

Proprietà salutistiche delle arance rosse di Sicilia.: un *elisir* dell'Etna

Francesco Bonina*, Carmelo Puglia.

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Catania;

Antonella Saija, Domenico Trombetta.

Dipartimento Farmaco-Biologico, Università di Messina;

Angelo Vanella, Antonella Russo.

Dipartimento di Chimica Biologica, Chimica Medica e Biologia Molecolare, Università di Catania;

Paolo Rapisarda

Istituto Sperimentale per l'Agrumicoltura, Acireale, Catania;

Ugo Cornelli

Loyola University Medical School, Neuroscience and Aging Institute, Maywood, Illinois, USA;

Giovanni Tringali, Elio Insirello.

Istituto di Ricerca Medica e Ambientale (I.R.M.A.), Acireale, Catania;

Margherita Ferro

Dipartimento di Medicina Sperimentale, Divisione di Patologia Generale, Università di Genova;

* Autore a cui inviare la corrispondenza : Prof. Francesco Bonina – Dipartimento di Scienze Farmaceutiche – Università di Catania Viale A. Doria 9, 95125 Catania
Tel 095 738 4201-4001 e-mail boninaf@unict.it

1. Le arance rosse e la Sicilia

La produzione di arance a polpa rossa è tipica della parte della Sicilia orientale circostante l'Etna. In questa zona alcune varietà pigmentate del *Citrus Sinensis* (var. Moro, Tarocco e Sanguinello) hanno trovato le condizioni ambientali idonee per esprimere al meglio le loro caratteristiche genotopiche.

Nonostante sia difficile ricostruire un dettagliato percorso mediante il quale gli agrumi, e quindi le arance rosse, siano pervenute in Sicilia, è possibile comunque

delinare le principali tappe della diffusione degli agrumi nell'isola (1).

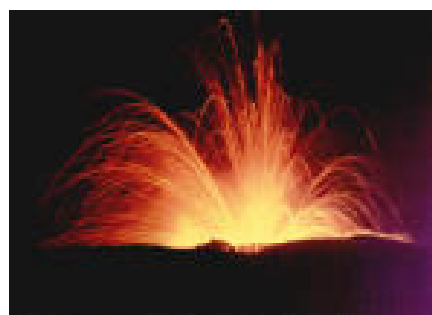


Fig.1 Eruzione dell'Etna

Un mosaico della villa del Casale di Piazza Armerina testimonia ad esempio che nel periodo tardo-imperiale romano erano già presenti in Sicilia il cedro ed il limone.

L'arancio amaro è stato introdotto in Sicilia dagli arabi nel corso del VII secolo e probabilmente fino al XVI secolo furono coltivate soltanto arance bionde e soprattutto per scopo ornamentale: per questo motivo ancora oggi le coltivazioni di agrumi sono chiamate dai siciliani “giardini”. Ritornando alle arance rosse, è soltanto nel XVII secolo che troviamo la prima descrizione di questo agrume da parte del gesuita Ferrari nell'opera *Hesperides* (1646).



Fig.2 Arance rosse di Sicilia

L'autore descriveva per la prima volta un frutto di una varietà particolare di arance, *Aurantium indicum*, dalla polpa pigmentata (*purpurei coloris medulla*), portato in Sicilia da un missionario genovese di ritorno dalle isole Filippine. In ogni modo è soltanto agli inizi del XIX secolo che la produzione delle arance rosse in Sicilia assume rilevanza primaria per l'agricoltura siciliana.

2. Descrizione dell'estratto di arance rosse di Sicilia (R.O.C)

R.O.C. è un estratto standardizzato ottenuto dal succo e dalle bucce di tre varietà di *Citrus sinensis* (Moro, Tarocco, Sanguinello) attraverso un particolare estrattivo. Queste varietà di arance crescono esclusivamente in Sicilia e differiscono dalle varietà di arance bionde per la presenza di pigmenti rossi appartenenti alla classe delle antocianine (soprattutto cianidin-3-glucoside) e per una maggiore concentrazione di sostanze antiossidanti come acidi idrossicinnamici (ferulico, cumarico, ceffeico e sinapico), flavanoni (esperidina e narirutina) ed acido ascorbico. R.O.C. contiene il 20 % di ingredienti attivi (antocianine, flavanoni, acidi idrossicinnamici ed acido ascorbico) presenti nell'arancia rossa di Sicilia (vedi tab.1).

<i>Sostanze attive</i>	<i>% p/p</i>
Antocianine (cianidin-3-glucoside)	2.8 – 3.2
Acidi idrossicinnamici (caffeico, cumarico, ferulico, sinapico)	1.8 – 2.2
Flavanoni (esperidina, narirutina)	8.5 – 9.5
Acido ascorbico	5.5 – 6.5

Tab.1 Composizione chimica del R.O.C.

Queste sostanze rappresentano un potente pool antiossidante che difende il frutto dalle condizioni climatiche estreme (elevate

escursioni termiche) che si verificano nella zona circostante l'Etna.



Fig.3 Eruzione Etna Novembre 2002

3. Proprietà antiossidanti e antiradicaliche dei componenti presenti nelle arance rosse di Sicilia

Numerosi lavori scientifici dimostrano l'attività antiossidante ed antiradicalica dei componenti presenti nelle arance rosse di Sicilia.

