and LDL oxidation. *Lipids*, **40**: 849-853.

**O' Reilly** J.D., Mallet A.I., McAnlis G.T., Young I.S., Halliwell B., Sanders T., Wiseman H. (2001). Consumption of flavonoids in onions and black tea: lack of effect on F2-isoprostanes and autoantibodies to oxidized LDL in healthy humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**:1040-1044.

**Ostrowska** J., Skrzydlewska E. (2006). The comparison of effect of catechins and green tea extract on oxidative modification of LDL in vitro. *Advances in Medicinal Sciences.* **51**: 298-303.

**Ottemann** K.M., Lowenthal A.C. (2002). *Helicobacter pylori* uses motility for initial colonization and to attain robust infection. *Infect Immun.* **70**: 1984-1990.

**Oyama** J-i., Maeda T., Kouzuma K., Ochiai R., Tokimitsu I., Higuchi Y., Sugano M., Makino N. (2010). Green tea catechins improve human forearm endothelial dysfunction and have antiatherosclerotic effects in smokers. *Circ. J.* **74**: 578-588.

**Pacheco** Y.M., Lopez S., Bermudez B., Abia R., Villar J., Muriana F.J. (2008). A meal rich in oleic acid beneficially modulates postprandial sICAM-1 and sVCAM-1 in normotensive and hypertensive hypertriglyceridemic subjects. *J. Nutr. Biochem.* **19**: 200-205.

- Panza V.S., Waziawik E., Ricardo Schutz G., Comin L., Hecht K.C., da Silva E.L.** (2008). Consumption of green tea favorably affects oxidative stress markers in weight-trained men. *Nutrition* **24**: 433-442.
- Paoletti R., Nicosia S., Clementi F., Fumagalli G.** Farmacologia generale e molecolare. (2003). *Edizioni UTET*. Cap 35-36.
- Parsonnet J., Blaser M.J.** (1992). Symptoms and risk factors of *Helicobacter pylori* infection in a cohort of epidemiologists. *Gastroenterology*. **102**: 41–46.
- Peters C., Shelton J., Sharma P.** (2003). An investigation of factors that influence the consumption of dietary supplements. *Health Marketing Quality* **12**: 113-134.
- Pischon T., Hankinson S.E., Hotamisligil G.S., Rifai N., Willett W.C., Rimm E.B.** (2003). Habitual dietary intake of n-3 and n-6 fatty acids in relation to inflammatory markers among US men and women. *Circulation* **108**: 155-160.
- Prior R.L., Hoang H., Gu L., Wu X., Bacchiocca M., Howard L., Hampsch-Woodill M., Huang D., Ou B., Jacob R.** (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 3273–3279.
- Prior R.L., Wu X., Schaich K.** (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 4290-4302.
- Puglisi M.J., Vaishnav U., Shrestha S., Torres-Gonzalez M., Wood R.J., Volek J.S., Fernandez M.L.** (2008). Raisins and additional walking have distinct effects on plasma lipids and inflammatory cytokines. *Lipids Health Dis.* **7**: 14-22.
- Ramirez-Tortosa C.M., García-Alonso J., Vidal-Guevara L.M., Quiles J.L., Periago J.M., Linde J., Mesa D.M., Ros G., Abellán P., Gil A.** (2004). Oxidative stress status in an institutionalised elderly group after the intake of a phenolic-rich dessert. *Br. J. Nutr.* **91**: 943–950.

**Rankin J.W., Andreae M.C., Oliver Chen C.Y., O'Keefe S.F. (2008).** Effect of raisin consumption on oxidative stress and inflammation in obesity. *Diabetes Obes. Metab.* **10**:1086-1096.

**Regolamento EC n. 432/2012 della Commissione Europea del 16 maggio 2012** relativo alla compilazione di un elenco di indicazioni sulla salute consentite sui prodotti alimentari, diverse da quelle facenti riferimento alla riduzione dei rischi di malattia e allo sviluppo e alla salute dei bambini. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* **L136/2**, 25-5-2012.

**Regolamento EC n. 396/2005 del 25 febbraio 2005** concernente i livelli massimi di residui di antiparassitari nei o sui prodotti alimentari e mangimi di origine vegetale e animale e che modifica la direttiva 91/414/CEE del Consiglio. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* **L70/1**, 16-3-2005

**Regolamento EC n. 629/2008 del 2 luglio 2008** che modifica il regolamento (CE) n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* **L173/6**, 3-7-2008

**Regolamento CE n. 1925/2006 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 20 dicembre 2006** sull'aggiunta di vitamine e minerali e di talune altre sostanze agli alimenti. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea*, L404/26, 30 dicembre 2006.

