

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

TESI DI LAUREA

**Studio *in vitro* sul danno indotto dall'iperglicemia: attività di
acido rosmarinico e luteolina
e implementazione della voce "acido rosmarinico" in Wikipedia**

Relatrice: Chiar.ma Prof.ssa Guglielmina Frolidi

Correlatrice: Dott.ssa Cinzia Ferranti

Correlatrice: Dott.ssa Francine Medjiofack Djeujo

Laureanda: Beatrice Sauro

Matricola: 1128376

ANNO ACCADEMICO 2019 – 2020

Indice

1. INTRODUZIONE	1
ACIDO CAFFEICO	2
1.1. CHIMICA.....	2
1.2. BIOSINTESI.....	3
1.3. DERIVATI	3
1.4. FUNZIONE	4
1.5. FARMACOCINETICA.....	4
1.6. AZIONI BIOLOGICHE	4
ACIDO ROSMARINICO	6
1.7. CHIMICA.....	6
1.8. BIOSINTESI.....	7
1.9. DERIVATI	7
1.10. ASSORBIMENTO, DISTRIBUZIONE e METABOLISMO.....	8
1.11. DISTRIBUZIONE	10
1.11.1. <i>Rosmarinus officinalis</i>	10
1.12. ATTIVITÀ BIOLOGICHE DELL'ACIDO ROSMARINICO	12
1.13. TOSSICITÀ.....	15
ACIDO CLOROGENICO	16
LUTEOLINA	17
1.14. CHIMICA.....	17
1.15. BIOSINTESI.....	18
1.16. DERIVATI	20
1.17. DISTRIBUZIONE	21
1.18. ATTIVITÀ BIOLOGICHE	22
DIABETE	24
1.19. ENZIMA A-GLUCOSIDASI e IPERGLICEMIA	25
1.20. GLICAZIONE e AGES.....	26
1.21. STRESS OSSIDATIVO e DIABETE	28
PROGETTO WIKIPEDIA	29
2. OBIETTIVI SPERIMENTALI	30
3. MATERIALI E METODI	31

3.1. SOSTANZE UTILIZZATE.....	31
3.2. α -GLUCOSIDASI ASSAY	32
3.3. ORAC ASSAY	33
3.4. BSA ASSAY.....	34
3.5. PROGETTO WIKIPEDIA	35
4. ANALISI STATISTICA.....	36
5. RISULTATI	37
5.1. α -GLUCOSIDASI ASSAY	37
5.2. ORAC ASSAY	45
5.3. BSA ASSAY.....	47
5.4. PROGETTO WIKIPEDIA	51
6. DISCUSSIONE	55
7. CONCLUSIONE	59
BIBLIOGRAFIA.....	60
RINGRAZIAMENTI.....	

Abbreviazioni

AAPH	2,2'-azobis (2-metil-propanimidamide) dicloroidrato
PBS _{ORAC}	Tampone fosfato salino per saggio ORAC
PBS _{alfaglu}	Tampone fosfato salino per saggio α -glucosidasi
PBS _{BSA}	Tampone fosfato salino per saggio BSA
DMSO	Dimetilsolfossido
AR	Acido rosmarinico
AC	Acido caffeico
CAPE	Estere feniletilico dell'acido caffeico
ACI	Acido clorogenico
LUT	Luteolina
ACARB	Acarbosio
AUC	<i>Area Under the Curve</i>
AGEs	<i>Advanced Glycation End-products</i> – Prodotti finali di glicazione avanzata
RAGE	<i>Receptor for Advanced Glycation End Products</i> - Recettore per AGEs
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> – Albumina sierica bovina
HAT	<i>Hydrogen Atom Transfer</i>
pNPG	4-nitrofenil- α -D-glucopiranoside
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> – Specie reattive dell'ossigeno
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i> – Specie reattive dell'azoto
TEAC	Equivalente Trolox
Trolox	Acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carbossilico
ACE	<i>Angiotensin-converting enzyme</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
COX	Cicloossigenasi
DM	Diabete Mellito
DM1	Diabete Mellito di tipo 1
DM2	Diabete Mellito di tipo 2
MIC	Concentrazione Minima Inibente
MMP	Metalloproteasi
GSH	Glutazione
iNOS	Ossido nitrico sintasi
SOD	Superossido dismutasi
FAK	<i>Focal Adesion Kinase</i> – Chinasi di adesione focale

1. INTRODUZIONE

I composti studiati nella presente tesi sono stati l'acido rosmarinico, la luteolina, l'acido caffeico e l'acido clorogenico.

Fanno tutti parte della famiglia dei composti polifenolici e, in particolare, l'acido rosmarinico e l'acido clorogenico sono molecole correlate alla struttura chimica dell'acido caffeico.

Dalla struttura delle molecole si nota come essi contengano l'unità strutturale dell'acido 3,4-diidrossicinnamico (comunemente detto acido caffeico) (Figura 1).

L'acido clorogenico è l'acido 3-caffeilchinico, cioè l'estere tra acido caffeico e l'acido chinico.

L'acido rosmarinico invece è l'estere tra l'acido caffeico e il gruppo alcolico in posizione α dell'acido 3,4-diidrossifenillattico.

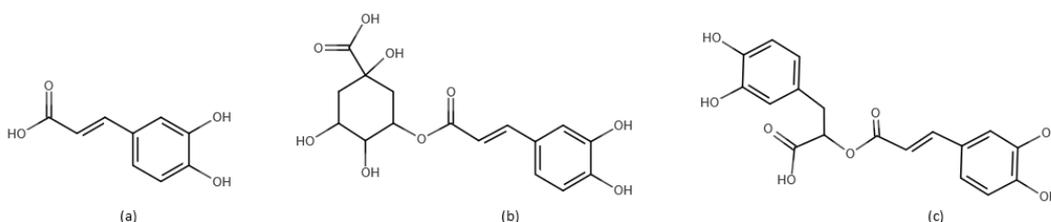


Figura 1: Strutture chimiche di (a) acido caffeico, (b) acido clorogenico, (c) acido rosmarinico.

La luteolina è anch'essa un composto polifenolico, ma appartiene al gruppo dei flavonoidi, ampiamente diffusi in varie piante edibili e in piante di impiego nella medicina tradizionale per il trattamento di moltissime patologie (López-lázaro, 2009).

I flavonoidi si suddividono in numerose classi da un punto di vista chimico, tra queste ritroviamo flavoni, flavononi, antocianidine, flavonoli, isoflavoni, e catechine. La luteolina è il 3,4,5,7-tetraidrossi flavone (Figura 2).

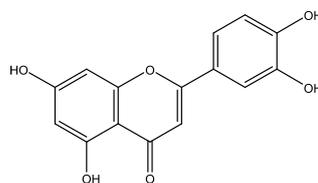


Figura 2: Struttura chimica della luteolina (Imran et al., 2019).

La luteolina condivide le attività biologiche caratteristiche della classe dei polifenoli come l'attività antiossidante, dovuta primariamente alla sua capacità di neutralizzare le specie reattive dell'ossigeno (Zheng & Wang, 2001).

Numerosi studi suggeriscono il contributo dei polifenoli nella prevenzione delle patologie cardiovascolari, così come anche nella prevenzione delle malattie neurodegenerative e del diabete mellito. Al contrario, i dati sono insufficienti per quanto concerne la loro utilità nella prevenzione dei tumori, in quanto le dosi valutate negli

studi *in vitro*, sono considerate elevate in confronto alla quantità assunta con la dieta (Scalbert et al., 2005).

Interessante è sottolineare che sia l'acido caffeico, l'acido clorogenico, l'acido rosmarinico e la luteolina sono stati identificati nel *Rosmarinus officinalis* L. (Farkhondeh et al., 2019).

L'obiettivo di questa tesi è stata la determinazione delle attività antiossidante, ipoglicemizzante e antiglicativa di questi composti, al fine di valutarne l'utilità nel contrastare il danno indotto dall'iperglicemia e in un'ottica di prevenzione o anche trattamento del diabete, patologia che conta circa 422 milioni di persone affette in tutto il mondo e 1.6 milioni di morti ogni anno, difatti il diabete mellito (DM) è considerato la settima causa di morte nel mondo (dati WHO).

Acido caffeico

L'acido caffeico (nome IUPAC: acido (*E*)-3-(3,4-diidrossifenil) prop-2-enoico) (PubChem) è un acido polifenolico, con struttura catecolica, appartenente alla classe degli acidi idrossicinnamici (Khan et al., 2016).

L'acido caffeico, ma più in generale gli acidi idrossicinnamici, sono ubiquitari nel regno delle piante e sono molto abbondanti nel tè, caffè, vino rosso, olive, frutta, carote, propoli e anche nel grano, quindi è quasi sempre presente nella dieta (Monteiro Espíndola et al., 2019; Razzaghi-Asl et al., 2013). Infatti, l'acido caffeico costituisce il 75-100% del contenuto di acidi idrocinnamici presenti nella maggior parte dei frutti (X. Cao et al., 2019). L'acido caffeico è stato isolato in diverse piante, quali *Ilex paraguariensis* (15 mg/100 g), *Melissa officinalis* (39.3 mg/100 g), *Baccharis genistelloides* (8 mg/100 g) e *Achyrocline satureioides* (4 mg/100 g) (Khan et al., 2016).

1.1. Chimica

Da un punto di vista chimico i composti fenolici si suddividono in due classi: gli acidi benzoici, che presentano sette atomi di carbonio, e gli acidi cinnamici, che invece presentano nove atomi di carbonio. Questi composti naturali generalmente si presentano come acidi idrossibenzoici e acidi idrossicinnamici, come l'acido caffeico, i cui gruppi ossidrilici sono in posizione 3 e 4. Più nel dettaglio, l'acido caffeico ha una struttura fenilpropanoide con un anello aromatico 3,4-diidrossilato unito a un acido carbossilico mediante un legame trans-etilenico (Monteiro Espíndola et al., 2019).

1.2. Biosintesi

La biosintesi dell'acido caffeico avviene tramite la via endogena dello shikimato (Figura 3). Questo subisce tre reazioni enzimatiche: primariamente ha luogo una fosforilazione grazie all'enzima shikimato-chinasi, in seguito una molecola di fosfoenolpiruvato è coniugata grazie alla 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSP) sintasi. Per ultimo, la corismato sintetasi porta alla formazione dell'acido corismico, che diventa substrato dell'enzima corismato mutasi ed è trasformato in acido prephenico. Da questo prodotto si passa alla formazione della L-fenilalanina in presenza di piridossal fosfato e di NAD⁺, come coenzimi nel processo di deaminazione. La deaminazione della L-fenilalanina, da parte della fenilalanina ammoniacalasi, forma l'acido cinnamico. Questo è quindi convertito in acido p-cumarico dalla cinnamato-4-idrossilasi e infine in acido caffeico grazie alla 4-cumarato 3-idrossilasi (Monteiro Espíndola et al., 2019).

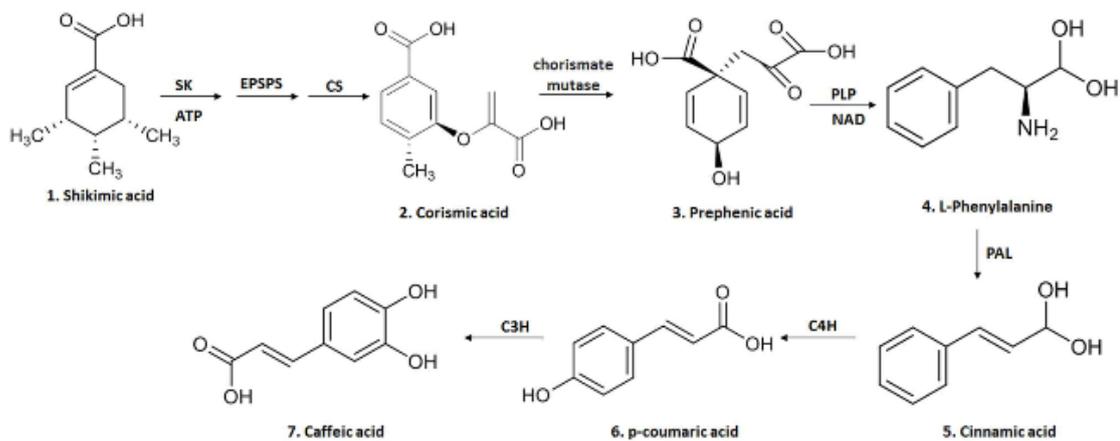


Figura 3: Biosintesi dell'acido caffeico (Monteiro Espíndola et al., 2019)

1.3. Derivati

L'acido caffeico si può trovare in forma di monomero ma anche esterificato con acidi organici, zuccheri, ammidi e glicosidi, oppure in forma di complessi come dimero, trimero o legato a delle proteine strutturali di membrana (Monteiro Espíndola et al., 2019).

I derivati dell'acido caffeico (Figura 4) contano pertanto moltissime molecole, soprattutto prodotti esterificati, tra questi: acido clorogenico, che deriva dall'esterificazione dell'acido caffeico con l'acido chinico (Razzaghi-Asl et al., 2013), e il composto CAPE, cioè l'estere feniletilico. Si ricordano anche le forme metilate quali l'acido ferulico, l'ottil caffeato e l'acido cicorico (Khan et al., 2016).

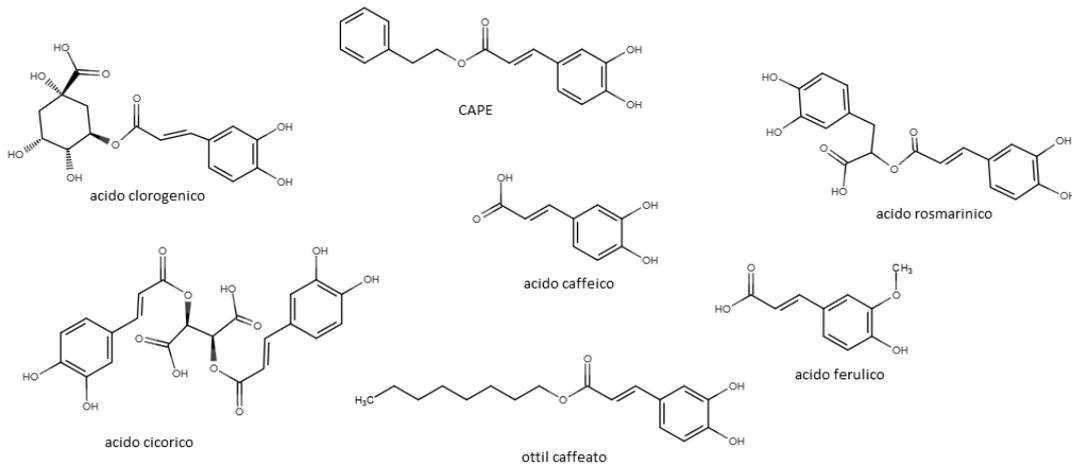


Figura 4: Derivati dell'acido caffeico.

1.4. Funzione

L'acido caffeico, soprattutto la forma legata a proteine o zuccheri, ha una funzione strutturale nella membrana cellulare delle cellule vegetali.

Come molti metaboliti secondari svolge anche un ruolo di protezione dagli attacchi esterni di predatori e infezioni, infatti presenta un'azione inibitoria sulla crescita di funghi e batteri. Inoltre, stimola la protezione delle cellule vegetali dalle radiazioni UV-B (Monteiro Espíndola et al., 2019).

1.5. Farmacocinetica

Da un punto di vista farmacocinetico, per quanto l'acido caffeico rappresenti il 75-100% del contenuto totale di acidi idrossicinnamici nei frutti, per lo più si trova in forma esterificata, pertanto l'assorbimento risulta difficile fintantoché non incontra la flora batterica intestinale che, grazie alle esterasi, permette la sua idrolisi rilasciando l'acido caffeico. Successivamente l'assorbimento attraverso le cellule intestinali avviene per trasporto attivo (mediante il *carrier* per gli acidi monocarbossilici). La concentrazione plasmatica massima è raggiunta dopo circa un'ora dall'ingestione ma diminuisce rapidamente dal momento che l'acido caffeico subisce tre principali tipi di reazioni metaboliche: metilazione, glucuronidazione e solfatazione, che portano alla sua eliminazione attraverso l'urina (Monteiro Espíndola et al., 2019).

1.6. Azioni biologiche

Per quanto riguarda gli effetti biologici dell'acido caffeico sicuramente deve essere citata l'azione antiossidante a cui sono collegate diverse azioni benefiche per la salute. L'acido caffeico e i suoi derivati sono in grado di aumentare la resistenza delle LDL (lipoproteine a bassa densità) nei confronti della perossidazione lipidica (Nardini et al., 1995) e, allo stesso modo, di evitare l'ossidazione delle proteine (H. Zhu et al., 2006). L'acido caffeico inoltre è in grado di chelare i metalli, noti catalizzatori di reazioni ossidative (H. Zhu et al., 2006), e di inibire alcuni enzimi che sono implicati nello stress ossidativo (Razzaghi-

Asl et al., 2013). In generale, l'acido caffeico è considerato uno scavenger dei ROS (*Reactive Oxygen Species*). Questa attività è stata dimostrata con vari test, come il DPPH assay. L'acido caffeico (e il suo derivato CAPE) inibisce l'emolisi ossidativa degli eritrociti, la perossidazione lipidica dei microsomi epatici del ratto e gli effetti dell'autossidazione del pirogallolo (W. M. Wu et al., 2007).

La sua azione antiossidante è dovuta principalmente a due caratteristiche strutturali: 1) la presenza dei gruppi ossidrilici sull'anello benzenico che permette, con un meccanismo HAT (*Hydrogen Atom Transfer* - trasferimento di atomi di idrogeno), la formazione di radicali fenossidi stabili per delocalizzazione elettronica ponendo fine alla reazione a catena radicalica; e 2) la presenza della catena laterale etilenica che, avendo il legame insaturo, è in grado non solo di stabilizzare il radicale fenossido ma anche di fungere da sito di attacco di un altro radicale. Questo meccanismo d'azione è valido per l'acido caffeico ma la maggiore attività antiossidante degli esteri con le ammidi è spiegata dalla presenza di gruppi -NH (o anche -SH) che possono donare atomi di idrogeno (Razzaghi-Asl et al., 2013).

Questa capacità antiossidante spiega molte azioni benefiche a livello dell'organismo umano; in particolare, si è notato che trattando i linfociti con l'acido caffeico questi risultano protetti dal danno del DNA, e quindi dall'apoptosi, dovuto all'ossidazione causata dalle radiazioni UV-B, difatti l'acido caffeico ha dimostrato un'azione fotoprotettiva. Oltre questo, esso gioca un ruolo fondamentale nell'evitare la diminuzione delle scorte di vitamina C ed E, importanti fattori per la protezione dallo stress ossidativo (Khan et al., 2016).