La cianidina-3-glucoside rappresenta circa il 90% delle antocianine presenti nell'arancia rossa, a differenza delle altre fonti di antociani (sambuco, mirtillo, etc.) la cui composizione antocianosidica è molto più variegata (presenza di differenti antocianine). L'attività antiossidante e radical scavenging della cianidina-3-glucoside, è stata ampiamente evidenziata in diversi modelli sperimentali (2-7).

La Fig. 4 mostra che la cianidina-3-glucoside è molto più attiva della vitamina C nel disattivare le specie radicaliche ossigenate (5), mentre la Fig.5 dimostra che la cianidina-3-glucoside risulta, tra le antocianine più

diffuse nei frutti, quella dotata di maggiore attività antiossidante (6).

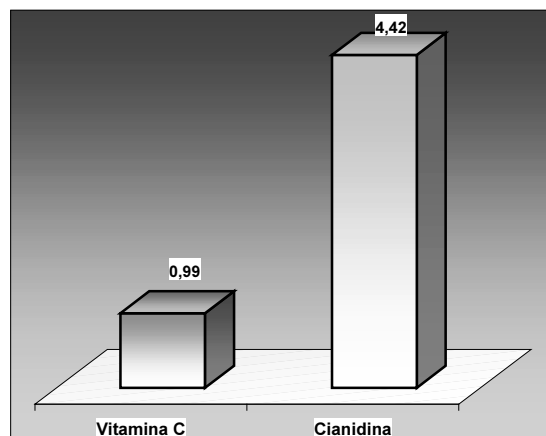


Fig.4 Attività antiossidante di vitamina C e cianidina

In un recente lavoro (7), è stato dimostrato che la cianidin-3-glucoside (principale antocianina presente nel R.O.C.) possiede un'elevata attività antiossidante-antiradicalica, superiore a quella presentata dal resveratrolo e dall'acido ascorbico.

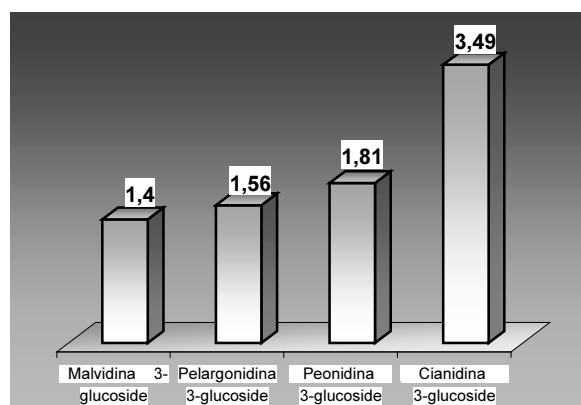


Fig.5 Capacità di assorbimento di radicali ossigenati delle più diffuse antocianine

Quest'elevata attività della cianidin-3-glucoside si traduce in una maggiore inibizione, rispetto alla vitamina C ed al resveratrolo, del processo ossidativo delle lipoproteine a basso peso molecolare (LDL): processo questo che rappresenta un passaggio

chiave nella genesi di alcuni processi degenerativi (aterosclerosi, disturbi cardiocircolatori etc.) (7).

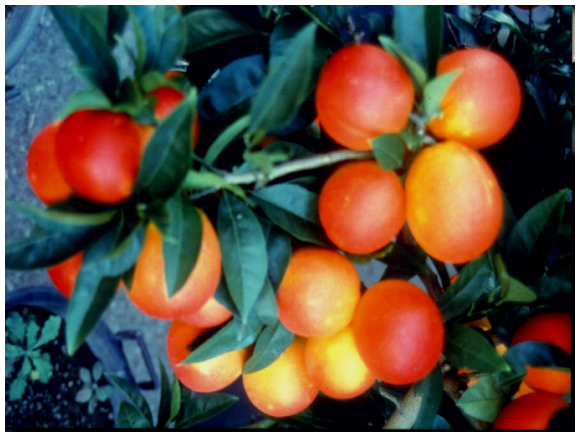


Fig.6 Arance rosse di Sicilia

Per quanto concerne l'attività della frazione flavononica (esperidina, narirutina) presente nel R.O.C., diversi lavori riportano la loro capacità di inibire la lipoperossidazione indotta in sistemi liposomiali da esposizione alle radiazioni UVB (8) e la protezione che questi esercitano sulla struttura del DNA nei confronti dei danni indotti dalle radiazioni UVB (9).

Inoltre l'attività antiossidante degli acidi idrossicinnamici (in particolare del ferulico e del caffeico), dei flavanoni (esperidina e narirutina) e dell'acido ascorbico è già ampiamente riportata e descritta in letteratura da numerosi lavori (10-13).

4. Effetto antiossidante ed antiradicalico dell'estratto R.O.C.

Sulla base dell'attività biologica riportata in letteratura per i singoli componenti presenti nell'arancia rossa, l'estratto R.O.C. è stato sottoposto ad una serie di sperimentazione allo scopo di valutarne il profilo antiossidante ed antiradicalico.

L'effetto antiossidante-antiradicalico del R.O.C. è stato determinato in differenti modelli in vitro (14).

In un primo modello (DPPH test) è stato valutato l'effetto radical scavenging del R.O.C. determinando la sua capacità di reagire con un radicale libero stabile come l'1,1-difenil-2-picrilidrazil in soluzione omogenea.

In un secondo modello (LP-LUV test), costituito da un sistema liposomiale unilamellare (dipalmitoilfosfatidilcolina/acido linoleico), è stata valutata l'efficacia del R.O.C. di inibire il processo di lipoperossidazione innescato mediante un azocomposto idrosolubile in grado di generare radicali liberi.