**Riboli E., Hunt K., Slimani N., Ferrari P., Norat T., Fahy M. (2002).** European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): study populations and data collection. *Public Health Nutr. (Suppl)* **2002**: S1113-S1124.

**Romagnoli R., Franchini A. (2010).**

**Romier B., Van De Walle J., During A., Larondelle Y., Schneider Y.J. (2008).** Modulation of signaling nuclear factor-kB activation pathway by polyphenols in human intestinal caco-2 cells. *Br J Nutr.* **100**: 542–551.

**Ross M., McCarthy P., Lin C.** (2006). Dietary supplements in a National Survey: Prevalence of use and reports of adverse events. *J. Am. Diet. Assoc.* **106**:1966-1974.

**Ross H.A., McDougall J., Stewart D.** (2007). Antiproliferative activity is predominantly associated with ellagitannins in raspberry extracts. *Phytochemistry*, **68**: 218–228.

**Rowe C.A., Nantz M.P., Bukowski J.F., Percival S.S.** (2007). Specific formulation of *Camellia sinensis* prevents cold and flu symptoms and enhances gamma,delta T cell function: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J. Am. Coll. Nutr.* **26**: 445-452.

**Rugge M., Pennelli G., Piloizzi E., Fassan M., Ingravallo G., Russo V.M., Di Mario F.** (2011). Gastritis: The histology report. *Digestive and Liver Disease*, **44**: 373 384.

**Ruggiero P., Rossi G., Tombola F., Pancotto L., Lauretti L., Del Giudice G., Zoratti M.** (2007). Red wine and green tea reduce H pylori- or VacA-induced gastritis in a mouse model. *World Journal of Gastroenterology*. **13**: 349-354.

**Ryu O.H., Lee J., Lee K.W., Kim H.Y., Seo J.A., Kim S.G., Kim N.H., Baik S.H., Choi D.S., Choi K.M.** (2006). Effects of green tea consumption on inflammation, insulin resistance and pulse wave velocity in type 2 diabetes patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **71**: 356-358.

**Salas-Salvado J., Garcia-Arellano A., Estruch R., Marquez-Sandoval F., Corella D., Fiol M., Gomez-Gracia E., Vinales E., Aros F., Herrera C., Lahoz C., Lapetra J., Perona J.S., Munoz-Aguado D., Martinez-Gonzalez M.A., Ros E.** (2008). Components of the Mediterranean-type food pattern and serum inflammatory markers among patients at high risk for cardiovascular disease. *Eur. J. Clin. Nutr.* **62**: 651-659.

**Saito S. T., Welzel A., Suyenaga E. S., Bueno F.** (2006). A method for fast determination of epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin (EC), catechin (C), and caffeine (CAF) in greentea using HPLC. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*

(Campinas, Braz.). **26**: 394-400.

**Sanchez-Zauco** N.A., Giono-Cerezo S., Maldonado-Bernal C. (2005). Toll-like receptors, pathogenesis and immune response to *Helicobacter pylori*. *Salud pública Méx.* **52**: 447–454 .

**Sano** A., Uchida R., Saito M., Shioya N., Komori Y., Tho Y., Hashizume N. (2007). Beneficial effects of grape seed extract on malondialdehyde-modified LDL. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* **53**: 174-182.

**Sanzini** E., Badea M., Dos Santos A., Restani P., Sievers H. (2011). Quality control of plant food supplements. *Food & Function* **2**: 740-746.

**Satoskar** S., Shenoy (1986). Evaluation of anti-inflammatory property of curcumin (diferuloyl methane) in patients with postoperative inflammation. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* **24**: 651-654.

**Scarpa** B. (2006). Gli integratori alimentari oggi. Di Renzo Editore.

**Seeram** N.P., Momin R.A., Bourquin L.D., Nair M.G. (2001). Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides from cherries and berries. *Phytomedicine.* **8**: 362–369.

**Seeram** N.P., Adams L.S., Zhang Y., Lee R., Sand D., Scheuller H.S., Heber D. (2006). Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 9329–9339.

**Seeram** N.P., Nair M.G. (2002). Inhibition of lipid peroxidation and structure activityrelated studies of the dietary constituents, anthocyanins, anthocyanidins and catechins. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 5308–5312.

**Seeram** N.P., Zhang Y., Nair M.G. (2003). Inhibition of proliferation of human cancer cell lines and cyclooxygenase enzymes by anthocyanidins and catechins. *Nutr. Cancer.* **46**: 101–106.