Da uno studio *in vivo* invece si evince un'azione positiva nei confronti dell'ipertensione: infatti, l'acido caffeico, ma ancor di più l'acido clorogenico (per via dell'esterificazione con l'acido chinico), ha la capacità di diminuire la pressione sanguigna inibendo l'enzima ACE, la colinesterasi e l'arginasi, tutti enzimi coinvolti nella patogenesi dell'ipertensione. Oltretutto l'azione è ancora più marcata vista la loro protezione sullo stress ossidativo (Agunloye et al., 2019).

Bisogna però sottolineare come l'acido caffeico *in vitro*, fino a una concentrazione di 5 mM, svolga un'azione antiossidante ma, superata questa soglia, espliciti piuttosto un'azione pro-ossidante (Khan et al., 2016). Tuttavia alcuni autori hanno ipotizzato che sia l'azione antiossidante che quella pro-ossidante possano essere utili conferendo all'acido caffeico proprietà anti-carcinogenica. In particolare si può assumere che la sua azione antiossidante porti alla diminuzione della presenza di ROS, quindi a una protezione dallo stress ossidativo, fondamentale in questa condizione patologica. L'azione pro-ossidante invece, per quanto possa avere un'accezione di solito negativa, in questo caso si dimostrerebbe utile, in quanto, tramite il legame con lo ione Cu^{2+} e la conseguente formazione dell'anione orto-semichinone, porterebbe ad un aumento della perossidazione lipidica e del danno al DNA delle cellule tumorali (Monteiro Espíndola et al., 2019).

Un altro meccanismo dell'acido caffeico, nella prevenzione all'epatocarcinoma, riguarda l'inibizione della produzione del fattore VEGF (*Vascular-Endothelial Growth Factor*),

fattore che favorisce la crescita di vasi all'interno della massa tumorale promuovendo il sostegno metabolico.

Sempre nei confronti dell'azione anti-carcinogenica dell'acido caffeico, esso è in grado di legarsi a dei fattori di trascrizione, inibendoli, in modo da sopprimere l'espressione di MMP-2 e MMP-9, metallo proteasi espresse dalle cellule tumorali che degradano la matrice cellulare e permettono l'invasione e la metastasi del tumore (Monteiro Espíndola et al., 2019).

Inoltre l'acido caffeico e i suoi analoghi sono in grado di diminuire il livello di infiammazione inibendo degli enzimi chiave, tra cui la COX-2 (H. G. Choi et al., 2018).

Autori hanno anche riportato che l'acido caffeico può inibire alcuni enzimi chiave nel regolare i livelli ematici di glucosio quali l' α -amilasi e l' α -glucosidasi (Oboh et al., 2015). Alcuni studi hanno inoltre suggerito che l'acido caffeico è in grado di inibire la formazione di AGEs, noti prodotti di glicazione avanzata che si formano per eccesso di zuccheri nel sangue che reagiscono con proteine, lipidi e acidi nucleici. In uno studio del 2015 l'acido caffeico ha evidenziato di inibire la formazione degli AGEs e di mitigare lo stress ossidativo e i processi infiammatori derivanti (X. Cao et al., 2019).

Acido rosmarinico

Tra le altre molecole polifenoliche studiate c'è l'acido rosmarinico o rosmarinato: questo composto fu scoperto per la prima volta da Scarpati e Oriente nel 1958, che hanno isolato questa sostanza dal *Rosmarinus officinalis L.* ideando il nome di questo polifenolo (Petersen, 2013).

1.7. Chimica

Il nome IUPAC dell'acido rosmarinico è acido (R)- α -[[3-(3,4-diidrossifenil)-1-osso-2 E-propenil]ossi]-3,4-diidrossi-enzenepropanoico. Questo composto è l'estere tra l'acido caffeico e l'acido 3,4-diidrossifenil lattico, il quale si lega mediante il gruppo alcolico in posizione α (Nadeem et al., 2019).

Appartiene alla classe degli acidi cumarici, composti aromatici contenenti una frazione di acido cinnamico, idrossilata in posizione para, orto o meta dell'anello benzenico.

L'acido rosmarinico è altamente lipofilo, scarsamente solubile in acqua ma solubile nei solventi organici, come metanolo, DMSO e dimetilformamide, fino ad approssimativamente 25 mg/ml (Alagawany et al., 2017; PUBCHEM).

1.8. Biosintesi

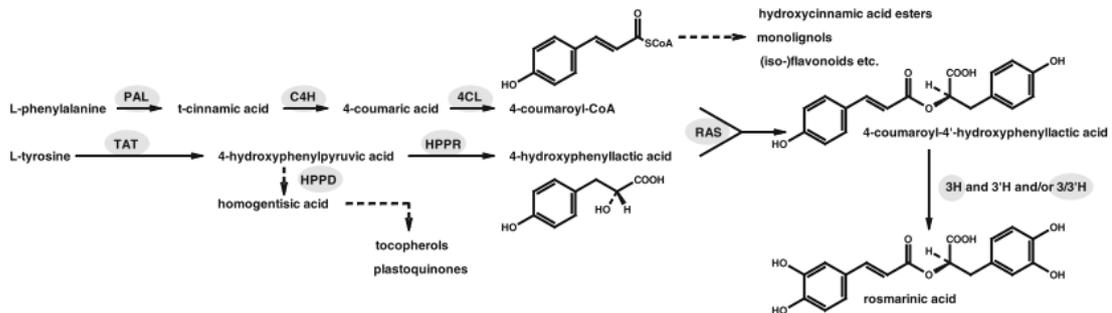


Figura 5: Biosintesi dell'acido rosmarinico (Petersen, 2013).

La molecola di acido rosmarinico, diversamente da quanto riportato spesso in letteratura, non è l'unione di due molecole di acido caffeico ma deriva da due amminoacidi aromatici: L-tirosina e L-fenilalanina. Quest'ultima incorpora la frazione di acido caffeico della molecola dell'acido rosmarinico seguendo la via dei fenilpropanoidi: la fenilalanina diventa substrato degli enzimi fenilalanina ammoniacali (PAL), acido cinnamico 4-idrossilasi (C4H) e acido 4-cumarico CoA-ligasi (4CL) che trasformano l'amminoacido in 4-cumaroyl-CoA.

La L-tirosina invece viene trasformata in 4-idrossifenilpiruvato (pHPP) dalla tirosina ammino-transferasi (TAT) dipendente dal piridossalfosfato. Il pHPP viene ridotto dalla 4-idrossifenilpiruvato reduttasi (HPPR) a D-4-idrossifenilattato (pHPL) utilizzando NADH. A questo punto interviene l'acido rosmarinico sintasi (RAS), cioè una idrossicinnamoyl transferasi, che si occupa di trasferire la frazione 4-cumaroyl dal 4-cumaroyl-CoA al gruppo OH alifatico di pHPL, unendo quindi i due derivati degli amminoacidi e rilasciando CoA, e ottenendo 4-cumaroyl-4'-idrossifenilattato (pC-pHPL). Le ultime fasi biosintetiche prevedono l'introduzione di due gruppi OH nelle posizioni 3 e 3' della molecola, arrivando quindi al prodotto finale che è l'acido rosmarinico (Figura 5) (Petersen, 2013).

1.9. Derivati

L'acido rosmarinico è stato identificato in diverse forme come composto coniugato, metilato e in forma di dimeri. Da *Helicteres isora* si è isolato l'acido isorinico (caffeoil-4'-idrossifenilattato), così come i derivati 4-O-glucosilati e 4/4'-O-diglucosilati. L'isomero cis dell'acido rosmarinico è stato isolato dalla *Salvia nemorosa*. Tra i derivati ci sono tantissimi composti che contengono una o più molecole di acido rosmarinico e altre frazioni aromatiche: l'acido litospermico, dato dall'unione di acido rosmarinico e acido caffeico, identificato nella specie *Lycopus europaeus* e *Lithospermum ruderales*, e l'acido litospermico B, chiamato anche acido salvianolico B, un dimero dell'acido rosmarinico, e diversi altri acidi salvianolici presenti nella *Salvia miltiorrhiza*. La *Salvia officinalis*, oltre ad avere un buon contenuto di acido rosmarinico, presenta anche suoi derivati quali l'acido melitrico, l'acido sagerinico e la salvia-cumarina.

Nelle diverse piante ci sono anche gli esteri metilici dell'acido rosmarinico quali l'acido metilmelitrico e l'acido clerodendranoico (Petersen, 2013).

L'acido rosmarinico, dopo la sua sintesi, viene immagazzinato nei vacuoli delle cellule delle piante, come dimostrano gli studi sull'isolamento di protoplasmi e vacuoli delle sospensioni di cellule di *Coleus blumei* (Petersen, 2013).

1.10. Assorbimento, distribuzione e metabolismo

In uno studio clinico randomizzato, in aperto, con somministrazione di una singola dose (250 ml) intravenosa di estratto dissolto in una soluzione di glucosio 5% si è osservato che non c'è una sostanziale differenza tra il genere maschile e quello femminile nella farmacocinetica dell'acido rosmarinico. Una dose di 100 mg di un estratto di *S. miltiorrhiza* determina per l'acido rosmarinico una C_{max} plasmatica di 174 ng/ml, una T_{max} di 0.47 h e una $t_{1/2}$ di 0.23 h mentre l'escrezione urinaria è del 20-25% (Jia et al., 2010).

Uno studio cross-over sui ratti ha confermato che il raggiungimento della concentrazione massima plasmatica dell'acido rosmarinico avviene dopo 0.5 h, con un aumento contemporaneo del metabolita metilato, che raggiunge il picco dopo 2 ore. Si è anche osservato che il 75% dei metaboliti vengono escreti con le urine in circa 6 h. L'insieme dei dati disponibili indicano che l'acido rosmarinico è rapidamente assorbito, distribuito in forma coniugata e metilato e successivamente eliminato con escrezione urinaria (Nakazawa & Ohsawa, 1998).

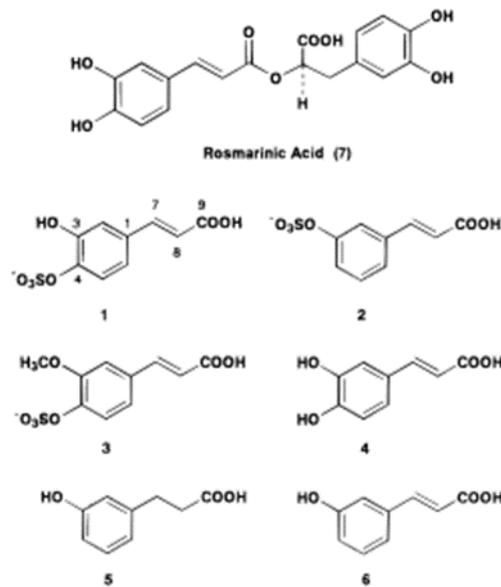


Figura 6: Metaboliti dell'acido rosmarinico (7): acido trans-caffeoico 4-O-solfato (1); acido trans-m-cumarico 3-O-solfato (2); acido trans-ferulico 4-O-solfato (3); acido trans-caffeoico (4); m-acido idrossifenilpropionico (5); acido trans-m-cum cumarico (6), (Nakazawa & Ohsawa, 1998).

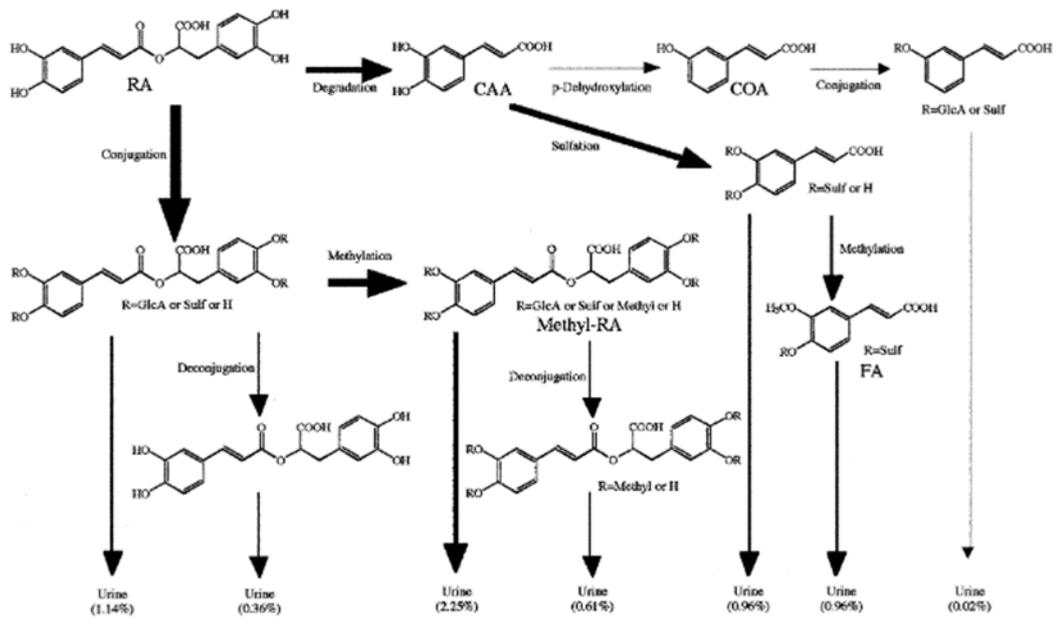


Figura 7: Schema dei processi metabolici dell'acido rosmarinico nella specie umana. CAA: acido caffeico; COA: acido cumarinico; FA: acido ferulico; metil-RA: acido rosmarinico metilato; GlcA: porzione glucuronide; Sulf: porzione solfato (Baba et al., 2005).

I metaboliti ritrovati nelle urine del ratto sono, principalmente acido m-idrossifenilpropionico, acido caffeico, acido ferulico, acido cumarinico e i solfati di acido caffeico, acido ferulico e acido cumarinico e acido rosmarinico non modificato, Figura 6 (Nakazawa & Ohsawa, 1998).

Gli enzimi che catalizzano la trasformazione dell'acido rosmarinico sono stati evidenziati sia nei tessuti umani che in quelli di ratto; tuttavia i risultati di vari studi di farmacocinetica sull'uomo e sui ratti suggeriscono che il metabolismo delle sostanze polifenoliche, tra le quali ricordiamo epicatechina, quercetina e acido rosmarinico, varia tra le specie, a causa delle differenze nell'espressione degli enzimi, nell'affinità e nelle caratteristiche delle reazioni enzimatiche (Baba et al., 2005). I processi enzimatici che portano all'eliminazione di acido rosmarinico nella specie umana sono descritti in Figura 7. I principali metaboliti identificati nelle urine dopo l'assunzione di estratti di *Perilla frutescens* erano coniugati sulfoglucuronidi di acido rosmarinico e acido metil-rosmarinico, prodotti tramite reazioni di fase II nell'intestino e nel fegato (Baba et al., 2005).

1.11. Distribuzione

Un modo indiretto per osservare la distribuzione dell'acido rosmarinico nei tessuti vegetali è dato dalla determinazione dell'espressione degli enzimi utili alla sua sintesi. L'enzima PAL, comunque necessario anche per altre vie metaboliche, si trova nella famiglia delle Lamiaceae, in particolare nella *Salvia miltiorrhiza*, *Perilla frutescens*, *Melissa officinalis*, *Agastache rugosa*, e nella famiglia delle Boraginaceae, ad esempio in *Arnebia euchroma* e *Lithospermum erythrorhizon* (Petersen, 2013). L'enzima C4H è abbondante nelle Lamiaceae e lo si ritrova, come l'enzima PAL, nella *Agastache rugosa* e *Salvia miltiorrhiza*. Così come anche nella *Arnebia euchroma* e *Lithospermum erythrorhizon* (entrambe della famiglia delle Boraginaceae) (Petersen, 2013). Il gene dell'acido 4-cumarico CoA-ligasi viene espresso nella *Salvia miltiorrhiza*, *Melissa officinalis*, *Agastache rugosa* (famiglia delle Lamiaceae), nella *Arnebia euchroma* e *Lithospermum erythrorhizon* (appartenenti alla famiglia delle Boraginaceae). Gli enzimi TAT e HPPR vengono espressi anche in altre due piante della famiglia delle Lamiaceae: la *Perilla frutescens* e *Coleus blumei*, ma è presente anche, così come tutti gli altri enzimi della via, nella *Salvia miltiorrhiza*. L'enzima RAS è presente in *Coleus blumei*, *Melissa officinalis*, anche nella *Lavandula angustifolia* e *Salvia miltiorrhiza*. Infine i citocromi che si occupano dell'idrossilazione finale vengono espressi nel *Coleus blumei*, *Salvia miltiorrhiza*, *Ocimum basilicum* e *Lithospermum erythrorhizon* (Boraginaceae) (Petersen, 2013).

1.11.1. Rosmarinus officinalis

L'acido rosmarinico fu isolato per la prima volta dal *Rosmarinus officinalis*, (Petersen, 2013) arbusto della famiglia delle Lamiaceae, comunemente chiamato rosmarino. Il rosmarino è utilizzato come pianta ornamentale e anche come erba aromatica culinaria, mentre il suo estratto è impiegato per preservare i cibi dall'ossidazione (Andrade et al., 2018).

La pianta si presenta come un cespuglio sempreverde fitto, ramificato, con fiore di colore bianco-azzurro, che raggiunge un'altezza di circa un metro (Ai-Sereiti' et al., 1999). È caratterizzato da foglie lunghe 1 - 4 cm e larghe 2 - 4 mm, sessili, coriacee, da lineari a lineari-lanceolate, con bordi ricurvi, il lato superiore è verde scuro e granuloso, mentre il fondo della pagina risulta tomentoso, con una nervatura centrale prominente (Andrade et al., 2018).

È originario e cresce nei climi temperati delle coste nord e sud del Mar Mediterraneo, in Portogallo e nelle zone sub-himalayane. Fin da tempi antichi è coltivato anche in Inghilterra, Germania, Francia, Danimarca e altri paesi scandinavi, America Centrale, Venezuela e Filippine (Ai-Sereiti' et al., 1999).

La pianta emana un odore caratteristico tipico delle sostanze che compongono l'olio essenziale. L'olio essenziale è ottenuto tramite la distillazione in corrente di vapore e risulta un liquido, insolubile in acqua, incolore o giallo chiaro. Esso contiene centinaia di composti volatili: monoterpeni, sesquiterpeni, composti aromatici e altri derivati, in particolare i suoi principali costituenti sono canfora (5 - 21%), 1,8-cineolo (15 - 55%), α -pinene (9 - 26%), borneolo (1.5 - 5%), canfene (2.5 - 12%), β -pinene (2 - 9%) e limonene (1.5 - 5%), che variano in quantità in base alle condizioni di crescita geografiche e climatiche (Andrade et al., 2018). L'estratto di *R. officinalis* L. consiste in diversi tipi di polifenoli inclusi flavonoidi, acidi fenolici e terpeni fenolici come diterpeni e triterpeni. Il contenuto di flavonoidi comprende luteolina, apigenina e apigenina-7-O-rutinoside, ispidulina, genkwanina, kaempferolo e il kaempferolo-3-O-rutinoside, rutina, esperetina, quercetina e diversi altri metaboliti. Per quanto riguarda gli acidi fenolici, ritroviamo gli acidi idrossicinnamici, di cui è importante nominare l'acido rosmarinico, acido clorogenico, acido cumarinico e p-cumarinico, acido m-idrossibenzoico e acido ferulico, gli acidi idrossibenzoici come l'acido caffeico, acido vanillico e acido dicaffeoilchinico, infine gli acidi idrossifenilacetici di cui citiamo l'acido omonvanillico. I terpeni fenolici invece sono i diterpeni (acido carnosico, carnosolo, rosmanolo) e i triterpeni (acido ursolico e oleanoico) (Farkhondeh et al., 2019).