Questo modello, in grado di mimare il comportamento di una membrana biologica, risulta particolarmente interessante per valutare l'efficacia di un estratto nel proteggere i componenti lipidici di una membrana biologica dalla lipoperossidazione radicalica (15).

Nel terzo modello (UV-IP test), è stato determinato l'effetto protettivo in vitro del

R.O.C. nei confronti della lipoperossidazione indotta dalle radiazioni UVB in un sistema di membrana costituito da sospensioni liposomiali multilamellari di fosfatidilcolina. In questo caso alla fine dell'esperimento è stata monitorata la concentrazione della malondialdeide (MDA) formata dalla degradazione ossidativa dei lipidi di membrana, in presenza di R.O.C. o di cianidina-3-glucoside pura. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato ed i risultati sono stati espressi come SC₅₀ (Scavenging concentration-DPPH test) oppure come IC₅₀ (Inhibitory concentration- LP-LUV test e UV-IP test) cioè come concentrazioni utili a dimezzare, rispetto al controllo, l'entità del danno ossidativo. Ovviamente, in questi modelli, più piccole sono le concentrazioni SC₅₀ ed IC₅₀ e maggiore è l'attività antiossidante e antiradicalica dell'estratto testato. I risultati ottenuti, nei tre modelli sperimentali utilizzati, (Tab.2), dimostrano una evidente azione inibitrice del R.O.C., nei confronti dei processi ossidativi.

Test	R.O.C. Espresso come cianidina-3- glucoside (µM)	cianidina-3- glucoside pura (µM)
DPPH		
SC ₅₀	8.60	26.87
95% CL	7.55 – 9.78	24.35 – 29.65
LP – LUV		
IC ₅₀	2.31	20.03
95% CL	2.03 – 2.61	15.61 – 25.70
UV – IP		
IC ₅₀	56.49	429.41
95% CL	47.84 – 66.71	386.28 – 477.35

CL= limite di confidenza al 95%

Tab.2 Attività radical-scavenger e effetto antiossidante dell'estratto R.O.C. o della cianidina-3-glucoside pura.

Tale attività antiossidante si realizza già a concentrazioni sufficientemente basse e comunque inferiori a quelle necessarie alla cianidina-3-glucoside pura per ottenere lo stesso grado di inibizione. Questi risultati dimostrano che la cianidina-3-glucoside presente nel R.O.C. risulta notevolmente più attiva di quella pura. Questa incrementata attività è da attribuire presumibilmente ad un forte effetto sinergico esercitato dalle altre sostanze presenti nell'estratto R.O.C. (flavanoni, acidi idrossicinnamici ed acido ascorbico).

Un'altra interessante considerazione che emerge dalla disamina dei risultati riguarda l'elevata attività del R.O.C. riscontrata nel modello di membrana LP-LUV (bassa concentrazione IC₅₀), che sottintende una buona capacità dei componenti del R.O.C. di interagire con le biomembrane.

5. Effetto protettivo del R.O.C. nei confronti del “cleavage” del DNA indotto da radicali liberi.

Il DNA è sicuramente un componente cellulare molto sensibile all'azione deleteria dei radicali liberi prodotti sia da fattori ambientali (inquinamento atmosferico, eccessive esposizioni alle radiazioni solari, etc.) che comportamentali (stress, fumo etc). Il danno iniziale provocato al DNA dai radicali liberi (cleavage ed altri effetti) rappresenta il primo di una serie di eventi biologici degenerativi che possono sfociare in

gravi patologie (tumori, malattie cardiovascolari etc). Pertanto un importante obiettivo della supplementazione con integratori alimentari riguarda la protezione dei componenti cellulari sensibili come il DNA.

In letteratura è ampiamente riportato che l'esposizione "in vitro" del DNA a radicali idrossilici, generati per UV-fotolisi dell'acqua ossigenata, provoca dei tagli sulla doppia elica del DNA circolare chiuso superavvolto (supercoiled, scDNA) proveniente da un plasmide. La struttura di tale DNA è paragonabile a quella del DNA mitocondriale di una cellula eucariota.

Sulla base di quanto sopra detto, recentemente è stato valutato (16) l'effetto protettivo dell'estratto R.O.C. nei confronti dell'azione degenerativa dei radicali perossilici, ottenuti per UV-fotolisi dell'acqua ossigenata, sulla struttura del DNA plasmidico pBR322. L'azione aggressiva di tali specie radicaliche nei confronti delle molecole di DNA superavvolto (scDNA), porta alla rottura di tali strutture complesse con formazione di DNA circolare (open circular, ocDNA) e per ultimo a molecole di DNA lineare (linDNA) (fig.7).

I risultati ottenuti con il R.O.C. sono stati confrontati con quelli registrati con la vitamina C e con il Trolox (anologo idrosolubile della vitamina E). In questo studio, l'estratto R.O.C. ha dimostrato di possedere un'elevata capacità nel proteggere in maniera significativa il DNA plasmidico

dal "cleavage" indotto dai radicali perossilici, mentre la vitamina C e del Trolox, hanno dimostrato soltanto un modesto effetto protettivo.