- Sengupta K.**, Alluri K.V., Satish A.R., Mishra S., Golakoti T., Sarma K.V., Dey D., Raychaudhuri S.P. (2008). A double blind, randomized, placebo controlled study of the efficacy and safety of 5-Loxin for treatment of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Res. Ther.* **392 10**: 1-11.
- Sengupta K.**, Krishnaraju Alluri V., Vishal Amar A., Mishra A., Trimurtulu G., Sarma Kadainti V., Raychaudhuri Smriti K., Raychaudhuri Siba, P. (2010). Comparative Efficacy and Tolerability of 5-Loxin and Aflapin Against Osteoarthritis of the Knee: A double blind, randomized, placebo controlled clinical study. *Int. J. Med. Sci* **7**: 366-377.
- Serafini M.**, Peluso I., and Raguzzini A. (2010). Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proc.Nutr. Soc.* **69**: 273-278.
- Serrano-Martinez M.**, Palacios M., Martinez-Losa E., Lezaun R., Maravi C., Prado M., Martinez J.A., Martinez-Gonzalez M.A. (2005). A Mediterranean dietary style influences TNF-alpha and VCAM-1 coronary blood levels in unstable angina patients. *Eur. J. Nutr.* **44**: 348-354.
- Setiawan V.W.**, Zhang Z.F., Yu G.P., Lu Q.Y., Li Y.L., Lu M.L., Wang M.R., Guo C.H., Yu S.Z., Kurtz R.C., Hsieh C.C. (2001). Protective effect of green tea on the risks of chronic gastritis and stomach cancer. *Int. J. Cancer* **92**: 600-604.
- Shaheen S.O.**, Sterne J.A., Thompson R.L., Songhurst C.E., Margetts B.M., Burney P.G.(2001). Dietary antioxidants and asthma in adults: population-based case-control study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164**: 1823-1828.
- Shibata K.**, Moriyama M., Fukushima T., Kaetsu A., Miyazaki M., Une, H. (2000). Green tea consumption and chronic atrophic gastritis: a cross-sectional study in a green tea production village. *J. Epidemiol.* **10**: 310-316.
- Skeie G.**, Braaten T., Hjartåker A., Lentjes M. , Amiano P., Jakszyn P., Pala V., Palanca A., Niekerk E., Verhagen H., Avloniti K., Psaltopoulou T., Niravong M., Touvier M., Nimptsch K., Haubrock J., Walker L., Spencer E., Roswall N., Olsen A., Wallström P., Nilsson S., Casagrande C., Deharveng G., Hellström V., Boutron-



Ruault M., Tjønneland A., Joensen A., Clavel-Chapelon F., Trichopoulou A., Martinez C., Rodríguez L., Frasca G., Sacerdote C., Peeters P., Linseisen J., Schienkiewitz A., Welch A., Manjer J., Ferrar P., Riboli E., Bingham S., Engeset D., Lund E., Slimani N.(2009). Use of dietary supplement in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition calibration study. *Eur. J. Clin. Nutr.* **63**: S226-S238.

**Smith** M.F., Mitchell A., Li G., Ding S., Fitzmaurice A.M., Ryan K., Crowe S., Goldberg J.B. (2003). Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required of *Helicobacter pylori*-induced NF- $\kappa$ B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **278**: 32552–32560.

**Son** J. T., Lee E. (2012). Effects of green tea ingestion on postprandial drops in blood pressure in older adults. *Journal of Gerontological Nursing* **38**: 30-38.

**Song** Y., Manson J.E., Buring J.E., Sesso H.D., Liu S. (2005). Associations of dietary flavonoids with risk of type 2 diabetes, and markers of insulin resistance and systemic inflammation in women: a prospective study and cross-sectional analysis. *J. Am. Coll. Nutr.* **24**: 376-384.

**Sontakke** S., Thawani V., Pimpalkhute S., Kabra P., Babhulkar S., Hingorani L. (2007). Open, randomized, controlled clinical trial of *Boswellia serrata* extract as compared to valdecoxib in osteoarthritis of knee. *Indian J. Pharmacol.* **39**: 27-29.

**Souto** A.L., Tavares J.F., da Silva M.S., Diniz Mde F., de Athayde-Filho P.F., Barbosa Filho J.M. (2011). Anti-inflammatory activity of alkaloids: an update from 2000 to 2010. *Molecules* **10**:8515-8534.

**Srivastava** A., Greenspan P., Hartle D.K., Hargrove J.L., Amarowicz R., Pegg R.B. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of polyphenolics from Southeastern U.S. range blackberry cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 6102–6109.