Tra gli usi tradizionali e antichi si ricorda l'impiego come antispastico nelle coliche renali, dismenorrea e in lievi disordini respiratori. È stato usato nel tempo come analgesico, antireumatico ma soprattutto come carminativo. Aveva usi anche come diuretico, espettorante e per aumentare la fertilità. Per lo più veniva usato come tonico per forti stress fisici o intellettuali e anche come insetticida. Certamente le sue molteplici azioni sono state descritte nel tempo ma principalmente è noto come antiossidante e anti-lipoperossidante, proprietà ascrivibili ad acido rosmarinico, acido clorogenico, acido caffeico, luteolina, carnosolo, acido ursolico e a differenti diterpeni (Ai-Sereiti' et al., 1999). Autori hanno anche suggerito attività sul sistema nervoso, come antidepressivo e favorente la memoria. Si riporta un'azione benefica sulla circolazione ematica, migliorando il flusso nelle arterie occluse. Inoltre si è osservato che *in vitro* inibisce la contrazione del muscolo liscio della trachea indotta da acetilcolina, istamina e soluzioni contenenti Ca^{2+} e K^+ . In medicina tradizionale si impiegava come coleretico ed epatoprotettivo; infatti, è stato osservato che aumenta il flusso della bile e diminuisce il rilascio di enzimi epatici nel plasma. Tra le azioni farmacologiche viene incluso anche un

potenziale effetto antitumorale, difatti riduce la formazione di addotti del DNA. Vanta anche un'azione antimicotica, infatti *in vitro* inibisce la crescita della *Candida albicans* (Ai-Sereiti' et al., 1999).

Tantissimi sono gli effetti farmacologici descritti per il rosmarino, principalmente attribuibili all'acido carnosico, all'acido rosmarinico, ai componenti dell'olio essenziale, al carnosolo e all'acido ursolico (Andrade et al., 2018).

1.12. Attività biologiche dell'acido rosmarinico

Nonostante siano state suggerite numerose attività per l'acido rosmarinico queste sono scarsamente supportate da studi clinici, per cui ha ancora limitati utilizzi farmacologici. Essendo un polifenolo è considerato un antiossidante. Si è inoltre evidenziato un possibile uso come antimicrobico, antielmintico, coccidiostatico, dimostrando anche proprietà antiinfiammatorie. Viene considerato un possibile stimolante del sistema endocrino e immunitario. Inoltre, promuove la secrezione degli enzimi digestivi e aumenta la motilità intestinale. Per quanto riguarda l'attività spermatica potrebbe aumentare la crescita e la produzione degli spermatozoi. È considerato anche un potenziale antiallergico e antidiabetico. Sono state anche suggerite l'attività antiangiogenica, antitumorale e neuroprotettiva (Alagawany et al., 2017).

Come polifenolo la sua prima caratteristica è quella **antiossidante**. In diversi studi è stato sottolineato come l'acido rosmarinico abbia un'azione di scavenging dei ROS, in quanto in grado di eliminare il radicale DPPH mediante la donazione di elettroni: azione simile a quella dell'acido caffeico e della quercetina (Adomako-Bonsu et al., 2017). Uno studio *in vitro*, effettuato nel 2015, dimostra l'attività antiossidante con due test, il DPPH assay e il test dell'ossidazione di liposomi di fosfatidilcolina di soia, evidenziando anche un effetto sinergico con l' α -tocoferolo (Ayasinghe et al., 2003).

È stato anche descritto come l'acido rosmarinico aumenti la sintesi di glutatione (GSH) e, partecipando all'inibizione dell'attività di MMP-2 dipendente da NF- κ B, aumenti anche l'espressione della glutammato cisteina ligasi. La somministrazione contemporanea di licopene e acido rosmarinico, in maschi adulti di ratti albini, ha ridotto l'azoto ureico nel sangue, la malondialdeide renale (MDA), l'espressione della proteina proapoptotica (Bax), i livelli inducibili di ossido nitrico sintasi (iNOS) e la proteina marcatore autofagico (LC3/B) indotti dalla gentamicina. L'associazione di licopene e acido rosmarinico ha anche aumentato la SOD ridotta, l'espressione della proteina antiapoptotica (Bcl2) e i livelli di GPx e GSH, oltretutto ha migliorato le modifiche istopatologiche indotte dalla gentamicina (Bayomy et al., 2017; Nadeem et al., 2019).

L'acido rosmarinico ha prevenuto lo stress ossidativo nelle cellule gliali C6, aumentandone la vitalità cellulare e inibendo la perossidazione lipidica, ha ridotto l'espressione di COX-2 e iNOS indotta da H₂O₂. Inoltre ha aumentato l'espressione e l'attività di CAT, SOD, eme ossigenasi-1 (HO-1) e del fattore di trascrizione Nrf2 (Nadeem et al., 2019), tutti fattori fondamentali nella protezione dallo stress ossidativo.

In generale si può affermare che l'acido rosmarinico è noto per avere una forte capacità antiossidante, soprattutto nell'azione di scavenging dei radicali, con un meccanismo di HAT (*Hydrogen Atom Transfer*) (J. H. Chen & Ho, 1997).

L'acido rosmarinico, per via della sua azione antiossidante e antiinfiammatoria, è anche usato nella prevenzione e nel trattamento di numerose malattie ed è anche proposto come **inibitore dello sviluppo tumorale** in molti organi come il colon, il fegato, lo stomaco e la mammella, nonché leucemia e melanoma (Alagawany et al., 2017). In particolare, l'acido rosmarinico è suggerito nel trattamento del cancro al retto e al colon, in quanto inibisce AP-1, proteina responsabile dell'attivazione di COX-2 (Rahman et al., 2014). Inoltre ridurrebbe i livelli di espressione della proteina p65 e la proliferazione mediata da NF-κB non solo nel cancro al colon ma anche nel melanoma, nel cancro al polmone, pancreas e seno (Karthikkumar et al., 2015; Alagawany et al., 2017).

Alla sua azione antiossidante è legato anche l'**effetto neuroprotettivo**. Ci sono vari studi che hanno evidenziato come l'acido rosmarinico inibisca l'apoptosi indotta dallo stress ossidativo dato dal perossido di idrogeno nella linea cellulare dopaminergica umana (SH-SY5Y) e stimola l'azione dell'emeossigenasi 1, enzima antiossidante (Lee et al., 2008).

Un altro studio ha indagato l'effetto della somministrazione in ratti di acido rosmarinico (1, 2, 4 o 8 mg/kg) sulle alterazioni comportamentali e il suo impatto genotossico sul tessuto cerebrale. Gli autori hanno notato che alla dose di 8 mg/kg l'acido rosmarinico aumenta la motivazione e la locomozione dei ratti, mentre dosi minori hanno prodotto un'azione ansiolitica senza alcuna alterazione del movimento o danni al DNA del tessuto cerebrale (Tysca et al., 2005). Per quanto riguarda la **malattia di Alzheimer** è stato osservato che l'acido rosmarinico riduce la produzione di nitriti indotta da β-amiloide e malondialdeide, suggerendo un effetto protettivo in questa patologia (Baluchnejadmojarad et al., 2013).

Nel corso degli anni è stato valutato anche l'effetto **antimicrobico** dell'acido rosmarinico e degli estratti vegetali in cui esso è presente. In particolare, uno studio riporta la valutazione della zona di inibizione e della MIC (Concentrazione Minima Inibente) dell'acido rosmarinico che risulta di 0,8 mg/ml contro *S. aureus* e di 10 mg/ml contro *S. aureus meticillino-resistente* (MRSA). Inoltre l'acido rosmarinico diminuisce la MIC di vancomicina, amoxicillina e ofloxacina contro *S. aureus* (Ekambaram et al., 2016).

Nello stesso studio sono stati valutati anche gli **effetti sinergici con gli antibiotici** amoxicillina, ofloxacina e vancomicina rivelatisi positivi contro *S. aureus*. L'analisi del *time-kill* ha mostrato che l'uso di una combinazione di acido rosmarinico con antibiotici è più efficace rispetto all'uso di singoli antibiotici. Gli effetti antibatterici di tutte le combinazioni sinergiche erano molto potenti in fase logaritmica, a volte presenti in fase stazionaria, rispetto agli effetti dei singoli trattamenti (Ekambaram et al., 2016).

In diversi studi sono stati valutati gli effetti di estratti vegetali caratterizzati dalla presenza di acido rosmarinico; ad esempio si è osservato che un estratto etanolic (al 5% di acido rosmarinico) era attivo contro i Gram positivi e negativi, mentre l'estratto acquoso (al 15% di acido rosmarinico) presentava solo lieve attività (Alagawany et al., 2017).

Per quanto riguarda l'azione antivirale è stato effettuato uno studio *in vivo* su ratti infettati dal virus dell'encefalite giapponese (famiglia *Flaviviridae*) nei quali il trattamento con acido rosmarinico ridusse il tasso di mortalità al 20% (12 su 15 animali sopravvissero dopo trattamento). Inoltre, l'immunoistochimica ha rivelato differenze sia qualitative che quantitative nell'attivazione della microglia negli animali infetti trattati con acido rosmarinico rispetto agli animali infetti non trattati. Si evidenziò inoltre una diminuzione significativa dell'mRNA virale trascritto negli animali trattati. (Swarup et al., 2007).

Uno studio sperimentale ha evidenziato che la reazione tra acido rosmarinico e ioni nitrito produce acidi 6,6-nitro e 6-dinitrorosmarinici. Questi composti sono inibitori dell'integrasi dell'HIV-1, attivi a livello sub-molecolare e inibitori della replicazione virale nelle cellule MT-4 (Dubois et al., 2008).

Un altro studio suggerisce l'utilizzo dell'acido rosmarinico per controllare la formazione di biofilm mediata dal quorum sensing e la produzione di fattore di virulenza in *A. hydrophila* (Alagawany et al., 2017).

Si è osservato che l'acido rosmarinico è in grado di **modulare il sistema immunitario**, tanto che alcuni studi stanno cercando di dimostrare la sua utilità nel trattamento di alcune patologie autoimmuni (Alagawany et al., 2017). In particolare si è visto come possa aumentare gli indici immunitari, ad esempio l'attività fagocitica e alcuni parametri biochimici nel sangue: la conta dei trigliceridi, del colesterolo, lipoproteine a bassa e alta densità. Aumenta l'IL-10 e diminuisce l'espressione genica di alcuni fattori pro-infiammatori nelle cellule cheratinocitiche della pelle (HaCaT) (Lembo et al., 2014).

L'effetto **antiinfiammatorio** è stato documentato in uno studio *in vitro* sull'infiammazione indotta da *Propioni bacterium acnes* dove è stata osservata una soppressione delle citochine pro-infiammatorie (IL-8, IL-1 β e fattore di necrosi tumorale TNF- α) nella linea cellulare THP-1 monocitica. Inoltre, si è osservato l'attenuazione del *tumor, calor* e *rubor* all'orecchio dovuto all'infiammazione indotta su modello murino, conseguente alla soppressione del fattore nucleare kappa-B (NF- κ B) e del recettore Toll-like-2 (TLR-2) (Tsai et al., 2013). Ci sono diversi studi *in vivo* che confermano la diminuzione della concentrazione di interferone γ , IL-6, IL-12 e TNF- α in animali infetti (Friedman, 2015).

L'**effetto analgesico**, è stato evidenziato *in vivo* in un modello di dolore neuropatico del nervo sciatico (Alagawany et al., 2017). Numerosi meccanismi possono spiegare l'azione analgesica dell'acido rosmarinico. In condizioni patologiche, la microglia rilascia grandi quantità di citochine pro-infiammatorie come TNF- α , iNOS, TLR-4 che contribuiscono all'accentuarsi del dolore neuropatico tramite vari meccanismi patologici: il rilascio di glutammato, l'eccesso di specie reattive dell'ossigeno e l'apoptosi. Nello studio considerato è stato osservato che Iba-1, un marker di attivazione della microglia spinale, era elevato nel midollo spinale degli animali nei giorni 7 e 14 dopo l'intervento di induzione del dolore. In tali condizioni il trattamento con acido rosmarinico 40 mg/kg ha ridotto il livello di Iba-1 negli animali trattati rispetto a quelli non trattati (Ghasemzadeh et al., 2018). L'acido rosmarinico inoltre inibisce l'espressione di iNOS e la produzione di

TNF- α . È stato anche osservato che la proteina fibrillare acida della glia (GFAP) concorre al mantenimento del dolore neuropatico e l'acido rosmarinico ne inibisce l'espressione (Ghasemzadeh et al., 2018).

In uno studio *in vivo* che riguarda l'infezione del virus dell'influenza giapponese (JEV) si è visto che il virus aumenta il rilascio di varie citochine proinfiammatorie nella linea cellulare della microglia dei topi BV-2, e che il trattamento con l'acido rosmarinico riduce i livelli di IL-12, TNF-, IFN-, MCP-1 e IL-6 (Swarup et al., 2007).

Autori hanno dimostrato un **effetto antiallergico** grazie alla soppressione dell'attività infiammatoria esplicata con la diminuzione di IgE e COX-2 (Alagawany et al., 2017).

Per quanto riguarda l'**effetto antidiabetico**, alcuni studi riportano l'azione inibitoria dell'acido rosmarinico nei confronti dell'amilasi pancreatica, enzima che porta alla liberazione di glucosio dall'amido. Gli estratti di organo contenenti acido rosmarinico hanno provocato un'inibizione dell'amilasi superiore rispetto a una quantità simile di acido rosmarinico impiegato come tale, suggerendo che anche altri composti possano contribuire a un'ulteriore attività inibitoria dell'amilasi. Questa inibizione può essere utile nel trattamento e nell'abbassamento dell'iperglicemia (Mccue & Shetty, 2004).

Molti studi hanno studiato l'azione dell'acido rosmarinico sull'omeostasi del glucosio (Alagawany et al., 2017). Invero, esso stimola l'utilizzo di glucosio da parte delle cellule, non tramite l'aumento dell'insulina bensì attraverso la diminuzione dell'espressione di fosfoenolpiruvato carbossichinasi (PEPCK), enzima, non dipendente dall'insulina, presente nella fase iniziale della gluconeogenesi, sintesi di glucosio *de novo*, che è spesso sovraespresso nei malati di DM. Oltretutto l'acido rosmarinico migliora anche la sensibilità all'insulina, tramite l'aumento dell'espressione e della traslocazione di GLUT-4 da un sito di deposito intracellulare alla membrana delle cellule del muscolo scheletrico, aumentando l'internalizzazione del glucosio e il suo utilizzo nelle vie metaboliche (Runtuwene et al., 2016).

Tra gli studi riguardanti le complicanze del diabete, interessante è una ricerca del 2014 che dimostra come l'acido rosmarinico possa essere una buona strategia per il trattamento del danno neuropatico nei ratti diabetici (Hasanein et al., 2014). Inoltre, questo l'acido rosmarinico contenuto nell'estratto di *Satureja khazestanica* può migliorare significativamente l'ipertrofia glomerulare, la perdita della funzionalità glomerulare, la glomerulosclerosi riducendo l'urea e la creatinina sierica, tutti segni dello stadio finale della neuropatia diabetica a livello renale (Tavafi et al., 2011).

1.13. Tossicità

Per quanto riguarda la tossicità dell'acido rosmarinico bisogna innanzitutto specificare che LD₅₀ nei ratti è di 561 mg/kg per somministrazione intravenosa (Friedman, 2015) ciò suggerisce che non ha particolare tossicità difatti non è considerato né tossico né genotossico (Iswandana et al., 2016).

Un altro studio invece ha valutato l'azione citotossica sulla linea cellulare di cancro al fegato (cellule HepG2), dove si è osservato che a concentrazioni comprese tra 0 e 0,7 mM l'acido rosmarinico non ha azione citotossica. Tuttavia aumentando la

concentrazione esso causa citotossicità in modo concentrazione-dipendente (Adomako-Bonsu et al., 2017). A supporto della scarsa tossicità dell'acido rosmarinico vi è anche uno studio effettuato sul fegato di topi, ratti e tessuti umani dove l'acido rosmarinico ha evidenziato un'attività di protezione nei confronti dell'apoptosi cellulare (Iswandana et al., 2016).

Acido clorogenico

Gli acidi caffeico, ferulico e p-cumarico sono acidi trans-cinnamici che si trovano naturalmente nelle maggior parte delle piante sia nelle loro forme libere sia come mono o diesteri con l'acido chinico, noti collettivamente come acidi clorogenici (Marques & Farah, 2009).

L'acido clorogenico è l'acido 3-caffeilchinico, cioè l'estere tra acido caffeico e l'acido chinico (Y. Yan et al., 2020). Principalmente le sue attività derivano dall'acido caffeico, infatti non appena raggiunge l'intestino, le idrolasi presenti nella mucosa, lo scindono in acido caffeico e acido chinico e altri metaboliti, come tale infatti l'acido clorogenico non ha una buona biodisponibilità (Sato et al., 2011).

L'acido clorogenico è stato isolato nelle foglie di tè, caffè, nei fagioli verdi tostati, frutti di bosco, cacao, agrumi, mele e pere (Naveed et al., 2018).

Derivante dalla classe dei polifenoli non può che presentare una forte attività antiossidante. Questa deriva dalla sua azione di scavenging dei ROS, tramite un meccanismo di HAT (*Hydrogen Atom Transfer*), infatti l'acido clorogenico cede alle specie reattive dell'ossigeno elettroni e atomi di idrogeno e diventa esso una molecola con elettroni spaiati, che però vengono delocalizzati in tutta la molecola per via della combinazione di gruppi idrossilici e molecole aromatiche (Sato et al., 2011).

Gli altri meccanismi che giustificano la sua attività antiossidante sono la diminuzione della perossidazione lipidica e l'aumento *in vivo* di agenti non enzimatici antiossidanti come il glutatione (GSH), vitamina C, vitamina E e ceruloplasmina. Inoltre, potenzia l'attività della superossido dismutasi (SOD), catalasi (CAT), glutatione perossidasi (GSH-Px) e glutatione S-transferasi (GST) (Y. Yan et al., 2020).