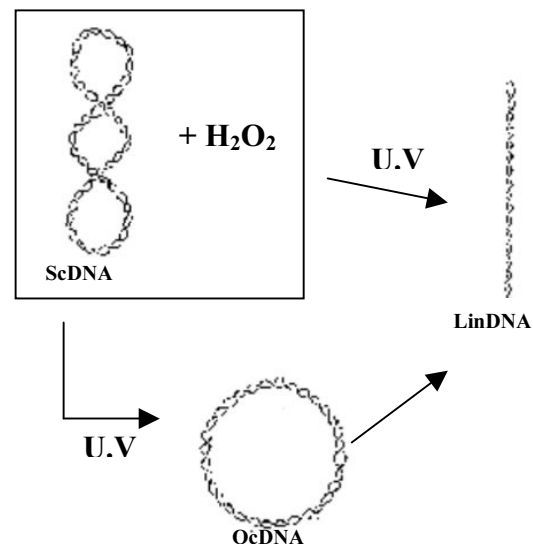


Fig.7 Meccanismo di cleavage del DNA mediato da radicali perossilici

L'aggiunta dell'estratto di arance rosse ha prodotto una diminuzione significativa del numero di Single Strand Breaks (SSB) (numero di tagli sul DNA plasmidico) (figura 8) evitando la formazione di DNA lineare (linDNA) con un parziale recupero della forma circolare (ocDNA).

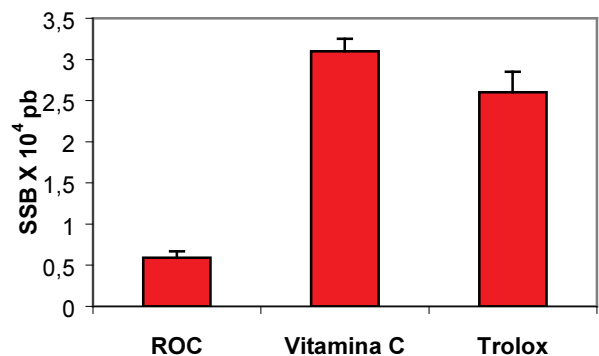


Fig.8 Single Strand Breaks (SSB) indotti dall'H₂O₂ in combinazione con l'estratto R.O.C., vitamina C e Trolox. Ciascun valore rappresenta la media ± D.S. di cinque esperimenti

Altri dati sperimentali riportati nello stesso lavoro (16), indicano che l'estratto R.O.C. presenta un'azione simile a quella esibita dalla superossido dismutasi (SOD), enzima che catalizza la reazione di dismutazione dell'anione superossido in acqua ossigenata. In questi tests l'anione superossido è stato generato dall'autossidazione di un composto tiolico, il β -mercaptoetanolo. I risultati ottenuti dimostrano che il R.O.C. alla concentrazione di 0.330 $\mu\text{g/ml}$ è stato in grado di inibire del 100% la formazione dell'anione superossido e tale attività era paragonabile a quella esibita dalla SOD (80mU/ml) (figura 9).

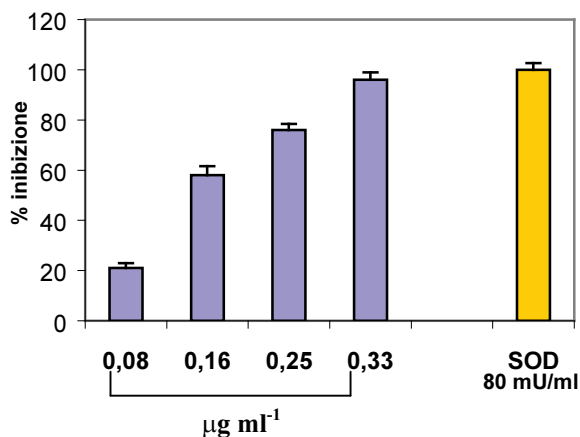


Fig. 9 Percentuale di inibizione dell'estratto R.O.C., a diverse concentrazioni, nei confronti dell'anione superossido.

6. Effetto protettivo sui danni indotti da eccessiva produzione di radicali liberi alla pelle ed ai suoi componenti.

Una copiosa letteratura scientifica riporta che un'eccessiva produzione di radicali liberi nella pelle, dovuta a diversi fattori (inquinamento, stress, fumo, radiazioni solari etc.), determina gravi danni al tessuto cutaneo. Recentemente sono stati effettuati diversi studi allo scopo di verificare la capacità dell'estratto R.O.C. di proteggere la pelle dai danni ad essa provocati da eccessiva presenza di radicali liberi.

In uno di questi lavori (17), è stata investigata la capacità del R.O.C. di inibire la lipoperossidazione indotta da FeSO_4 /istidina in colture cellulari di fibroblasti e cheratinociti umani: le cellule cutanee trattate con l'estratto R.O.C. sono risultate sufficientemente protette dal processo ossidativo con un effetto protettivo che risultava dose-dipendente.

I risultati sono stati espressi come quantità di specie reattive all'acido tiobarboturico TBARS (thiobarbituric acid – reactive substances) che si formano durante il processo ossidativo (fig.10).

In un altro studio condotto *in vivo* (14), l'estratto R.O.C., applicato topicamente, ha dimostrato di proteggere efficacemente la pelle dai danni provocati a questo tessuto da eccessive esposizioni alle radiazioni UVB.