**Steptoe** A., Gibson E.L., Vuononvirta R., Hamer M., Wardle J., Rycroft J.A., Martin J.F., Erusalimsky J.D. (2007). The effects of chronic tea intake on platelet

activation and inflammation: a double-blind placebo controlled trial. *Atherosclerosis* **193**: 277-282.

**Stickel F.**, and Seitz H. (2000). The efficacy and safety of comfrey. *Public Health Nutr.* **3**: 501-508.

**Stoicov C.**, Saffari R., Houghton J. (2009). Green tea inhibits *Helicobacter* growth in vivo and in vitro. *International Journal of Antimicrobial Agents.* **33**: 473-478.

**Subramanian N.**, Venkatesh P., Ganguli S., Sinkar, V.P. (1999). Role of polyphenol oxidase and peroxidase in the generation of black tea theaflavins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**: 2571-2578.

**Tabak C.**, Arts I.C., Smit H.A., Heederik D., Kromhout, D. (2001). Chronic obstructive pulmonary disease and intake of catechins, flavonols, and flavones: the MORGEN Study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164**: 61-64.

**Tan V.P.Y.**, Wong B.C.Y. (2011). *Helicobacter pylori* and gastritis: Untangling a complex relationship 27 years on. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **26**: 42–45.

**Tappenden K.A.**, Deutsch A.S. (2007). The physiological relevance of the intestinal microbiota—contributions to human health *J. Am. Coll. Nutr.* **26**: S679–683.

**Timbo B.**, Ross M., McCarthy P., Lin C., Dietary supplements in a National Survey: Prevalence of use and reports of adverse events. (2006). *J. Am. Diet. Assoc.* **106**:1966-1974.

**Toledano M. B.**, Leonard W. J. (1991). Modulation of transcription factor NF-kappa B binding activity by oxidation-reduction in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* **88**: 4328-4332.

- Tsuda M.**, Karita M., Morshed M.G., Okita K., Nakazawa T. (1994). A urease negative mutant of *Helicobacter pylori* constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mouse stomach. *Infect. Immun.* **62**: 3586–3589.
- Usha P.R.**, Naidu M.U.R. (2006a). Clinical efficacy and safety evaluation 402 of eazmov plus in rheumatoid arthritis. *Phytomedica* **7**: 1-7.
- Usha P.R.**, Naidu M.U.R. (2006b). Clinical evaluation of Eazmov plus in patients of osteoarthritis. *Phytomedica*. **7**: 21-30.
- Usharani P.**, Mateen A.A., Naidu M.U.R., Raju Y.S.N., Chandra N. (2008). Effect of NCB-02, Atorvastatin and placebo on endothelial function, oxidative stress and inflammatory markers in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized, parallel- group, placebo-controlled, 8-week study. *Drugs R. D.* **9**: 243-250.
- Van Dau N.**, Ngoc Ham N., Huy Khac D., Thi Lam N., Tong Son P., Thi Tan N., Duc Van D., Dahlgren S., Grabe M., Johansson R., Lindgren G., Stjernstrom N. (1998). The effects of a traditional drug, turmeric (*Curcuma longa*), and placebo on the healing of duodenal ulcer. *Phytomedicine* **5**: 29-34.
- Van het Hof K.H.**, de Boer H.S., Wiseman S.A., Lien N., Westrate J.A., Tijburg L.B. (1997). Consumption of green or black tea does not increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **66**: 1125-1132.
- Widlansky M.E.**, Duffy S.J., Hamburg N.M., Gokce N., Warden B.A., Wiseman S., Keaney J.F., Frei B., Vita J.A. (2005). Effects of black tea consumption on plasma catechins and markers of oxidative stress and inflammation in patients with coronary artery disease. *Free Radic. Biol. Med.* **38**: 499-506.
- Wildman R.E.C.**, Handbook of nutraceuticals and functional foods, *CRC Press*, 2007.
- Williams C.J.**, Fargnoli J.L., Hwang J.J., van Dam R.M., Blackburn G.L., Hu F.B., Mantzoros C.S. (2008). Coffee consumption is associated with higher plasma

adiponectin concentrations in women with or without type 2 diabetes: a prospective cohort study. *Diabetes Care* **31**: 504-507.

**Wu L.**, Wang X., Xu W., Farzaneh F., Xu R. (2009). The structure and pharmacological functions of coumarins and their derivatives. *Curr. Med. Chem.* **16**: 4236-4260.

**Wullaert A.**, Bonnet M.C., Pasparakis M. (2011). NF- $\kappa$ B in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation. *Cell Research.* **21**: 146–158.

**Wullaert A.**, Heyninck K., Janssens S., Beyaert R. (2006). Ubiquitin: tool and target for intracellular NF-kappaB inhibitors. *Trends Immunol.* **27**: 533–540.