Tra le attività si descrive un'azione antidiabetica tramite vari meccanismi: in primo luogo, con studi *in vivo* sui topi ma anche con studi clinici randomizzati in doppio cieco in soggetti con scarsa tolleranza al glucosio, è stato osservato che la somministrazione di acido clorogenico per circa due settimane riduce l'iperglicemia post-prandiale (Y. Yan et al., 2020).

L'acido clorogenico (ACI) ha anche effetti sul metabolismo dei grassi, infatti nei ratti Wistar esposti a una dieta ricca di glucosio e grassi, l'ACI ha migliorato il metabolismo lipidico, ridotto l'aumento di peso degli animali, il peso del fegato, il peso del grasso mesenterico, il contenuto di colesterolo epatico, trigliceridi, acidi grassi liberi nel plasma (Sudeep et al., 2016).

Gli effetti dell'acido clorogenico riguardano anche la resistenza all'insulina, infatti è stato osservato che può aumentarne la sensibilità (Y. Yan et al., 2020). È stato anche osservato un'inibizione degli enzimi responsabili del metabolismo del glucosio e degli acidi grassi;

in particolare l'acido clorogenico può indurre un'inibizione dell' α -amilasi pancreatica porcina, della HMG-CoA reduttasi e della colesterolo aciltransferasi. Ha anche effetti sui pathway di trasduzione del segnale che riguardano il DM, come anche il trasporto nella membrana del trasportatore GLUT-4 e GLUT-2 (Y. Yan et al., 2020).

In Figura 8 sono indicati i meccanismi d'azione dell'acido clorogenico (Naveed et al., 2018).

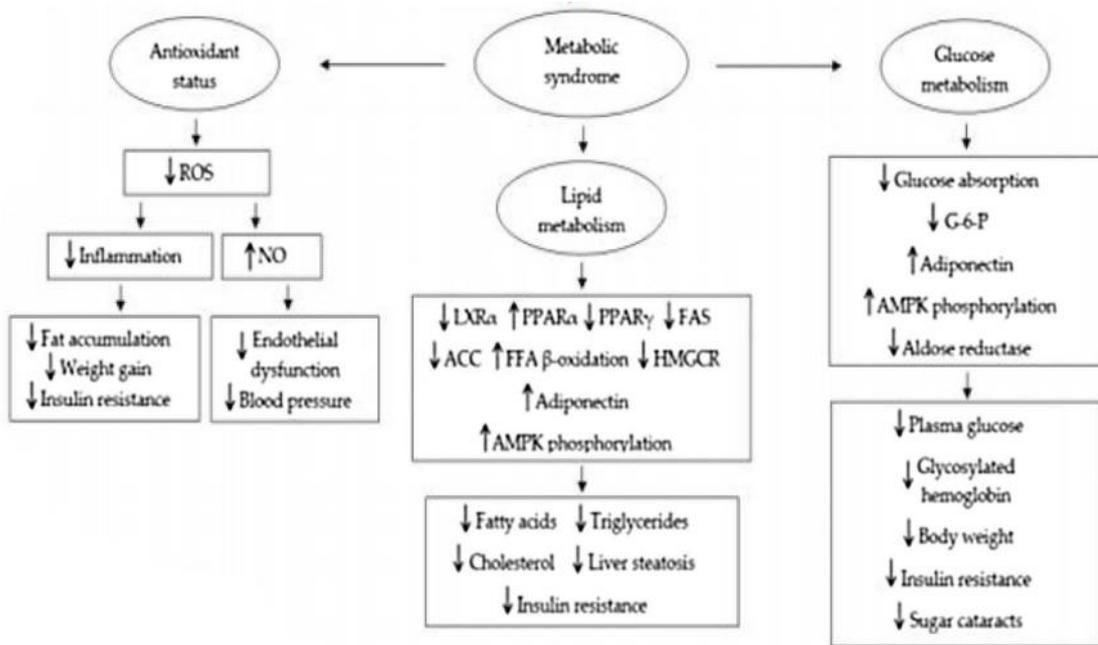


Figura 8: Meccanismi d'azione dell'acido clorogenico (Naveed et al., 2018). ACC: acetil-CoA carbossilasi, FFA: acido grasso libero, FAS: acido grasso sintasi, AMPK: protein chinasi attivata da AMP, HMGCR: 3-idrossi-3-metilglutaril CoA reduttasi, G-6-P: glucosio-6 -fosfatasi, NO: ossido nitrico, LXR α : recettore X del fegato α , PPAR γ : recettore γ attivato da proliferatori del perossisoma, PPAR α : recettore α attivato da proliferatori del perossisoma, ROS: specie reattive dell'ossigeno.

Luteolina

La luteolina fa parte dei composti polifenolici ed è uno dei più comuni flavonoidi presenti nelle piante. Vista la sua appartenenza a questa classe, è nota soprattutto per la sua capacità antiossidante e quindi ha un ruolo protettivo fondamentale per le patologie cardiovascolari croniche e nello sviluppo del cancro (López-lázaro, 2009).

1.14. Chimica

La luteolina appartiene alla classe dei flavonoidi, e più precisamente dei flavoni. I flavonoidi sono composti formati da due anelli aromatici legati da tre atomi di carbonio in un eterociclo ossigenato. Per le differenze in quest'ultimo ed essendo una classe molto ampia di fitochimici, si suddividono in flavoni (Figura 9), flavonoli, catechine, flavononi e antocianine (Wolfe & Liu, 2008). Gli anelli A e B dei flavoni sono anelli benzenici, mentre il terzo anello (C) contiene l'ossigeno e un doppio legame carbonio-carbonio in posizione 2-3 (Manzoor et al., 2019).

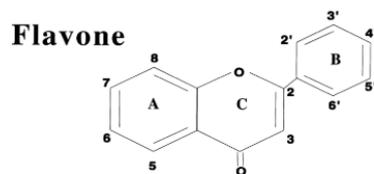


Figura 9: Struttura chimica generale dei flavoni (G. Cao et al., 1997)

La luteolina è il flavone tetraidrossilato nelle posizioni 4', 5', 5 e 7 (Figura 10) (Imran et al., 2019).

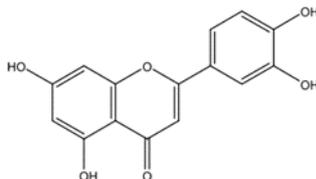


Figura 10: Struttura chimica della luteolina (Imran et al., 2019)

La struttura dei flavonoidi risulta decisamente importante per le attività biologiche e biochimiche attribuite alle molecole di questa classe, tra cui la luteolina, di cui è nota la forte capacità antiossidante. In particolare, sono determinanti i gruppi presenti nell'anello C infatti la perdita di uno qualsiasi dei gruppi funzionali: il 2–3 doppio legame, il gruppo 4-cheto o il gruppo 3-idrossile (che nella luteolina non è presente), tende a tradursi in una riduzione dell'attività. Più nello specifico, questi gruppi funzionali sono utili alla stabilizzazione della molecola per delocalizzazione elettronica, dopo l'acquisizione di elettroni. Risultano anche importanti la presenza contemporanea del 4-cheto gruppo e del 3-idrossile per la capacità di chelare i metalli, noti catalizzatori di reazioni di ossidazione. Allo stesso modo è fondamentale la presenza nell'anello A e B di gruppi idrossilici, che coadiuvano e aumentano la delocalizzazione degli elettroni (Wolfe & Liu, 2008).

Un altro importante focus deve essere fatto sulla lipofilia delle molecole: la misurazione del coefficiente di ripartizione olio-acqua, parametro che permette di prevedere la diffusione delle molecole nella membrana cellulare, gioca un ruolo importante nella capacità antiossidante dei flavonoidi. Infatti, molecole con lipofilia molto alta o molto bassa hanno dimostrato la diminuzione dei valori di attività antiossidante contro la perossidazione lipidica indotta da Fe^{3+} nei microsomi epatici di topo. Molto spesso la lipofilia è diminuita dalla presenza di gruppi idrossilici o, ancor di più, dalla glicosilazione delle molecole (Wolfe & Liu, 2008). Questo interessa la luteolina la quale, nelle piante, si trova per la maggior parte legata a molecole zuccherine. Tuttavia, durante l'assorbimento intestinale i glicosidi della luteolina sono idrolizzati in luteolina libera e in parte in glucuronidi. Ciò determina la sua biodisponibilità ma anche, successivamente, la sua capacità antiossidante all'interno dell'organismo (Manzoor et al., 2019).

1.15. Biosintesi

La biosintesi della luteolina deriva dall'unione del 4-cumaroil-CoA e il 3-malonil-CoA. Il 4-cumaroil-CoA deriva dalla via dell'acido shikimico: la fenilalanina diventa substrato

degli enzimi fenilalanina ammoniaca liasi (PAL) che la trasforma in acido trans-cinnamico, l'acido cinnamico 4-idrossilasi (C4H) darà come prodotto l'acido p-cumarico e l'acido 4-cumarico CoA-ligasi (4CL) porterà alla formazione del 4-cumaroli-CoA. Il 3-malonil-CoA deriva dalla reazione catalizzata dall'acetil-CoA carbossilasi. L'enzima, che ha come cofattori la biotina ed il Mg^{2+} , catalizza la carbossilazione ATP-dipendente dell'acetil-CoA, utilizzando lo ione bicarbonato come donatore di anidride carbonica (CO_2). L'anello B e il ponte centrale a tre atomi di carbonio delle molecole di flavonoidi derivano dal p-cumaril-CoA (e quindi dalla fenilalanina), mentre l'anello A dalle tre unità di malonil-CoA. Quindi dall'unione di 4-cumaroil-CoA e 3-malonil-CoA, tramite l'enzima calcione sintasi, si forma la molecola di calcione, che diventa substrato della flavonone 3β -idrossilasi, la quale darà come prodotto il flavonone. A questo punto il flavonone viene convertito nei suoi derivati: flavoni (Figura 11) e flavan-4-oli. Sulla struttura di base dei flavoni, intervengono i citocromi che si occupano dell'idrossilazione, in particolare nella molecola di luteolina in posizione 4', 5', 5 e 7 (Øyvind M. Andersen, 2006).

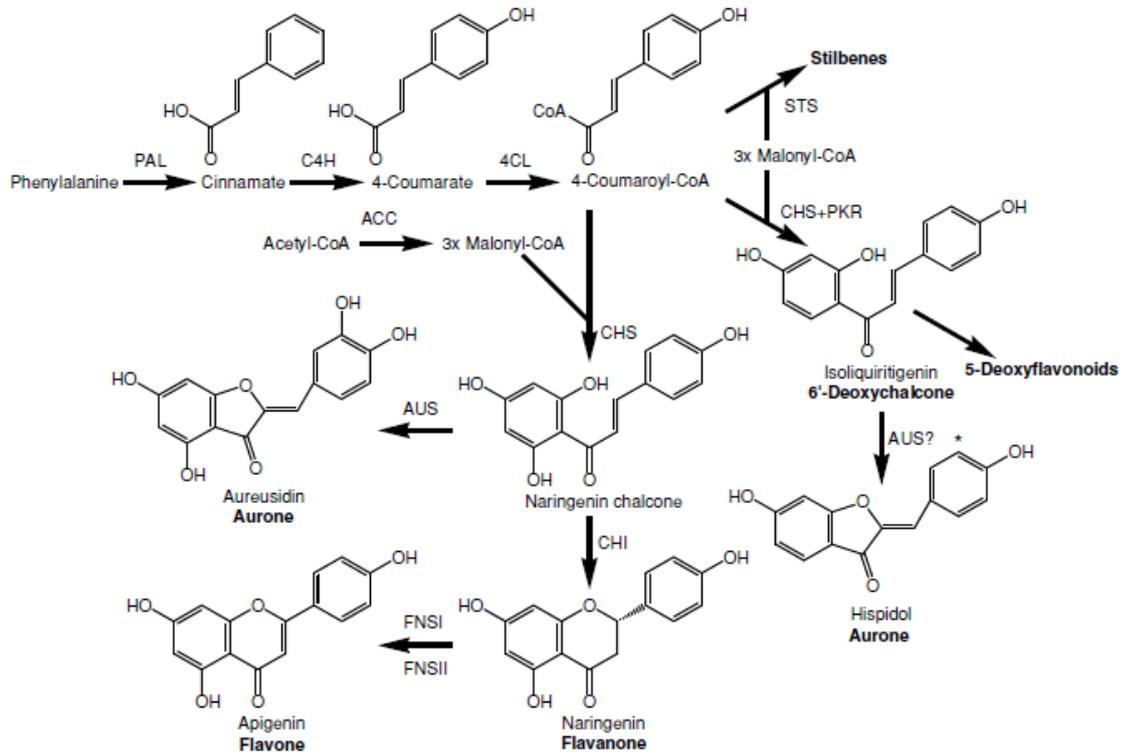


Figura 11: Sintesi dei flavoni (Øyvind M. Andersen, 2006)

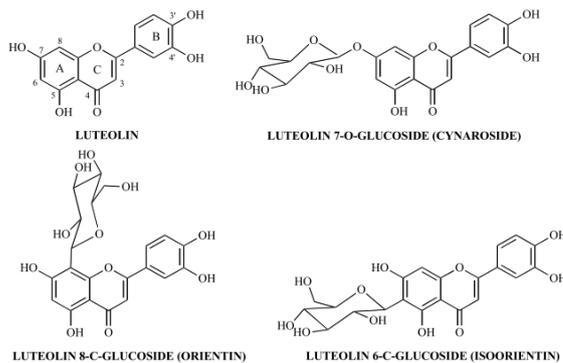


Figura 12: Strutture chimiche di luteolina, cinaroside, orientina e isoorientina (López-lázaro, 2009)

1.16. Derivati

La luteolina è presente nelle piante sia come aglicone (molecola non legata agli zuccheri) sia come glicosidi (aglicone con uno o più zuccheri legati ad esso). La maggior parte dei glicosidi della luteolina sono O-glicosidi, cioè le parti zuccherine sono legate all'aglicone attraverso uno o più gruppi idrossilici (OH) liberi. Questi glicosidi di solito hanno porzioni di zucchero nelle posizioni 5, 7, 4' e 5' (Figura 10). Tra i derivati 7-O-glicosidici si citano il cinaroside (luteolina 7-O- glucoside) e scolimoside (luteolina 7-O-rutinoside). Gli zuccheri possono anche essere legati alla luteolina attraverso un legame C-C, formando C-glicosidi, ad esempio luteolina-8-C-glucoside (orientina) e la luteolina 6-C-glucoside (isoorientina). Il glucosio è lo zucchero più frequentemente presente nei glicosidi della luteolina; tuttavia, ramnosio, rutinosio, galattosio, arabinosio, acido glucuronico e

xilosio sono altri zuccheri che si trovano comunemente nei glicosidi della luteolina. Le strutture della luteolina e tre glicosidi comuni della luteolina sono mostrate in Figura 12 (López-lázaro, 2009).

1.17. Distribuzione

La luteolina è stata isolata nelle Briofite, Pteridofite, Pinofite e Magnoliofite. Nelle Briofite, alcuni glicosidi luteolinici sono stati ritrovati nei muschi delle famiglie Hedwigiaceae, Dicranaceae e Monocleaceae. Nelle Pteridofite, la luteolina e i suoi glicosidi sono stati identificati nelle felci delle famiglie Aspleniaceae, Ophioglossaceae e Pteridaceae, nonché nella famiglia degli equiseti. Nella divisione Pinofite (Gimnosperme) la luteolina è stata identificata nelle Ginkgoaceae. La maggior parte delle famiglie contenenti luteolina sono comprese nelle Magnoliofite (Angiosperme), entrambe nelle Magnoliopside (dicotiledoni) e Liliopside (monocotiledoni). Nelle dicotiledoni, la luteolina è stata identificata in molte famiglie, comprese Anacardiaceae, Apiaceae (Umbelliferae), Asteraceae, Balsaminaceae, Begoniaceae, Berberidaceae, Boraginaceae, Brassicaceae, Caesalpiniaceae, Cucurbitaceae, Cynomoriaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Flacourtiaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Globulariaceae, Lamiaceae (Labiatae), Leguminosae, Malvaceae, Mimosaceae (Leguminosae), Moraceae, Oleaceae, Paeoniaceae, Papaveraceae, Passifloraceae, Piperaceae, Plantaginaceae, Ranunculaceae, Roaceae, Rubiaceae, Rutaceae, Salicaceae, Solanaceae, Sterculiaceae, Thymelaeaceae, Urticaceae, Valerianaceae. Nelle monocotiledoni invece la luteolina è stata identificata nelle Araceae, Arecaceae, Asphodelaceae, Bromeliaceae, Colchicaceae (Liliaceae), Cyperaceae, Melanthiaceae, Poaceae (Graminaceae) e Zosteraceae (López-lázaro, 2009).

La luteolina è stata identificata in molte piante commestibili come carote (*Daucus carota*), peperoni (*Capsicum annuum*), sedano (*Apium graveolens*), olio d'oliva (*Olea europaea*), menta piperita (*Mentha x piperita*), timo (*Thymus vulgare*), rosmarino (*Rosmarinus officinalis*), origano (*Origanum vulgare*), lattuga (*Lactuca sativa*), foglie di Perilla (*Perilla frutescens*), melograno (*Punica granatum*), cioccolato (*Theobroma cacao*), rooibos tè (*Aspalathus linearis*), germogli di grano saraceno (*Fagopyrum esculentum*), rapa (*Brassica napus*), capperi (*Capparis spinosa*) e cetrioli (*Cucumis sativus*). È stata anche identificata nel limone, barbabietola, cavoletti di Bruxelles, cavolo, cavolfiore, erba cipollina, finocchio, prezzemolo, spinaci e tè verde (López-lázaro, 2009).

1.18. Attività biologiche

Data la struttura chimica della luteolina e dei suoi glicosidi non sorprende come molte piante contenenti queste molecole abbiano attività antiossidante. Questa proprietà è associata per lo più alla capacità di eliminare le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS) ma anche di chelare i metalli di transizione che possono indurre danni ossidativi attraverso la reazione di Fenton, di inibire gli enzimi pro-ossidanti e indurre gli enzimi antiossidanti (López-lázaro, 2009).

Gli studi preclinici dimostrano che la luteolina e i suoi derivati possiedono proprietà antiossidanti in modelli sia *in vitro* che *in vivo*. Uno studio condotto sulle cellule CH27 di carcinoma polmonare squamoso umano mostra che l'effetto farmacologico di questo flavonoide è associato all'attivazione della superossido dismutasi e della catalasi anziché alla produzione di specie reattive dell'ossigeno e alla distruzione del potenziale della membrana mitocondriale (Leung et al., 2006). Tuttavia, in contrasto con questo, alcune ricerche dimostrano che l'effetto antiossidante della luteolina è il risultato della dissipazione del potenziale della membrana mitocondriale (Manzoor et al., 2019). La luteolina aumenta significativamente la vitalità delle cellule osteoblastiche aumentando le attività della fosfoinositide 3-chinasi, della proteina chinasi B e della fosforilazione di proteine del pathway del cAMP (M. Y. Choi et al., 2008). Un altro meccanismo antiossidante messo in atto dalla luteolina sarebbe legato alla modulazione dei lipopolisaccaridi (Manzoor et al., 2019).