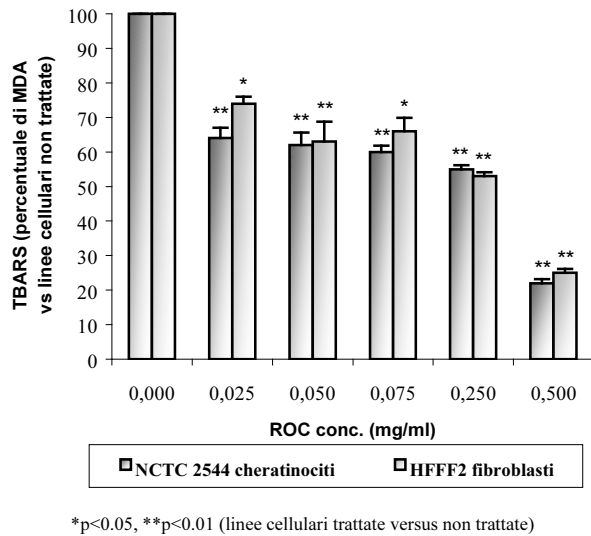


Fig.10 Produzione di malondialdeide (MDA) in due linee di cellule umane trattate con R.O.C. durante lo stimolo ossidativo. L'agente ossidante utilizzato è stato il complesso Fe²⁺/istidina per 1 ora.

In questo caso, per la valutazione della capacità antiradicalica in vivo dell'estratto R.O.C. sono stati impiegati volontari sani, negli avambracci dei quali, sono stati indotti, tramite lampada ultravioletta, eritemi cutanei di opportuna intensità.

Dopo l'irradiazione, sui siti cutanei esposti, sono state applicate delle soluzioni contenenti il 2% di tocoferil acetato (usato come formulazione di riferimento: TOC) o l'estratto R.O.C.. Il conseguente eritema cutaneo sviluppatosi è stato monitorato per 72 ore, mediante spettrofotometria di riflettanza e calcolando le aree (AUC) sottese dalle curve che si ottengono riportando l'indice di eritema (ottenuto strumentalmente) in funzione del tempo. Dai valori delle AUC è possibile ottenere le percentuali di inibizione dell'eritema cutaneo (P.I.E.) sia per l'estratto R.O.C. che per il tocoferil acetato (TOC).

Come è possibile osservare in Fig.11, l'estratto R.O.C. ha determinato una maggiore inibizione dell'eritema, rispetto al tocoferolo acetato (TOC), dimostrando di possedere una maggiore capacità fotoprotettiva della pelle.

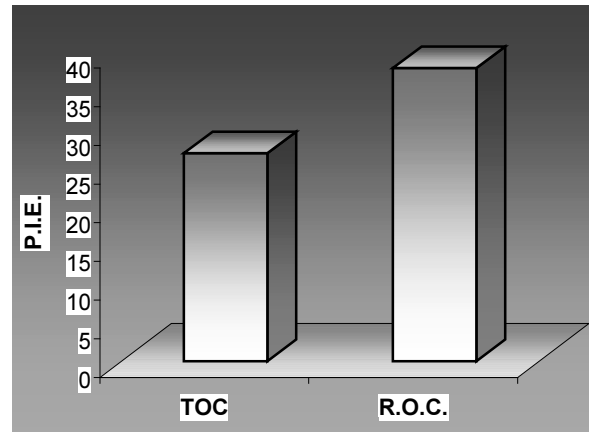


Fig.10 Percentuali di inibizione dell'eritema cutaneo (P.I.E.) ottenute dopo applicazione delle soluzioni TOC e R.O.C. sui siti cutanei irradiati.

7. Effetto della supplementazione con R.O.C. in soggetti con stress ossidativo (diabetici, fumatori, sportivi)

Allo scopo di verificare le potenzialità d'uso dell'estratto R.O.C. come ingrediente da utilizzare in prodotti salutistici (integratori alimentari), sono stati condotti studi in vivo su soggetti con diminuite capacità antiossidanti (diabetici, fumatori, sportivi).

E' ampiamente riportato in letteratura che determinati soggetti presentano un forte stato di stress ossidativo dovuto a:

- particolari patologie (diabetici, dializzati etc.);
- stili di vita non salutari (eccessivo alcool, fumo etc.);

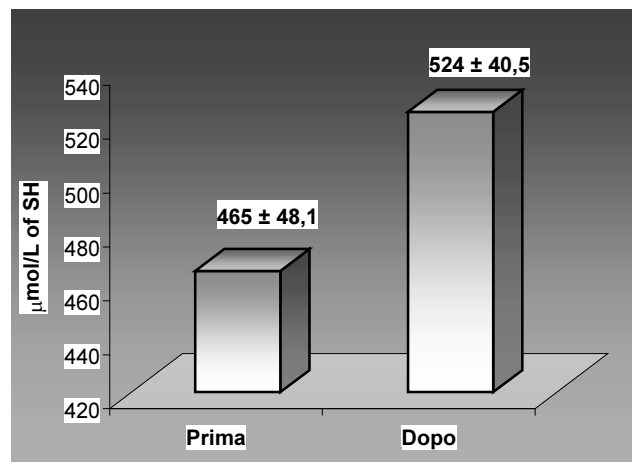
- eccessiva o saltuaria attività sportiva.

Recentemente alcuni studiosi hanno evidenziato, un aumento dei livelli di stress ossidativo in soggetti fumatori, associato all'elevata concentrazione di radicali liberi presenti nel fumo delle sigarette (18).