**Xiang Z.**, Censini S., Bayeli P.F., Telford J.L., Figura N., Rappuoli R., Covacci A. (1995). Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect. Immun.* **63**: 94–98.

**Yadav V.R.**, Prasad S., Sung B., Aggarwal B.B. (2011). The role of chalcones in suppression of NF-kappaB-mediated inflammation and cancer. *Int. Immunopharmacol.* **11**: 295-309.

**Yamaoka S.**, Courtois G., Bessia C., Whiteside S.T., Weil R., Agou F., Kirk H.E., Kay R.J., Israël A. (1998). Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell.* **93**: 1231–1240.

**Yoon J.H.**, Baek S.J. (2005). Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei Med. J.* **46**: 585–596.

**Young J.F.**, Dragsted L.O., Daneshvar B., Lauridsen S.T., Hansen M., Sandstrom B. (2000). The effect of grape-skin extract on oxidative status. *British J. Nutr.* **85**: 505-513.

**Yuan J.M.**, Sun C., Butler L.M. (2011). Tea and cancer prevention:

epidemiological studies. *Pharmacological Research*. **64**: 123-135.

**Zandi** E., Chen Y., Karin M. (1998). Direct phosphorylation of IkappaB by IKKalpha and IKKbeta: discrimination between free and NF-kappaB-bound substrate. *Science*. **281**:1360–1363.

**Zern** T.L., Wood R.J., Greene C., West K.L., Liu Y., Aggarwal D., Shachter N.S., Fernandez M.L. (2005). Grape polyphenols exert a cardioprotective effect in pre- and postmenopausal women by lowering plasma lipids and reducing oxidative stress. *J. Nutr.* **135**: 1911-1917.

**Zhao** G., Etherton T.D., Martin K.R., West S.G., Gillies P.J., Kris-Etherton P.M. (2004). Dietary alpha-linolenic acid reduces inflammatory and lipid cardiovascular risk factors in hypercholesterolemic men and women. *J. Nutr.* **134**: 2991-2997.

## RINGRAZIAMENTI

Sono stati tre anni intensi, difficili e bellissimi, anni che non si dimenticano. Ciò che ho imparato, le persone conosciute, le persone che ci sono da sempre, i gesti, le parole, la fatica e la gioia della ricerca, le lacrime, le risate, hanno intessuto questi anni d'inestimabile ricchezza e pienezza. Per questi motivi, vorrei ringraziare tutte le persone che hanno fatto parte della mia vita in questi anni, che hanno creduto in me al di là di tutto, che in tante occasioni mi hanno dato nuova forza per guardare avanti e continuare ad inseguire questo sogno.

Un grazie speciale alla Prof.ssa Patrizia Restani, senza la quale tutto ciò non sarebbe stato possibile. Un grazie anche per tutto ciò che mi ha insegnato, nel lavoro e nella vita.

Un enorme grazie a Paolo, per esserci sempre stato, per non avermi mai fatto pesare le mie scelte, per aver condiviso con me ogni sacrificio e ogni gioia di questo percorso, sempre con il sorriso, anche nei giorni bui.

Grazie a Francesca, il dono della sua amicizia è stata una delle più belle sorprese, come scoprire che ci si può comprendere davvero anche solo con uno sguardo, con poche parole, con il silenzio. Grazie per tutto il suo sostegno e per aver sempre creduto in me.

Grazie a Mario, amico prezioso, per tutto ciò che abbiamo condiviso, per i momenti d'intenso lavoro, per il tempo che, nonostante gli impegni, riesce sempre a trovare per me, per l'aiuto che mi ha dato, per i suoi insegnamenti, la sua generosità, la sua simpatia, le sue parole.

Grazie ad Enrico ed Elisa, per la loro disponibilità e simpatia, per tutto l'aiuto e i consigli che mi hanno dato nel lavoro quotidiano.

Grazie a Mario P., perché mi ha dato la forza e il coraggio di cambiare e di ricominciare come non lo avrei mai ritenuto possibile, per la sua costante presenza e pazienza.

Grazie ad Elena, Ariana e il Dott. Moro, per il lavoro che abbiamo fatto insieme e per l'aiuto che mi hanno dato.

Un grazie speciale a Franco, Mina e Chicco, per la loro infinita generosità e per avermi fatto sempre sentire parte della loro famiglia.

Grazie a mia nonna Raffaella, per tutte le cose che mi ha detto nella sua ultima estate.

Infine, vorrei ringraziare Anna e Patrizia, insostituibili “compagne di banco” durante le lezioni di Dottorato e per essermi state vicine in questi difficili ultimi mesi.