La luteolina ha dimostrato di esercitare attività antiinfiammatoria sia *in vitro* che *in vivo* (Aziz et al., 2018). A concentrazioni micromolari può inibire il fattore NF- κ B, la cui attivazione porta all'aumento del rilascio di citochine pro-infiammatorie, chemochine ed enzimi (quali iNOS, COX-2, TNF, IL-6, IL-8, IL-1). È stato anche identificato come la luteolina inibisce il rilascio di TNF- α nei macrofagi. Inoltre la molecola è anche in grado di bloccare l'attivazione di NF- κ B indotta dal lipopolisaccaride (LPS). La luteolina inoltre inibisce l'attivazione della proteina AP-1, che media l'espressione della citochina IL-6. L'attività inibitoria della luteolina è indirizzata anche verso gli enzimi pro-infiammatori, come le cicloossigenasi, atte a sintetizzare prostaglandine e leucotrieni noti mediatori dell'infiammazione (López-lázaro, 2009; Manzoor et al., 2019).

Alcuni studi suggeriscono la luteolina anche come antimicrobico, essa ha spesso dimostrato attività antivirali, antibatteriche e antifungine. Difatti è stata studiata la sua attività contro il virus *Epstein-Barr* e contro il virus dell'epatite B, in quanto riduce la replicazione del DNA virale (Manzoor et al., 2019).

Uno studio *in vivo* ha studiato l'uso della luteolina nei topi con un'infezione acuta in corso di *Chlamydia pneumoniae*. I topi sono stati trattati da tre giorni prima a dieci dopo l'inoculo del batterio e le analisi sul tessuto polmonare hanno dimostrato che la luteolina riduce l'infiammazione e lo sviluppo di anticorpi specifici contro la *Chlamydia pneumoniae* (Vuorela et al., 2005). La luteolina ha sortito effetti anche sulle infezioni di alcuni parassiti quali *Leishmania donovani* e *Plasmodium falciparum* (Manzoor et al., 2019).

Da diverso tempo è noto che i flavonoidi hanno proprietà preventive nei processi tumorali e la luteolina, non di meno, ha dimostrato tale caratteristica.

La cancerogenesi è un processo di lunga durata e multifasico che consegue dall'espansione clonale di cellule mutate. Un tipico processo cancerogeno può essere suddiviso in tre fasi: iniziazione, promozione e progressione. Durante l'iniziazione, un potenziale cancerogeno reagisce con il DNA per indurre alterazioni genetiche irreversibili. Durante la fase di promozione, si verificano alterazioni nell'espressione genomica per favorire la crescita e la proliferazione cellulare. Infine, durante la fase di progressione il processo cancerogeno diventa irreversibile caratterizzandosi per instabilità cariotipica e crescita maligna incontrollata. Le cellule trasformate acquisiscono una serie di alterazioni, inclusa la capacità di proliferare in modo indipendente dal segnale promuovendo la crescita esogena, di invadere i tessuti circostanti e di metastatizzare in siti distanti. Inoltre, le cellule tumorali provocano una risposta angiogenica, eludono i meccanismi che limitano la proliferazione cellulare (come l'apoptosi e la senescenza) e sfuggono alla sorveglianza immunitaria (Yong Lin, Ranxin Shi, Xia Wang, 2009).

Alcuni autori hanno suggerito che la luteolina è in grado di interferire con quasi tutti i suddetti meccanismi. In primo luogo inibirebbe potentemente gli enzimi della famiglia del citocromo P450 (CYP) 1 umano, sopprimendo così l'attivazione mutagenica dei pro-mutageni. Inoltre, sarebbe in grado di controllare le chinasi ciclina dipendenti (CDK) mediante l'up-regolazione degli inibitori delle chinasi, proteine che agiscono nei punti di controllo del ciclo cellulare, il cui funzionamento è alterato nelle cellule tumorali. Di fatto la luteolina ha mostrato questa azione nelle cellule HT-29 del cancro al colon retto e nelle cellule OCM-1 del melanoma; inoltre inibisce la topoisomerasi, responsabile della riparazione del DNA delle cellule tumorali (Yong Lin, Ranxin Shi, Xia Wang, 2009).

La luteolina è anche in grado di inibire la fosforilazione della tirosina chinasi mediata da EGF (*Epidermal growth factor*) nei lisati di cellule A431 di carcinoma epidermoide della pelle (Y. Huang et al., 1999). In un altro studio si è anche evidenziato che la luteolina può inibire la proliferazione indotta da PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) diminuendo la fosforilazione del suo recettore nelle cellule muscolari lisce vascolari (Jin-ho Kim et al., 2005). Uno studio riporta anche l'inibizione da parte della luteolina del recettore del fattore di crescita simile all'insulina (IGFr) nelle cellule del cancro alla prostata (Fang et al., 2007). Oltretutto, avrebbe azioni anti-estrogeniche grazie alle quali inibirebbe la proliferazione mediata dai recettori degli estrogeni ER (Yong Lin, Ranxin Shi, Xia Wang, 2009).

La luteolina sarebbe anche in grado di indurre l'apoptosi in cellule tumorali, attivando delle vie di segnale specifiche e sopprimendo invece le vie che determinano la sopravvivenza di queste cellule (Yong Lin, Ranxin Shi, Xia Wang, 2009).

Tra i meccanismi che permetterebbero alla luteolina di inibire la crescita tumorale si descrive la capacità anti-angiogenica mediata dalla inibizione di MMP e COX-2 (Ambasta et al., 2019). Infine, alcuni studi riportano la capacità della luteolina di inibire la secrezione di citochine come TNF α e IL-6, che possono stimolare la migrazione e le metastasi delle cellule tumorali. Sarebbe anche in grado di bloccare la via di segnale

EGFR, implicata nella migrazione delle cellule, e di inibire la fosforilazione che attiva chinasi di adesione focale (FAK) che fornisce alle cellule tumorali la capacità di invadere i tessuti (Yong Lin, Ranxin Shi, Xia Wang, 2009).

Infine, tra le azioni biologiche della luteolina si riportano alcune evidenze che la rendono un agente anti-diabetico, ciò in attinenza principalmente con le sue caratteristiche antiossidanti. La luteolina infatti ha un effetto protettivo sulla cardiomiopatia diabetica, la nefropatia diabetica e lo stress ossidativo nella condizione diabetica, ciò tramite l'azione di scavenging dei ROS e l'aumento dell'espressione della SOD (Ambasta et al., 2019).

Inoltre ha un'azione inibitoria nei confronti dell' α -glucosidasi, enzima che scinde gli oligosaccaridi in glucosio. Per tale motivo la luteolina potrebbe avere attività anti-iper-glicemica (J. Yan et al., 2014).

Diabete

L'importanza patologica del diabete mellito (DM) è legata alla sua ampia diffusione nel mondo, al suo andamento generalmente cronico e alle sue complicanze a breve e lungo termine. Infatti nonostante i progressi terapeutici il DM è tuttora la principale causa di insufficienza renale cronica, cecità nell'adulto e amputazione degli arti inferiori; inoltre, rappresenta uno dei maggiori fattori di rischio per le patologie cardiovascolari.

Il DM è una malattia metabolica caratterizzata da elevati livelli di glucosio nel sangue a causa di un deficit della secrezione e/o dell'azione dell'insulina. Di questa patologia si descrivono vari tipi con diversa eziologia; tuttavia, le forme più comuni sono il diabete di tipo 1 (DM1) e di tipo 2 (DM2), i rimanenti casi sono dovuti a forme monogeniche ma anche a cause non genetiche quali gravidanza, neoplasie, infezioni virali, sostanze chimiche, ecc.

Il DM1 chiamato anche diabete giovanile o diabete insulino-dipendente, è legato alla distruzione delle cellule β delle isole di Langerhans del pancreas secernenti insulina, da cui ne deriva un deficit grave o assoluto di insulina.

Dalla mancata secrezione di insulina ne deriva un'inibizione della sintesi dei depositi di trigliceridi nel tessuto adiposo e della sintesi di glicogeno nel fegato e tessuto muscolare, mentre sono favoriti la glicogenolisi, la lipolisi e la proteolisi, portando ad un conseguente dimagrimento con l'immissione in circolo di acidi grassi non esterificati. Il trattamento è effettuato mediante la somministrazione di un'adeguata dose di insulina sottocute.

Il DM2 invece è legato all'insulino-resistenza che precede, di solito, un deficit assoluto o relativo della secrezione dell'ormone insulina. Inoltre, nelle fasi iniziali della malattia, la resistenza all'insulina si associa ad un aumento della secrezione insulinica, utile per contrastare l'aumento del fabbisogno. L'insulino-resistenza però inibisce selettivamente le vie di trasduzione del segnale metabolico mediate dalla fosfatidil-inositolo 3'-chinasi (PI3K) che fisiologicamente attiva la protein-chinasi B (ATK), per cui diminuisce la produzione di ossido nitrico e il trasporto di glucosio nelle cellule muscolari e adipose (Pontieri et al., 2015). Al contempo aumenta la produzione di endotelina-1 che, al

contrario dell'ossido nitrico, provoca vasocostrizione causando ipertensione arteriosa che caratterizza la sindrome metabolica. Inoltre, nel DM2 sono inibiti i processi di glicogenolisi, lipolisi e proteolisi (diversamente dal DM1 nel quale sono favoriti i processi catabolici). Al DM2 spesso si associa la dislipidemia con ipertrigliceridemia, dovuta alla diminuita attività della lipoproteina lipasi (LPL) endoteliale, che conduce a una riduzione della rimozione di trigliceridi dai capillari. Si sono osservati inoltre bassi livelli di HDL circolanti, lipoproteine che proteggono dall'aterosclerosi.

Le complicanze del DM possono mettere a rischio la vita del paziente con eventuale complicanze acute comparsa in acuto di coma chetoacidoso, iperosmolare, ipoglicemico e latticemico, ma ci sono anche complicanze che insorgono nel lungo termine, anche dopo 10-20 anni, dovute principalmente all'iperglicemia cronica che provoca alterazioni specifiche a tessuti e organi (Pontieri et al., 2015).

1.19. Enzima α -glucosidasi e iperglicemia

L' α -glucosidasi è un enzima appartenente alla classe delle idrolasi che catalizza la scissione dei carboidrati complessi in monosaccaridi (Proença et al., 2017). La reazione idrolitica rilascia α -D-glucosio dall'estremità non riducente dello zucchero (Ha et al., 2012) e avviene per scissione del legame tra il carbonio anomero del residuo glucosilico e l'ossigeno glucosidico. Il residuo glucosilico è quindi sostituito da un protone dell'acqua o da un accettore (Chiba, 1997).

L'enzima si trova sulla superficie dell'orletto a spazzola delle cellule intestinali (Ha et al., 2012); la sua attività concorre all'iperglicemia post-prandiale dovuta all'assorbimento di glucosio dal duodeno.

Si parla di iperglicemia post-prandiale quando la glicemia determinata 1.5 - 2 h dopo il pasto è maggiore di 200 mg/dL, mentre la glicemia di soggetti sani è minore di 140 mg/dL (Proença et al., 2017).

La prevenzione dell'iperglicemia postprandiale è importante non solo per garantire l'omeostasi del glucosio in pazienti affetti da DM, ma anche per diminuire l'aumento dell'emoglobina glicata (HbA_{1c}) che contribuisce alle complicanze microvascolari e macrovascolari (Baron, 1998).

Secondo il modello classico eziologico, nel disordine dell'omeostasi del glucosio, si ha una diminuzione della secrezione di insulina e/o una diminuzione della sua azione fisiologica che causa iperglicemia, anche a digiuno. L'iperglicemia, a sua volta, può peggiorare il quadro generale dei sintomi e delle complicanze del DM provocando anche l'esacerbazione dell'insulino-resistenza e delle anomalie di secrezione dell'ormone. Si instaura un circolo vizioso che porta al peggioramento dello stato di intolleranza al glucosio. Oltretutto bisogna anche considerare che in individui a rischio di insulino-resistenza l'iperglicemia post-prandiale ripetuta, anche modesta, può portare alla desensibilizzazione delle cellule β del pancreas, alla loro degenerazione e a una conseguente diminuzione della secrezione di insulina (Baron, 1998).

Il protratto stato di iperglicemia è responsabile delle complicanze a lungo termine del DM, dovute principalmente ad alterazioni a livello vascolare causate da modificazioni

molecolari e metaboliche che danneggiano le pareti vasali causando insufficiente perfusione degli organi. In particolare, le microangiopatie colpiscono i piccoli vasi, capillari e arteriole, ciò è dovuto principalmente alla deposizione di matrice extracellulare e sono all'origine di nefropatie e retinopatie. Le macroangiopatie invece riguardano le arterie muscolari di medio e grosso calibro, le coronarie, le arterie cerebrali, le renali. Spesso la macroangiopatia, aggravata da altri fattori di rischio come dislipidemia e ipertensione, causa un'accelerata aterosclerosi che è alla base di molte patologie come infarto del miocardio, vasculopatie periferiche e patologie cerebrovascolari. Le alterazioni macroangiopatiche possono aggravare i danni da microangiopatia, come avviene ad esempio nel piede diabetico (Pontieri et al., 2015). Conseguentemente al riconoscimento patogeno dell'iperglicemia, numerosi autori si sono interessati allo studio degli inibitori dell' α -glucosidasi; attualmente in Italia si usa in terapia l'acarbiosio che consente l'inibizione dell'enzima diminuendo il picco glicemico dopo il pasto (Baron, 1998).

Tuttavia, gli inibitori dell' α -glucosidasi attualmente impiegati mostrano molteplici effetti collaterali, soprattutto a livello del tratto gastro intestinale come diarrea, flatulenza e dolori (sintomi comuni), subocclusione intestinale, ileo e pneumatosi cistoide intestinale più raramente (Nikookar et al., 2018). Visti gli aspetti negativi dei farmaci in questione è importante ricercare nuove molecole in grado di favorire la diminuzione dell'iperglicemia postprandiale ma contemporaneamente con minori effetti collaterali.

1.20. Glicazione e AGEs

Evidenze sperimentali suggeriscono il coinvolgimento di diversi meccanismi nella patogenesi delle complicanze a lungo termine del DM. Tra queste vi sono l'attivazione della proteina-chinasi C (PKC), che porta all'aumento di molecole che determinano alterazioni dell'endotelio vasale; l'attivazione della via dei polioli, che porta alla diminuzione di glutazione ridotto e conseguente aumento dello stress ossidativo e anche alterazioni osmotiche; infine si ha l'attivazione della via delle esosamine, responsabile della glicosilazione proteica *O-linked*, in concomitanza a un ulteriore processo concorrente alle complicanze del DM che consiste nella formazione dei prodotti finali di glicazione avanzata (AGEs) (Pontieri et al., 2015).

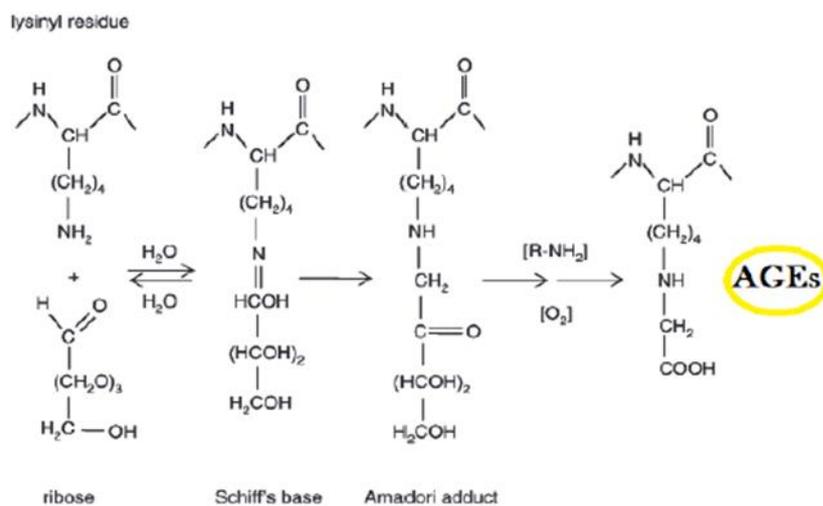


Figura 13: Reazione di formazione dei prodotti finali di glicazione (AGEs) (Wei et al., 2012).

Gli AGEs derivano dalla glicosilazione non enzimatica descritta in Figura 13. Essa avviene in tre fasi principali. Nella fase iniziale, i gruppi aldeidici o chetonici degli zuccheri, eccessivamente presenti in una condizione di DM, ad esempio ribosio o glucosio, reagiscono con gruppi amminici liberi delle proteine, acidi nucleici e lipidi con formazione di prodotti instabili, chiamati basi di Schiff. Quest'ultime spontaneamente si modificano in prodotti di Amadori che subiscono in un secondo momento delle trasformazioni successive più lente, quali ossidazione e disidratazione, portando alla formazione di composti con gruppi carbonilici molto più reattivi del glucosio di partenza. Questa caratteristica consente a questi composti di attaccare a loro volta i gruppi amminici di altre proteine, propagando la reazione di glicazione. La fase avanzata porta irreversibilmente alla formazione degli AGEs che sono dei composti giallo-bruni, fluorescenti e insolubili, derivanti da ulteriori reazioni di ossidazione e ciclizzazione dei prodotti di Amadori e dei suoi derivati.

Tali trasformazioni possono avvenire a livello dei fosfolipidi, dei nucleotidi e delle proteine, con conseguenze più gravi su quelle molecole che hanno un basso grado di ricambio fisiologico (Basta, Del Turco, et al., 2004; Basta, Schmidt, et al., 2004; Pontieri et al., 2015; Wei et al., 2012).

L'eccessiva glicazione delle proteine non solo modifica in maniera irreversibile la conformazione delle proteine stesse alterandone quindi la funzionalità, ma causa anche la formazione di aggregati molecolari stimolando reazioni infiammatorie e alterazioni della composizione e della struttura della matrice extracellulare. Questi processi sono quindi coinvolti nello sviluppo di microangiopatia e nell'accelerazione del processo aterosclerotico (macroangiopatia) (Pontieri et al., 2015).

Si è inoltre evidenziato che gli AGEs possono attivare specifici recettori (RAGE – *Receptor for Advanced Glycation End Products*), proteine transmembrana facenti parte della classe delle immunoglobuline. Il legame dei prodotti finali di glicazione ai RAGE presenti sui linfociti T, macrofagi e monociti stimola il sistema immunitario con la produzione di citochine, fattori di crescita e conseguente aumento della sintesi di collagene;

meccanismi che portano all'esacerbazione del danno vascolare nel paziente diabetico. Infatti, è stato osservato che questi recettori sono sovraespressi in condizioni di DM, infiammazione cronica e disordini neurodegenerativi.