Uno studio recente ha valutato l'effetto della supplementazione con R.O.C. sullo stress ossidativo di 14 fumatori (19). In questo lavoro il livello di stress ossidativo da fumo è stato determinato monitorando nei soggetti fumatori, prima e dopo la supplementazione con R.O.C, sia la concentrazione nel plasma dei gruppi tiolici che il potere antiossidante del sangue (D-Roms test). Le sostanze tioliche rappresentano infatti una delle classi di antiossidanti endogene più efficaci nel contrastare un'eccessiva produzione di radicali liberi nel nostro organismo. Un aumento dei loro livelli sierici ha il significato di un rafforzamento del sistema antiossidante del sangue. Nei soggetti con compromesse attività antiossidanti (vedi fumatori, diabetici etc..) la concentrazione sierica dei gruppi tiolici appare significativamente diminuita rispetto a quella registrata in individui non soggetti a stress ossidativo. Un altro importante parametro in grado di monitorare in vivo lo stress ossidativo nel sangue è il D-Roms test (20). Questo test è in grado di determinare la concentrazione plasmatici degli idroperossidi e viene espresso in Unità Caratelli. Lo studio è stato condotto somministrando ai soggetti fumatori due volte al giorno 1 capsula da 40 mg di R.O.C. per

sette giorni consecutivi e determinando i valori del D-Roms test e della concentrazione tiolica plasmatica prima e dopo la supplementazione con R.O.C..

I risultati ottenuti nella sperimentazione



hanno evidenziato un notevole e significativo incremento della concentrazione plasmatica dei gruppi tiolici (Fig.11) nei soggetti fumatori supplementati con R.O.C. e quindi una conseguente diminuzione del danno ossidativo indotto dall'eccessivo consumo di sigarette.

Fig.11 Effetto della supplementazione con l'estratto R.O.C. sui valori dei gruppi tiolici in soggetti fumatori

Nessuna significativa variazione è stata invece registrata nei valori di D-Roms test durante la sperimentazione condotta sui fumatori, probabilmente a causa della brevità del protocollo (1 settimana).

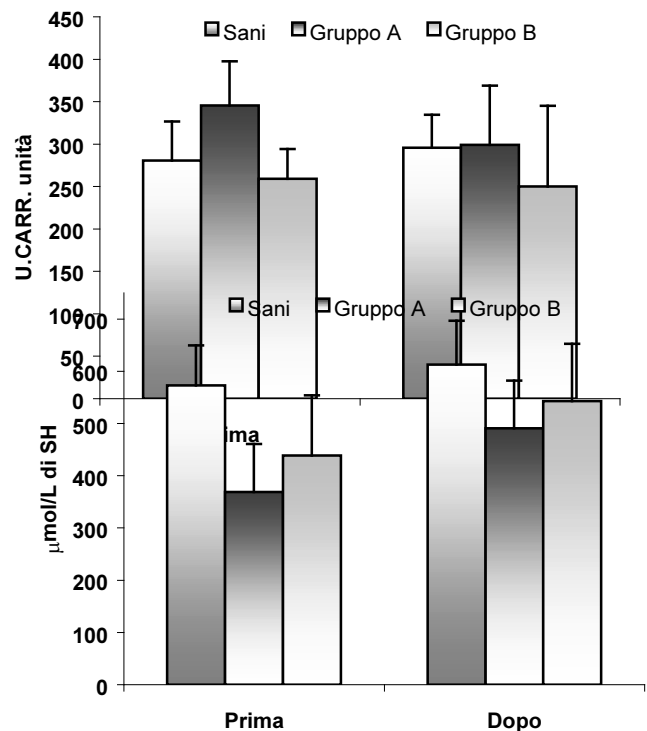
Successivamente, sempre allo scopo di valutare l'efficacia della supplementazione in vivo del R.O.C. sullo stress ossidativo, un altro studio è stato condotto su soggetti diabetici. La letteratura riporta che il diabete

mellito è associato ad elevati livelli di stress ossidativo, causati da un effettivo sbilanciamento tra la produzione di radicali liberi e i sistemi antiossidanti endogeni (21).

L'eccessivo stato di stress ossidativi nei soggetti diabetici contribuisce notevolmente all'insorgenza nel tempo di gravi patologie che spesso determinano la mortalità di questi soggetti.

Nello studio da noi condotto (22), sono stati valutati gli effetti della supplementazione con R.O.C. in 33 soggetti diabetici (Tipo 2) ed in 28 volontari sani. La supplementazione è stata protratta per due mesi e prevedeva la somministrazione orale di 50 mg/die di R.O.C. I soggetti diabetici ed i volontari sani sono stati monitorati mediante alcuni non invasivi biomarkers dello stress ossidativo come il D-Roms test e la concentrazione di gruppi tiolici nel plasma. I soggetti diabetici ed i soggetti volontari sani sono stati inizialmente suddivisi, sulla base dei valori registrati all'inizio della sperimentazione con il D-Roms test, in soggetti non stressati (Unità Caratelli < 300), soggetti "bordeline" (Unità Caratelli 300-400) e soggetti stressati (Unità Caratelli > 400). I risultati ottenuti sono riportati nelle figure 12 e 13 e dimostrano chiaramente come in tutti i soggetti diabetici (non stressati, bordeline e stressati), dopo supplementazione con R.O.C. si registra un significativo incremento dei livelli ematici dei gruppi tiolici, che rappresentano una misura indiretta della concentrazione di glutazione ridotto nel plasma. Queste evidenze

confermano l'effetto protettivo che il R.O.C. può esercitare sui componenti antiossidanti endogeni (come composti tiolici) in soggetti



con compromesse capacità antiossidanti.

Fig.12 Effetto della supplementazione con l'estratto R.O.C. sui valori del D-ROMs test in soggetti diabetici in condizioni di stress ossidativo (gruppo A), senza stress ossidativo (gruppo B) e su volontari sani.