Inoltre, gli AGEs si possono legare alle LDL portando ad un processo di ossidazione delle stesse (Basta, Schmidt, et al., 2004).

1.21. Stress ossidativo e diabete

Le cellule utilizzano principalmente l'ossigeno per generare energia attraverso la fosforilazione ossidativa. In questo processo, la generazione di ATP è accoppiata a una reazione in cui quattro elettroni e quattro protoni vengono aggiunti all' O_2 per formare due molecole di H_2O . Durante queste fasi si può verificare che l'ossigeno acquisisca un solo elettrone con la formazione di anione superossido ($O_2^{\bullet-}$), specie altamente reattiva che tende a guadagnare altri tre elettroni e quattro protoni per formare H_2O . Questo processo coinvolge diverse altre reazioni che determinano la produzione di altri ROS come il perossido di idrogeno (H_2O_2), il radicale idrossile (OH^{\bullet}) e il perossinitrito ($ONOO^-$) (López-lázaro, 2009). Sebbene la produzione controllata di ROS svolga un ruolo fisiologico importante, un'elevata produzione di ROS non controbilanciata dalle difese antiossidanti cellulari può dare origine a una condizione di elevato stress ossidativo. È stato anche proposto che lo stress ossidativo svolga un ruolo importante nella patogenesi di cancro, malattie cardiovascolari, aterosclerosi, ipertensione, ischemia, DM, disturbi neurodegenerativi (morbo di Alzheimer e morbo di Parkinson), artrite reumatoide e invecchiamento (López-lázaro, 2009).

In particolare, per il diabete il meccanismo correlato allo stress ossidativo è la via di attivazione dei polioli. Quest'ultima trasforma il glucosio intracellulare in eccesso in polialcoli, attraverso una reazione catalizzata dall'enzima aldoso-reduttasi. Questo enzima catalizza la riduzione NADPH-dipendente del glucosio a sorbitolo, che a sua volta innesca una serie di modificazioni intracellulari dei tessuti vascolari. L'aldoso-reduttasi ha normalmente una bassa affinità per il glucosio infatti alle normali concentrazioni di glucosio, tipiche dei soggetti non diabetici, questa via rappresenta solo una piccola percentuale del metabolismo totale di glucosio. Contrariamente nel diabete dove l'iperglicemia determina l'attivazione della reduttasi e la successiva conversione del glucosio in sorbitolo. Il sorbitolo viene poi ossidato in fruttosio dalla sorbitolo deidrogenasi, con riduzione del NAD^+ a NADH. Questo processo determina il consumo di NADPH e quindi una diminuita rigenerazione di glutatione ridotto, con aumento della produzione di ROS e conseguenti effetti deleteri sul sistema vascolare (Caterina et al., 2011).

Pertanto, per diminuire lo stress ossidativo può essere utile l'impiego di antiossidanti; tra quelli naturali si ricordano la vitamina E, l'acido ascorbico e i composti fenolici che sono in grado di bloccare fin dal principio le reazioni radicaliche implicate nella formazione di ROS, cedendo elettroni e protoni con meccanismo HAT (*Hydrogen Atom Transfer*) e diventando delle molecole con elettroni spaiati ma con una carica delocalizzata nella molecola aromatica (Naguib et al., 2003).

Progetto Wikipedia

L'Enciclopedia libera e collaborativa Wikipedia è un'enciclopedia online gratuita e fruibile da tutti coloro che hanno accesso ad una connessione internet, creata e modificata da volontari di tutto il mondo e promossa da Wikipedia Foundation.

Sono circa 300 distinte per lingua e ognuna di queste è indipendente dalle altre, per cui una voce presente nell'enciclopedia italiana può anche non essere presente o essere più ricca nell'enciclopedia Wikipedia inglese. Ritroviamo infatti, tra queste, l'English Wikipedia, che vanta il numero maggiore di voci (6 168 000 e più articoli); la Deutsch Wikipedia con 2 486 000 voci; l'Español Wikipedia che presenta 1 630 000 e più voci e Français Wikipedia con più di 2 254 000 voci.

Esiste poi anche in altre lingue come il portoghese, arabo, cinese ecc., con un numero inferiore di voci. Wikipedia in lingua italiana si colloca al quinto posto tra le diverse enciclopedie libere nelle varie lingue, con più di 1 639 000 voci (*Statistiche Wikipedia*).

All'interno di ogni enciclopedia troviamo le voci o "articles", composte da un titolo principale, che viene mostrato nella pagina dei risultati web e, all'interno, una breve introduzione e lo svolgimento in vari paragrafi del testo esplicativo.

La logica che segue questa enciclopedia è una logica ipertestuale per cui nel testo si ritrovano dei termini cosiddetti *wikificati*, ossia collegamenti diretti ad altre voci presenti in Wikipedia che permettono quindi l'approfondimento dell'argomento.

Al termine di ogni voce sono riportate anche le "Voci correlate" che permettono di ampliare la conoscenza di argomenti connessi a quello consultato.

2. OBIETTIVI SPERIMENTALI

Considerate tutte le potenziali attività dei composti naturali, più in particolare dei polifenoli, e la forte necessità di nuove molecole con possibili attività farmacologiche nei confronti dei meccanismi del diabete e delle sue complicanze, lo scopo di questo studio sperimentale è stato quello di valutare l'attività di acido rosmarinico, acido caffeico, acido clorogenico e luteolina nei confronti di diversi target farmacologici coinvolti nel controllo del danno derivante dallo stato iperglicemico.

Di questi composti è stato effettuato l'*α-Glucosidase Inhibition (α-GI) assay*, un saggio colorimetrico che consente di determinare l'attività di inibizione dei composti sull'*α*-glucosidasi, enzima localizzato nell'intestino tenue che idrolizza gli oligosaccaridi e che permette l'assorbimento del glucosio.

È stata anche valutata l'attività antiossidante dei composti in studio mediante l'utilizzo del test ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) che permette di studiare la capacità delle sostanze di inibire, attraverso un meccanismo HAT (*Hydrogen Atom Transfer*) la reazione radicalica innescata da radicali perossidici.

Strettamente correlata allo stress ossidativo è la formazione dei prodotti avanzati di glicazione (AGEs), il cui accumulo contribuisce allo sviluppo delle complicanze vascolari nel paziente diabetico. Allo scopo di approfondire questo aspetto è stato effettuato il *BSA assay* che permette di osservare la capacità dei composti di ridurre la formazione dei prodotti di glicazione utilizzando come substrato proteico l'albumina bovina.

Ulteriore obiettivo di questa tesi è stato quello di contribuire alle voci in Wikipedia, progetto proposto dalla Dott.ssa Cinzia Ferranti dell'Ufficio Digital Learning e Multimedia dell'Università degli Studi di Padova. Grazie ad un lavoro di ricerca bibliografica è stata quindi ampliata la voce "Acido rosmarinico" in Wikipedia italiana.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Sostanze utilizzate

Campioni

ACIDO ROSMARINICO	≥ 98%; PM = 360.31 g/mol (<i>Sigma-Aldrich</i>)
ACIDO CAFFEICO	≥ 98%; PM = 180.16 g/mol (<i>Sigma-Aldrich</i>)
ACIDO CLOROGENICO	≥ 95%; PM = 354.31 g/mol (<i>Sigma-Aldrich</i>)
LUTEOLINA	≥ 98%; PM = 386.24 g/mol (<i>Sigma-Aldrich</i>)

Standard e reattivi

ACIDO ASCORBICO	PM = 176.12 g/mol (<i>Sigma-Aldrich</i>)
FLUORESCEINA	Fluoresceina; PM = 332.31 g/mol (<i>Sigma-Aldrich</i>)
AAPH	2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride, 98%; PM = 271.19 g/mol (<i>Acros Organics</i>)
TROLOX	Acido 6 – idrossi – 2, 5, 7, 8 – tetrametilcromano – 2 - carbossilico 97%; PM = 250.29 g/mol (<i>Sigma-Aldrich</i>)
ENZIMA α-Glucosidasi	α-Glucosidase da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>Sigma-Aldrich</i>)
ACARBOSIO	Acarbosio ≥95%; PM = 645.60 g/mol (<i>Sigma-Aldrich</i>)
pNPG	4-nitrofenil-α-D-glucopiranoside ≥99%; PM = 301.25 g/mol (<i>Sigma-Aldrich</i>)
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> ≥96%; PM~66kDa (<i>Sigma-Aldrich</i>)
AMINOGUANIDINA	Aminoguanidina bicarbonato 97%; PM = 136.11 g/mol (<i>Sigma-Aldrich</i>)
NaN ₃	Sodio azide; PM= 65.01 g/mol (<i>ProLabo</i>)
RIBOSIO	98%; PM= 150,13 g/mol (<i>Merck</i>)

Solventi

H ₂ O	Acqua MilliQ
PBS _{orac}	Tampone fosfato per saggio ORAC 0.1 M, pH = 7.2-7.4
DMSO	Dimetilsolfossido
PBS _{alfaglucosidasi}	Tampone fosfato per saggio alfaglucosidasi 0.1 M, pH = 6.8
PBS _{BSA}	Tampone fosfato salino per saggio BSA, 10 mM fosfato, 137 mM NaCl, 2.5 mM KCl, pH = 7.4

3.2. α -Glucosidasi assay

L'enzima α -glucosidasi, localizzato nell'orletto a spazzola dell'intestino, permette l'idrolisi di oligosaccaridi e disaccaridi in glucosio il cui assorbimento porta ad un aumento della glicemia e del conseguente picco iperglicemico postprandiale (Proença et al., 2017).

Come terapia antidiabetica vengono pertanto utilizzati inibitori dell'enzima al fine di abbassare il picco glicemico, inibendo quindi i processi catabolici dei carboidrati legati al loro assorbimento. Nel saggio è stato utilizzato l'acarbiosio, come controllo positivo, noto farmaco inibitore dell'attività enzimatica (Baron, 1998).

Per esaminare l'attività enzimatica si è usato il *p*-nitrofenolo- α -D-glucopiranoside (*p*-NPG), substrato dell' α -glucosidasi che catalizza la sua idrolisi in *p*-nitrofenolo e α -D-glucopiranoside (Figura 14). Il *p*-nitrofenolo si presenta di colore giallo permettendo la misura dell'assorbanza che varia in funzione della quantità del prodotto (Qurrat-ul-Ain et al., 2017).

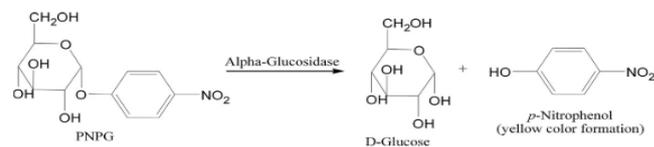


Figura 14: Idrolisi del *p*-NPG catalizzato per mezzo dell' α -glucosidasi (Qurrat-ul-Ain et al., 2017).

Lo scopo di questo protocollo sperimentale è osservare l'attività anti- α -glucosidasica dei composti in studio, determinata per via indiretta tramite la diminuzione dell'intensità del colore giallo, caratteristico del *p*-nitrofenolo, che si ottiene in presenza di inibitori rispetto alla condizione di controllo (senza inibitori).

Protocollo sperimentale

La procedura sperimentale per il saggio dell' α -glucosidasi prevede l'utilizzo di una piastra a 96 pozzetti. I composti acido rosmarinico, acido caffeico, acido clorogenico e luteolina, sono stati preparati a concentrazioni comprese tra 5 μ M e 100 μ M. L'acarbiosio (200 - 4000 μ M), composto di riferimento, è stato utilizzato come composto ad attività nota (controllo positivo). L'enzima α -glucosidasi è stato impiegato in un intervallo di concentrazione compreso tra 0.025 e 0.125 U/ml.

La piastra è incubata a 37 °C per 10 minuti, successivamente ad ogni pozzetto si aggiunge *p*-NPG (tra 0.25 e 2 mM). La successiva lettura cinetica dell'assorbanza è stata effettuata con Multiplate Reader VictorNivo (PerkinElmer) alla lunghezza d'onda di 405 nm per 60 minuti.

Elaborazione dei dati

I dati sono riportati come media per ogni concentrazione di composto durante i 60 minuti di lettura (cinetica di reazione).

La percentuale di attività enzimatica è stata calcolata secondo la seguente formula:

$$\% \text{ Attività enzimatica} = \frac{Abs_{sostanza}}{Abs_{max}} \times 100$$

La relativa inibizione enzimatica è stata calcolata come:

$$\% \text{ Inibizione enzimatica} = 100 - \% \text{ Attività enzimatica}$$

3.3. ORAC assay

Il saggio *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC) è il protocollo sperimentale utilizzato per studiare l'attività antiossidante dei composti e si basa sulla degradazione ossidativa di una molecola fluorescente, tramite radicale, e sulla capacità del campione di inibire tale ossidazione. Infatti, quando la molecola fluorescente viene ossidata, la sua fluorescenza cesserà. Il protocollo utilizzato prevede l'uso della fluoresceina, che viene degradata dalla presenza di radicali perossidici, generati dalla decomposizione termica (37°C) del 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) diidrocloreuro (AAPH), iniziatore di radicali (Nkhili & Brat, 2011). Per determinare la capacità antiossidante dei composti, visibile tramite la misurazione del ritardo del decadimento della fluorescenza, è necessario costruire una retta di taratura con uno standard: nel saggio viene impiegato il Trolox, analogo idrosolubile della vitamina E (Van Den Berg et al., 1999).

Protocollo sperimentale

Il protocollo per il saggio ORAC prevede l'utilizzo della fluoresceina in concentrazione di 0.08 µM (B. Ou et al., 2001). Sono state utilizzate soluzioni dei campioni da analizzare a diverse concentrazioni, comprese tra 1.5 µM e 7 µM. L'acido ascorbico è stato impiegato come composto di riferimento, dal momento che ha un comportamento prevedibile al saggio. Dato che la molecola di acido rosmarinico non è solubile in acqua ma solubile in DMSO, tutte le soluzioni finali hanno previsto la presenza di DMSO (1.0%). Successivamente sono state preparate le soluzioni di Trolox (standard antiossidante, 6.25 - 50 µM). Il saggio prevede l'utilizzo di una piastra a 24 pozzetti. In ogni pozzetto della piastra sono stati aggiunti 250 µL delle diverse concentrazioni dello standard Trolox o delle diverse soluzioni campione.

Poi, la piastra è sottoposta a 10 min di incubazione a 37°C, successivamente le soluzioni dei campioni e del bianco vengono addizionate con 250 µL di soluzione del radicale AAPH alla concentrazione di 0.15 M.

Si esegue quindi la lettura cinetica per 45 min con un lettore di piastre Multiplate Reader Victor Nivo (*PerkinElmer*), alle lunghezze d'onda di eccitazione di 460 nm e di emissione 530 nm.

Elaborazione dei dati

Si pone come 100% il valore medio di fluorescenza della fluoresceina nel tempo, i dati quindi vengono normalizzati ed espressi come variazione percentuale della fluorescenza. Si calcola quindi il valore di AUC (*Area Under the Curve*) dai valori normalizzati per ogni composto o standard e, successivamente, si determina la differenza di AUC, sottraendo a ogni valore di AUC del trattamento i valori di AUC del controllo. Data la media dei valori di AUC così ottenuta per ogni concentrazione dello standard Trolox si costruisce la retta di taratura. Dati i valori della retta di taratura si calcolano, per ogni concentrazione di campione, i valori di Equivalenti Trolox (TEAC

ovvero *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*). Questo ci permette successivamente di esprimere i dati in $\mu\text{mol}_{\text{TEAC}}/\mu\text{mol}_{\text{CAMPIONE}}$.

3.4. BSA assay

Il BSA assay è un saggio fluorimetrico che permette di studiare l'attività di inibizione dei composti in esame nei confronti della formazione dei prodotti di glicazione. I prodotti di glicazione derivano da una reazione non enzimatica tra le proteine presenti nel circolo sanguigno e agenti glicanti, spesso gli zuccheri liberi o dei loro prodotti di degradazione, che modificano in maniera covalente le proteine (Vistoli et al., 2013).

Il saggio sopracitato utilizza l'albumina, una delle proteine più abbondanti nel plasma, in particolare utilizza la BSA (*Bovine Serum Albumin*), cioè l'albumina bovina, che condivide il 76% della sequenza della HSA (*Human Serum Albumin*) (B. X. Huang et al., 2004). L'analisi prevede la misura della fluorescenza emessa dai prodotti di glicosilazione avanzata tra la BSA e il ribosio e l'eventuale diminuzione della fluorescenza in presenza dei composti studiati quali possibili inibitori della reazione di glicazione.

Protocollo sperimentale

Il protocollo sperimentale per l'allestimento del BSA assay prevede l'utilizzo di una piastra a 96 pozzetti.

La BSA viene solubilizzata con PBS_{BSA} e NaN_3 0.02% alla concentrazione di 50 mg/ml.

Si preparano inoltre le soluzioni di ribosio 0,1 M e di amminoguanidina 25 mM (controllo positivo). Successivamente si preparano le soluzioni di acido rosmarinico, acido caffeico e luteolina studiate in un intervallo di concentrazioni tra 10 μM e 250 μM .

La lettura della fluorescenza è stata effettuata con uno spettrofotometro Multiplate Reader VictorNivo (*PerkinElmer*) ad una lunghezza d'onda di eccitazione di 355 nm e lunghezza d'onda di emissione di 460 nm ($Z\text{-Focus} = 1.3$). La lettura della fluorescenza è stata effettuata dopo due, cinque, sette, nove giorni di incubazione a 37 °C. La lettura della fluorescenza è stata anche effettuata impiegando la determinazione Z-Focus Scan.

Elaborazione dei dati

La glicazione è stata espressa come percentuale mediante la formula:

$$\% \text{ Glicazione} = \frac{\text{Fluorescenza con campione}}{\text{Fluorescenza massima del controllo}} \times 100$$

3.5. Progetto Wikipedia

Il Progetto Wikipedia ha previsto l'aggiornamento della voce "Acido rosmarinico" in Wikipedia italiana https://it.wikipedia.org/wiki/Acido_rosmarinico.

In primo luogo è stato svolto un lavoro di ricerca bibliografica e valutazione delle fonti: le informazioni sono state ricavate da articoli scientifici raccolti in PubMed e Scopus. Tale ricerca bibliografica ha aiutato la stesura di questo elaborato ma anche nello svolgimento del progetto. La prima operazione effettuata è stata quella di creare un account Wikipedia e di ricopiare il testo della voce "Acido rosmarinico", già esistente nell'enciclopedia in forma di abbozzo, nella pagina delle bozze personale (*Sandbox*). Ciò ha consentito di effettuare modifiche e aggiunte del testo senza scrivere direttamente nello spazio principale che ospita le voci.

Durante la stesura della voce, ogni modifica prevede un salvataggio che deve essere giustificato nell'oggetto della stessa e che può essere segnalato agli osservati speciali, oppure la modifica può essere salvata direttamente se si tratta di una variazione minore (*Cronologia Sandbox*). La voce è stata costruita seguendo paragrafi che caratterizzano nel generale l'acido rosmarinico: accenni di chimica e la sua biosintesi, la distribuzione nel regno delle Piante, la farmacocinetica e le attività biologiche che la molecola può avere in base agli studi pubblicati. Successivamente, la stesura del testo, dell'aggiunta dei *wikilink* e dei riferimenti bibliografici correlati, si è proceduto alla sovrascrittura e pubblicazione nella pagina già presente, in modo da rendere visibile la nuova stesura della voce a chiunque ricerchi il termine o le voci ad esso correlato (*Acido Rosmarinico - Wikipedia*).

4. ANALISI STATISTICA

I dati sperimentali sono espressi come media \pm SEM dei risultati ottenuti da un numero di esperimenti compreso tra 3 e 18. L'elaborazione dei dati è stata eseguita mediante l'uso di *Microsoft Excel* e il software *GraphPad Prism 6.01*, che è stato utilizzato anche per l'analisi statistica tramite il *t-Student*, ritenendo significativi i dati sperimentali con livello di significatività $p < 0.05$.

Grafici e tabelle di questo elaborato sono stati ottenuti con i software *GraphPad Prism 6.01* e *Microsoft Excel*.

5. RISULTATI

5.1. α -glucosidasi assay

Per valutare l'utilizzo di acido rosmarinico, luteolina, acido caffeico e acido clorogenico come molecole con potenziale attività ipoglicemizzante è stato effettuato il test colorimetrico dell'inibizione dell'enzima α -glucosidasi.

Le curve cinetiche di assorbanza di ogni concentrazione dei composti sperimentati sono state confrontate con la curva di controllo dell'attività massima dell'enzima e con la curva dell'attività enzimatica in presenza di acarbosio (controllo positivo).

Per quanto riguarda l'acido rosmarinico e l'acido clorogenico i risultati non hanno evidenziato un'attività promettente. Dalle curve cinetiche di assorbanza si estrapola la media nel tempo e successivamente si esprimono i risultati calcolando l'attività enzimatica.

La Figura 15 riporta i valori dell'attività enzimatica in presenza di acido rosmarinico e acido clorogenico, posti in confronto con l'acarbosio e con l'attività massima dell'enzima (0.05 U/ml).

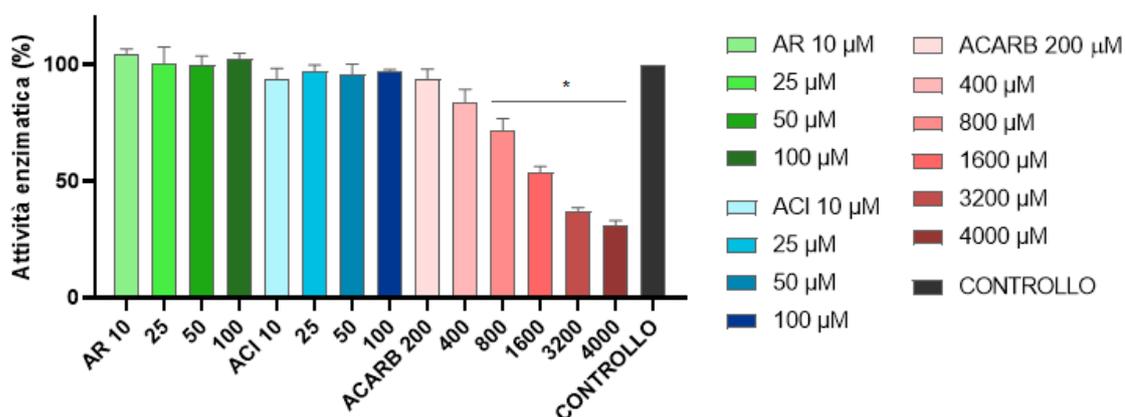


Figura 15: Attività enzimatica espressa in percentuale di acido rosmarinico (AR), acido clorogenico (ACI) e acarbosio (ACARB) alle diverse concentrazioni. I dati sono espressi come media \pm SEM con $n = 3$ esperimenti. * $p < 0.05$ acarbosio vs controllo.

I risultati ottenuti evidenziano che l'acido rosmarinico, alle concentrazioni considerate, non ha alcuna attività di inibizione sull' α -glucosidasi, difatti l'attività dell'enzima è massima nonostante il trattamento.

Lo stesso comportamento è dato dall'acido clorogenico, seppur l'attività enzimatica diminuisce lievemente. Il confronto dell'andamento generale dell'attività enzimatica in presenza di acido clorogenico o acido rosmarinico, con l'attività di acarbosio rivela come solo il controllo positivo (acarbosio) espliciti una significativa inibizione concentrazione-dipendente (Figura 15).

In Figura 16 sono rappresentate le curve cinetiche di assorbanza dell' α -glucosidasi in presenza di diverse concentrazioni di acido caffeico (AC), poste a confronto con il controllo positivo (acarbosio 1600 μ M).

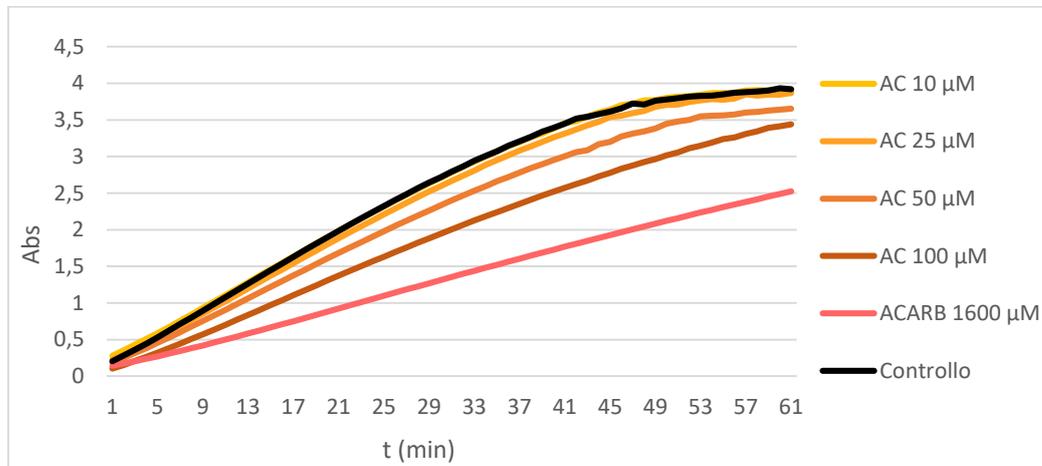


Figura 16: Curva cinetica dell'attività enzimatica in presenza di diverse concentrazioni di acido caffeico (AC) a confronto con il controllo positivo (Acarbosio: ACARB).

Si può notare come l'acido caffeico inibisca solo in modesta misura l'attività enzimatica massima; una sensibile inibizione si presenta solo con la concentrazione di acido caffeico di 100 μ M.

In Figura 17 è rappresentata l'attività enzimatica espressa in percentuale in presenza di acido caffeico, in confronto con il trattamento effettuato con l'acarbosio.

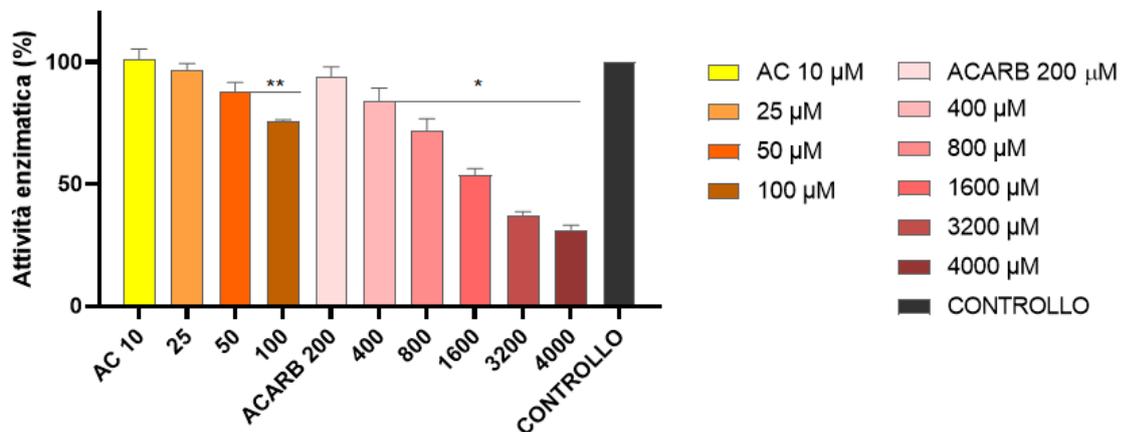


Figura 17: Attività enzimatica espressa in percentuale in presenza di acido caffeico (AC) e acarbosio (ACARB) alle diverse concentrazioni impiegate nella sperimentazione. I valori sono espressi come media \pm SEM con n=3 esperimenti. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ acido caffeico o acarbosio vs controllo.

L'acido caffeico esercita una debole attività inibitoria sull'enzima α -glucosidasi alle concentrazioni impiegate. In dettaglio, si può osservare che l'acido caffeico 100 μ M ha un'attività inibitoria simile a quella dell'acarbosio 800 μ M, pari a circa il 25% del controllo.

Il saggio è stato poi effettuato con concentrazioni di enzima crescenti, anche in presenza di luteolina e acarbiosio; in Figura 18 è mostrato l'andamento della cinetica enzimatica con uguale concentrazione di substrato ma diverse concentrazioni di α -glucosidasi.

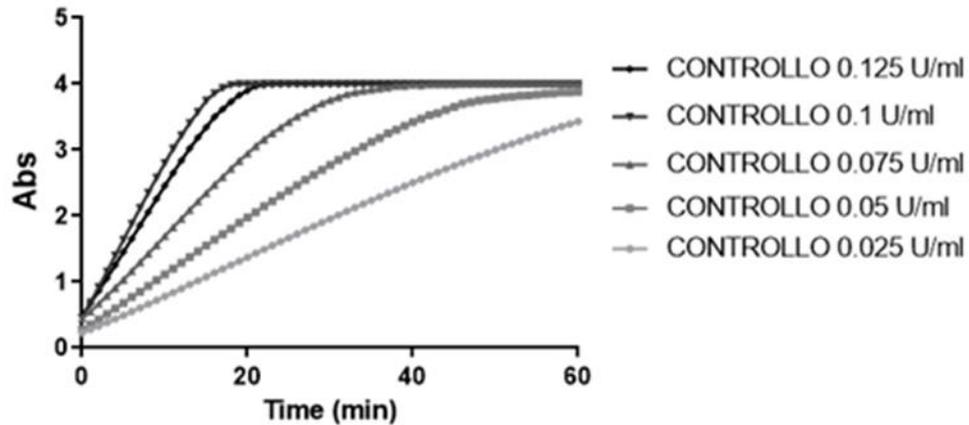


Figura 18: Andamento della cinetica enzimatica in condizioni di controllo a diverse concentrazioni dell'enzima α -glucosidasi mantenendo costante la concentrazione di substrato.

Si nota come al crescere della concentrazione di enzima, le curve di assorbanza si spostano verso sinistra. Questo è un comportamento prevedibile dato che la reazione enzimatica tra α -glucosidasi e p -NPG è più veloce a una concentrazione superiore di enzima; infatti, una medesima quantità di substrato viene idrolizzato più velocemente e il massimo dell'azione enzimatica viene raggiunto in un tempo minore. Quando si impiega l'enzima α -glucosidasi alla concentrazione 0.05 U/ml il plateau è raggiunto dopo circa 40 minuti, mentre con l'enzima alla concentrazione di 0.075 U/ml la reazione termina dopo soli 30 minuti.

Alle diverse concentrazioni di enzima si è determinata l'inibizione della luteolina (Figura 19).

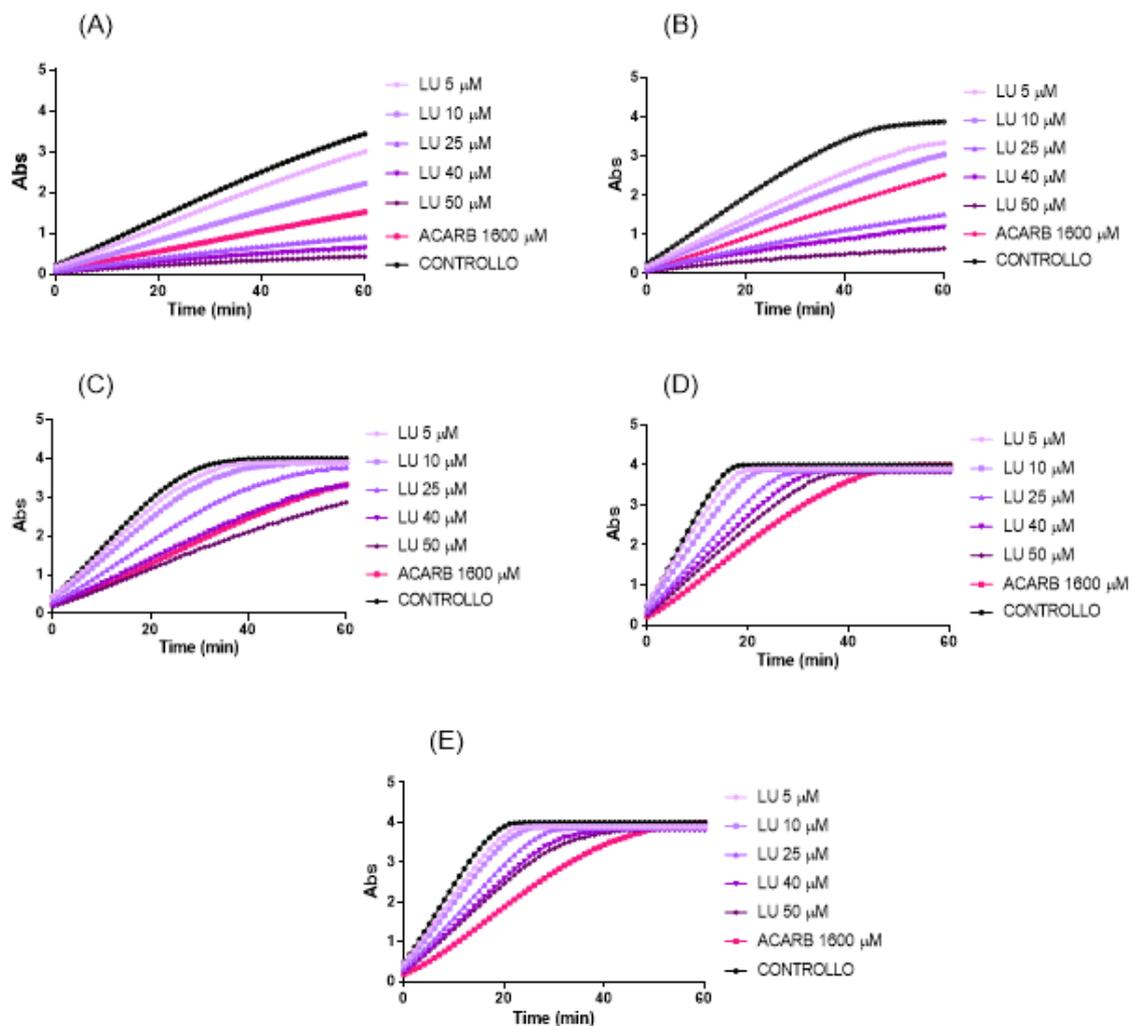


Figura 19: Curve cinetiche dell'attività enzimatica in presenza di diverse concentrazioni di luteolina (LU) e acarbiosio (ACARB) 1600 μM , con: (A) 0.025 U/ml, (B) 0.05 U/ml, (C) 0.75 U/ml, (D) 0.1 U/ml, (E) 0.125 U/ml di α -glucosidasi.

Dai risultati ottenuti si evidenzia che l'attività di inibizione della luteolina si mantiene al variare della concentrazione di enzima e l'entità dell'inibizione è correlata all'aumentata concentrazione di luteolina: al crescere di essa, aumenta anche l'inibizione diminuendo l'attività dell'enzima. Difatti la concentrazione 50 μM inibisce maggiormente rispetto alle altre.

Tuttavia, si può anche osservare che maggiore è la concentrazione di enzima minore risulta l'inibizione da parte della molecola; infatti, con α -glucosidasi 0.025 U/ml la luteolina 50 μM inibisce pressoché completamente la reazione, mentre, con l'enzima alla concentrazione di 0.125 U/ml, la luteolina 50 μM ha un'azione inibitoria molto minore. Quindi maggiore è la concentrazione di enzima, inferiore sarà l'effetto del trattamento effettuato.

Il comportamento della luteolina può essere posto a confronto con l'attività dell'acarbosio (controllo positivo) (Figura 20).

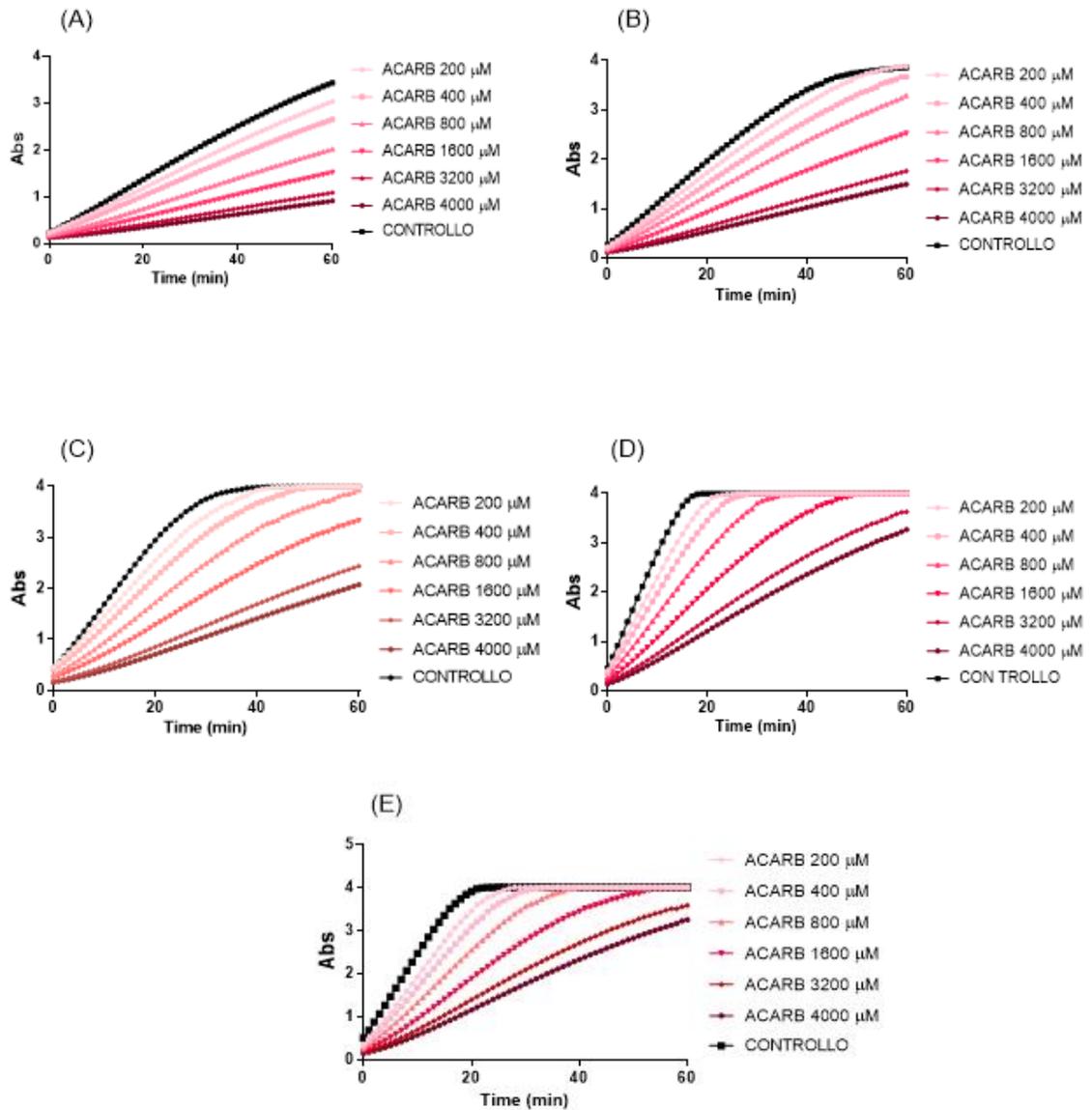


Figura 20: Curve cinetiche dell'attività enzimatica in presenza di diverse concentrazioni di acarbosio (ACARB) con diverse concentrazioni di α -glucosidasi: (A) 0.025 U/ml, (B) 0.05 U/ml, (C) 0.75 U/ml, (D) 0.1 U/ml, (E) 0.125 U/ml.