Inoltre, per quanto concerne l'altro parametro (D-Roms test), sono state osservate significative diminuzioni di questo biomarker, soltanto per i soggetti diabetici con forte stress ossidativo (valori di Unità Caratelli all'inizio della sperimentazione > di 400).

Fig.13 Effetto della supplementazione con l'estratto R.O.C. sui valori dei gruppi tiolici in soggetti diabetici in condizioni di stress ossidativo (gruppo A), senza stress ossidativo (gruppo B) e su volontari sani

Recentemente è stata condotta un'altra sperimentazione finalizzata alla valutazione

degli effetti della supplementazione con R.O.C. sullo stress ossidativo negli sportivi.

In questi ultimi anni diversi ricercatori hanno dimostrato che una strenua attività fisica in soggetti che praticano sport, sia a livello agonistico che amatoriale, è spesso associata ad una sovrapproduzione di radicali liberi (23) che a sua volta determina una diminuzione delle difese antiossidanti.

In questa sperimentazione sono stati valutati gli effetti della supplementazione a breve termine (due mesi) con il R.O.C. sullo stress ossidativo in 17 atleti agonisti (appartenenti ad una squadra di pallamano, età compresa tra 18 e 30 anni), ed in 20 volontari sani “sedentari”, che non svolgevano alcuna abituale attività sportiva e che costituiscono il gruppo di controllo. Nessun soggetto era fumatore ed a ciascuno di essi è stato chiesto di non modificare le abitudini alimentari e di non assumere farmaci ed integratori alimentari per tutto il periodo della sperimentazione.

A tutti i soggetti è stata somministrata una dose di 50 mg di R.O.C. in capsule 2 volte al giorno per due mesi.

Prima e dopo la supplementazione con R.O.C. sono stati determinati, in ciascun volontario, i valori plasmatici del TAS (Total Antioxidant Status), della concentrazione ematica dei gruppi tiolici, della malondialdeide e dei radicali liberi (D-Roms test). Inoltre nei linfociti dei soggetti partecipanti allo studio, sono stati determinati i valori degli scambi tra

cromatidi fratelli (SCE), un marker molecolare di danno a livello citogenetico provocato alla struttura del DNA dai radicali liberi o da altre sostanze mutagene. In particolare, quanto più elevato è il numero di scambi SCE tanto più grave è il danno mutageno alla cellula. All’inizio della sperimentazione, in tutti gli sportivi esaminati sono stati osservati livelli ematici di gruppi tiolici e di TAS significativamente più bassi rispetto al gruppo di controllo, insieme a livelli ematici di radicali liberi e di MDA marcatamente più alti. Inoltre, nel gruppo degli atleti è stato misurato un numero di SCE significativamente maggiore rispetto ai controlli. Alla fine della sperimentazione, ovvero a due mesi dall’inizio della supplementazione, i valori sierici di gruppi tiolici, radicali liberi e TAS sono risultati quasi sovrapponibili a quelli dei controlli (tab.3).

<i>Test</i>	<i>Prima</i>	<i>Dopo</i>
D-Roms (U.Car)	378.0 ± 48.0	262.6 ± 51.9
Gruppi tiolici ($\mu\text{mol/L SH}$)	377.4 ± 99.6	630.7 ± 40.7
TAS	0.469 ± 0.26	1.18 ± 0.32
MDA (μM)	1.98 ± 0.96	1.31 ± 0.50

Tab 3. Valori di D-Roms test (U.Car), Thiol groups test ($\mu\text{mol/L}$ di SH), TAS (Total Antioxidant Status) e MDA (μM) ottenuti per ciascun soggetto prima e dopo la supplementazione con R.O.C.

Inoltre sia i valori di MDA che gli scambi tra cromatidi gemelli (SCE) sono diminuiti

significativamente fino a raggiungere valori confrontabili con quelli dei soggetti controllo. La tendenza nella diminuzione degli SCE è sicuramente un indice di una costante attività di protezione sul DNA esercitata dall'estratto R.O.C. (Fig.14).

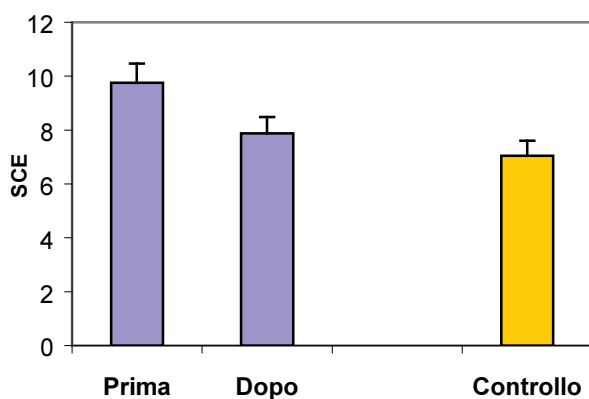


Fig.14 Valori degli scambi tra cromatidi fratelli (Sister Chromatid Exchange, SCE) in soggetti di controllo e soggetti sottoposti a sperimentazione prima e dopo la supplementazione con l'estratto R.O.C..

I risultati relativi a quest'ultima sperimentazione confermano quanto già ottenuto con altre tipologie di soggetti con diminuite capacità antiossidanti (diabetici e fumatori).

8. Conclusioni

Sulla base dei risultati ottenuti negli studi effettuati, l'estratto R.O.C. può essere utilizzato con efficacia nella formulazione di prodotti dietetico-nutrizionali (integratori alimentari) e "functional foods" destinati a migliorare le difese di soggetti con compromesse capacità antiossidanti e con stress ossidativo (fumatori, sportivi, diabetici, etc.).

Inoltre, per la capacità del R.O.C. di proteggere il tessuto cutaneo ed i suoi componenti dai danni provocati alla pelle da un'eccessiva produzione di radicali liberi (esposizione solare, fumo, inquinamento ambientale, etc.), l'estratto può essere impiegato efficacemente sia nella formulazione di alcuni prodotti cosmetici (anti-aging, lozione dopo sole, depigmentanti etc.) che nella preparazione di "nutracosmeceutici".

Bibliografia

- [1] Maccarone E., Dalla Cina a Bruxelles. *Tec.Agric.*, 4, 1-12, 1997.
- [2] Tsuda T., Watanabe M., Ohshima K., Norinobu S., Choi S., Kawakishi S. and Osawa T., Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O-β-D-glucoside and cyanidin. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2407-2410, 1994.
- [3] van Acker S.A.B.E., Tromp M.N.J.L., Haenen G.R., van der Viigh W.J. and Bast A., Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 214, 755-9, 1995.
- [4] van Acker S.A., van der Berg D.-J., Tromp M.N., Griffioen D.H., van Bennekom W.P., van der Viigh and Bast A., Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad. Biol. Med.*, 20, 331-42, 1996.
- [5] Wang H., Cao G. and Prior R.L., Oxygen radical absorbing capacity of

- anthocyanins. *J. Agr. Food Chem.*,45,304-9, 1997.
- [6] Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic. Res.* 22(4):375-83, 1995.
- [7] Amorini AM, Fazzina G, Lazzarino G, Tavazzi B, Di Pierro D, Santucci R, Sinibaldi F, Galvano F, Galvano G. Activity and mechanism of the antioxidant properties of cyanidin-3-O-beta-glucopyranoside. *Free Radic Res* 35(6):953-66, 2001.
- [8] Bonina F., Lanza M., Montenegro L., Puglisi C., Tomaino A., Trombetta D., Castelli F. and Saija A., Flavonoids as potential protective agents against photooxidative skin damage. *Int. J. Pharm.*, 145, 87-94, 1996.
- [9] Kootstra A., Protection from UV-B induced DNA damage by flavonoids. *Plant Mol. Biol.*, 26, 771-4, 1994.
- [10] Cao G., Sofic E., Prior R.L., Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Rad. Biol. Med.*, 22, 749-60, 1997.
- [11] Castelluccio C., Paganga G., Melikian N., Bolwell G.P., Pridham J., Sampson J. and Rice-Evans C., Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *FEBS Lett.*, 368, 188-92, 1995.
- [12] Bors W., Michel C. and Schickora S., Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials: a pulse radiolysis study. *Free Rad. Biol. Med.*, 19, 45-52-1995.
- [13] Attaway J.A. in : Medical benefits of juice flavonoids - Int. Congress of Fruit Juice - Sao Paulo (Brazil) 207-219; 1991
- [14] Bonina F., Saija A., Tomaino A., Lo Cascio R., Rapisarda P., Dederen J.C., *In vitro* antioxidant activity and *in vivo* photoprotective effect of a red orange extract. *Int. J. Cosm. Sci.*, 20, 331-342, 1998.
- [15] Castelli F., Trombetta D., Tomaino A., Bonina F., Romeo G., Uccella N. and Saija A., Dipalmitoyl-phosphatidyl choline/linoleic acid mixed unilamellar vesicles as model membranes for studies on novel free-radical scavengers. *J. Pharm. Toxic. Met.* 37, 135-141; 1997.
- [16] Russo A., Bonina F., Acquaviva R., Campisi A., Galvano G., Ragusa N., Vanella A. Red Orange extract: effect on DNA cleavage. *J. Food Science*, 2002 (in press).
- [17] Morini F., Busatti F., Bonina F.P., Saija A., Ferro M., Fe⁺⁺-induced lipid peroxidation in human skin-derived cell lines: protection by a red orange extract. *Alternatives to laboratory animals (ATLA)*, 28, 427-433, 2000.

- [18] Yildiz L., Kayaoglu N., Aksoy H., The changes of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in erythrocytes of active and passive smokers. *Clin. Chem.Lab. Med.*, 40(6), 612-615, 2002.
- [19] Cornelli U., Bonina F., Valsasina R., Cornelli M., Attività antiossidante del R.O.C. (Red Orange Complex). *Progress in Nutrition*. 1, 21-27, 2000.
- [20] Cesarone M.R., Belcaro G., Caratelli M., Cornelli U., De Sanctis M.T., Incandela L., Barsotti A., Terranova R., Nicolaides A., A simple test to monitor oxidative stress. *Int.J. Angiol.* ,18, 127-130, 1999.
- [21] West I.C., Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet. Med.* , 17, 171-180, 2000.
- [22] F.P.Bonina, C.Leotta, G.Scalia, C.Puglia, D.Trombetta, G. Tringali, A. M. Roccazzello, P. Rapisarda, A. Saija. Evaluation of oxidative stress in diabetic patients after supplementation with a standardised red orange extract. *Diab.Nutr.Metab.* 2002, 15 [1]: 14-9.
- [23] Brites FD, Evelson PA, Christiansen MG, Nicol MF, Basilico MJ, Wikinski RW, Llesuy SF. Soccer players under regular training show oxidative stress but an improved plasma antioxidant status. *Clin Sci.* 6(4), 381-5, 1999.