Il saggio è stato successivamente effettuato a diverse concentrazioni di *p*-NPG (substrato) ma uguale concentrazione di α -glucosidasi (0.075 U/ml) in presenza sia di luteolina che acarbosio. Le concentrazioni di substrato sperimentate sono state 2 mM, 1 mM, 0.5 mM e 0.25 mM.

In Figura 21 si nota come al diminuire della concentrazione di substrato, ma mantenendo uguale la concentrazione di enzima, diminuisce l'assorbanza; infatti, essendo minore la concentrazione di substrato si formerà meno prodotto quindi si determinerà una minore assorbanza. Si osserva inoltre che diminuendo la concentrazione di *p*-NPG, l'enzima raggiunge in tempi più brevi la fase di plateau. Difatti, il plateau della reazione enzimatica con 2 mM di substrato è raggiunto a circa 25 minuti, invece il plateau della cinetica enzimatica con 0.25 mM di *p*-NPG viene raggiunto già dopo circa 10 minuti.

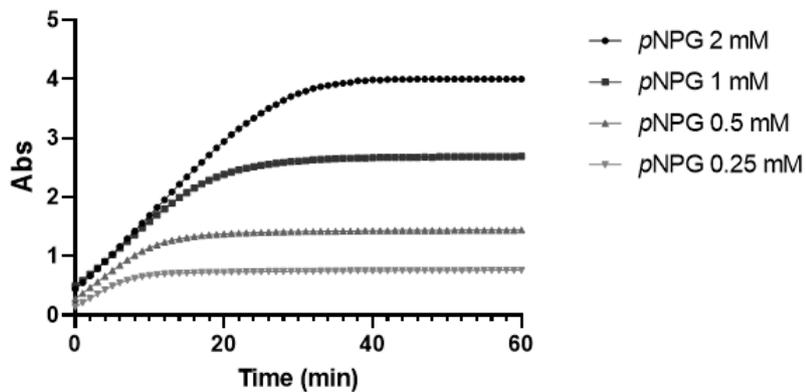


Figura 21: Curve cinetiche dell'attività enzimatica in presenza di *p*-NPG a diverse concentrazioni.

Le Figure sottostanti mostrano l'andamento della reazione tra α -glucosidasi alle differenti concentrazioni di substrato in presenza di luteolina (Figura 22) e acarbosio (Figura 23).

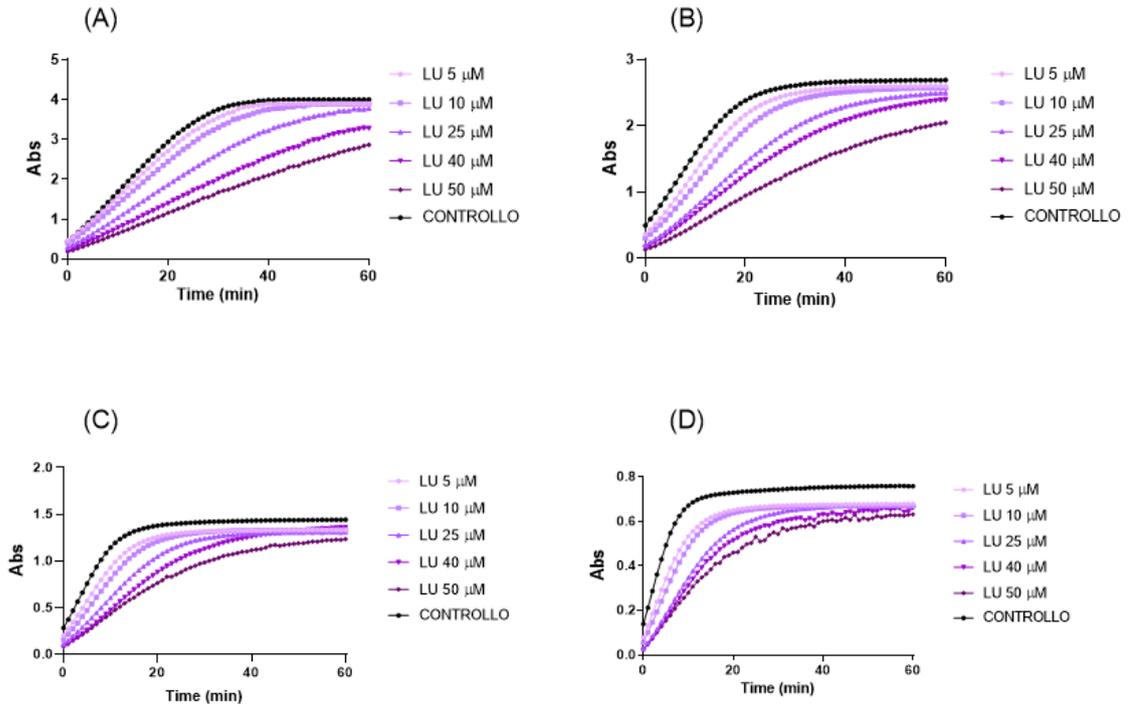


Figura 22: Curve cinetiche dell'attività enzimatica in presenza di diverse concentrazioni di luteolina (LU) con diverse concentrazioni di p-NPG: (A) 2 mM, (B) 1 mM, (C) 0.5 mM, (D) 0.25 mM.

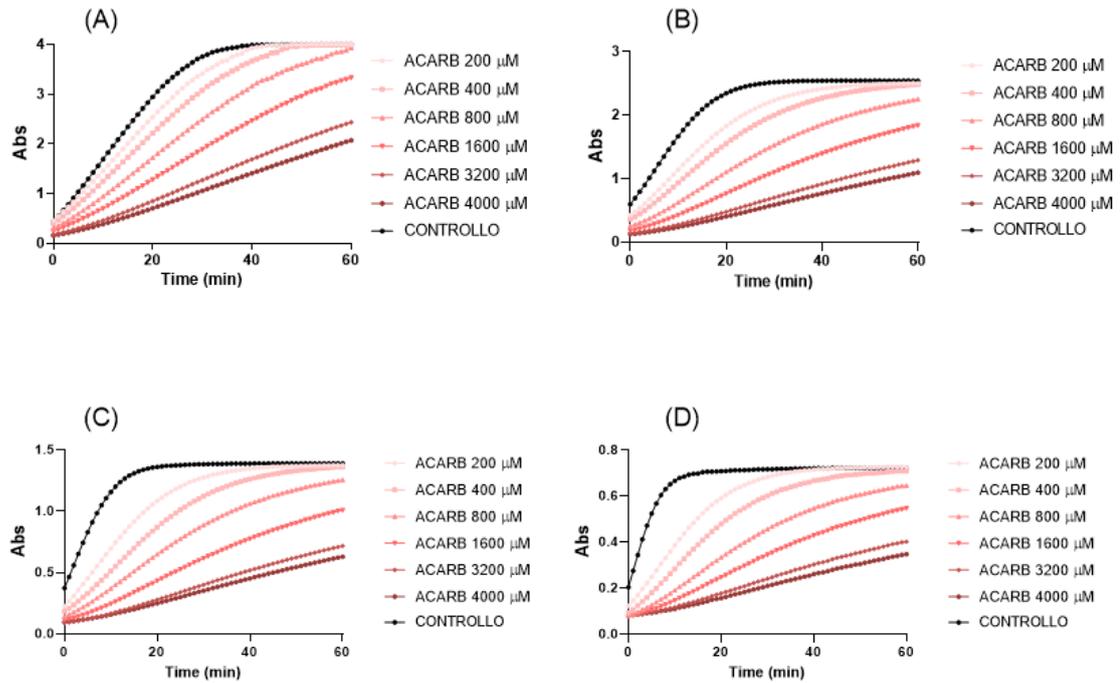


Figura 23: Curve cinetiche dell'attività enzimatica in presenza di diverse concentrazioni di acarbosio (ACARB) con diverse concentrazioni di p-NPG: (A) 2 mM, (B) 1 mM, (C) 0.5 mM, (D) 0.25 mM.

Per quanto riguarda la luteolina, dai grafici si evince che, seppur diminuendo la concentrazione di substrato, essa mantiene lo stesso grado di inibizione enzimatica. Infatti, la luteolina 50 μM segue l'andamento della cinetica enzimatica del controllo, ma mantiene la medesima inibizione in ogni grafico considerato.

Diversamente dal comportamento dell'acarbosio che, al contrario, al diminuire della concentrazione di substrato, esplica una maggiore inibizione: minore è la concentrazione di *p*-NPG, migliore è l'azione inibitoria delle varie concentrazioni di acarbosio.

Per effettuare l'elaborazione finale è stata considerata in particolare la condizione sperimentale con α -glucosidasi alla concentrazione di 0.05 U/ml e *p*-NPG 2 mM, (Figura 24).

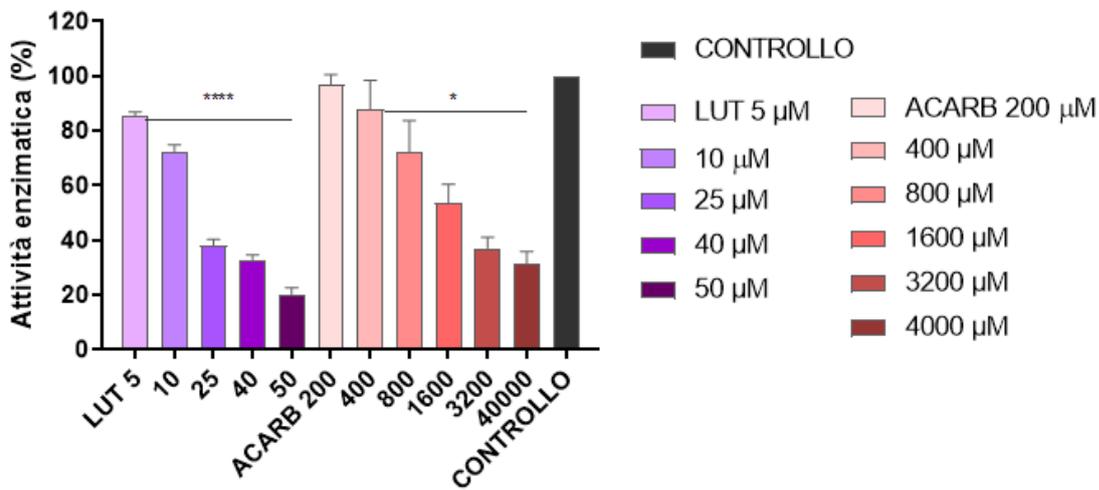


Figura 24: Attività enzimatica (%) in presenza di luteolina e acarbosio alle diverse concentrazioni. I dati sono espressi come media \pm SEM. **** $p < 0.0001$, * $p < 0.05$ luteolina o acarbosio vs controllo.

La luteolina inibisce significativamente l'azione dell'enzima con un andamento crescente in relazione alla concentrazione. L'attività anti- α -glucosidasi può essere confrontata con quella ottenuta mediante l'acarbosio, noto farmaco utilizzato in terapia.

Complessivamente, dall'insieme dei dati ottenuti in questo lavoro di ricerca, si evince che la luteolina ha una forte attività inibitoria nei confronti dell' α -glucosidasi, infatti, a parità di concentrazione dei composti studiati, l'inibizione è sicuramente maggiore per la luteolina 50 μM che provoca l'80% di inibizione, nettamente superiore a quella dell'acido caffeico alla stessa concentrazione (12% di inibizione).

5.2. ORAC assay

Il saggio *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC assay) è un metodo fluorimetrico che consente di determinare se i composti in esame hanno capacità antiossidante interferendo con i processi ossidativi indotti dai radicali, tramite meccanismo di trasferimento di atomi di idrogeno (*Hydrogen Atom Transfer – HAT*). L'attività antiossidante è proporzionale al rallentamento della decadenza della fluorescenza (in presenza di un generatore di radicali).

Per verificare la capacità antiossidante è necessario costruire una retta di taratura grazie al Trolox, il cui comportamento, alle diverse concentrazioni, in presenza di AAPH è rappresentato in Figura 25 e in Figura 26.

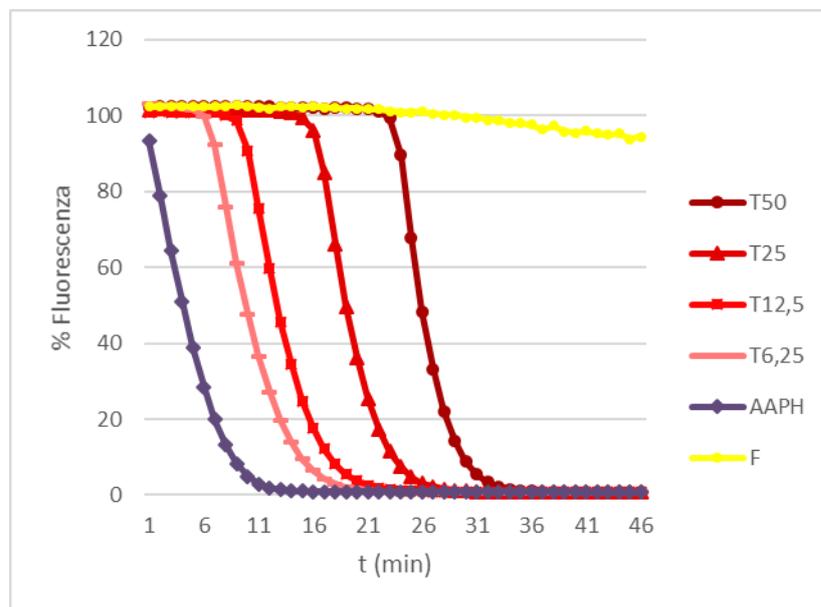


Figura 25: Andamento della decadenza di fluorescenza in presenza di AAPH e Trolox a diverse concentrazioni. T50: Trolox 50 μM , T25: Trolox 25 μM , T12.5: Trolox 12.5 μM , T6.25: Trolox 6.25 μM .

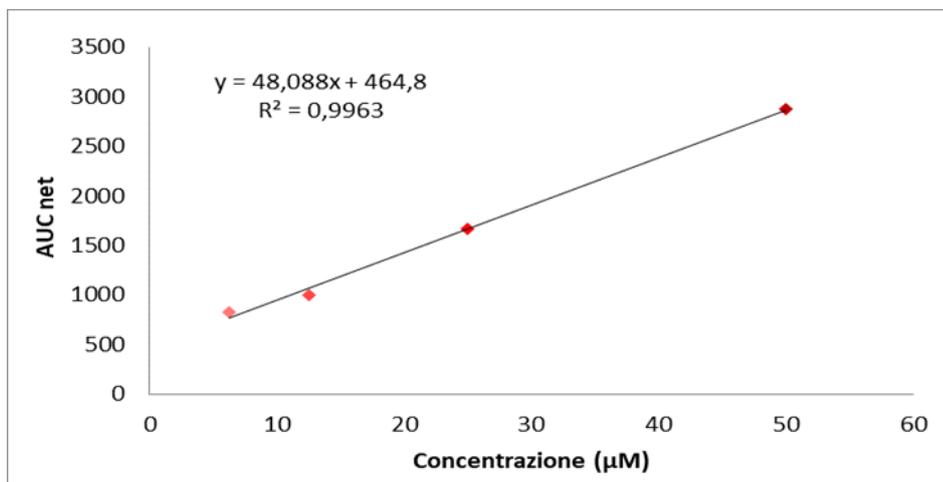


Figura 26: Esempio di retta di taratura del Trolox nel saggio ORAC.

Per quanto riguarda i composti isolati studiati in questo lavoro di ricerca: acido rosmarinico, acido caffeico, acido clorogenico e luteolina, sono state calcolate le AUC nette e, mediante l'interpolazione dei valori ottenuti con la retta di taratura, sono stati calcolati i valori TEAC (Figura 27).

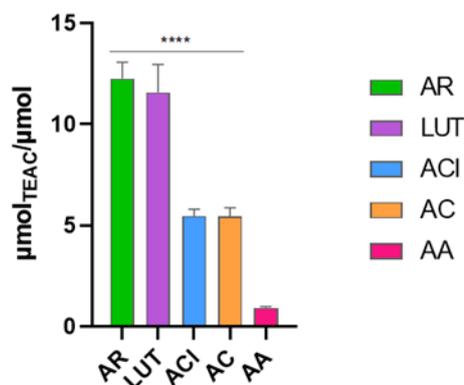


Figura 27: Profilo dell'attività antiossidante espressa in $\mu\text{mol}_{\text{TEAC}}/\mu\text{mol}$ campione di acido rosmarinico (AR), luteolina (LUT), acido clorogenico (ACI), acido caffeico (AC) e acido ascorbico (AA). I valori sono espressi come media \pm SEM di 5 esperimenti. **** $p < 0.0001$ acido rosmarinico, luteolina, acido caffeico, acido clorogenico vs acido ascorbico.

Dai dati ottenuti possiamo dedurre che l'acido caffeico, l'acido rosmarinico e l'acido clorogenico hanno una significativa attività antiossidante. Se confrontata con quella dell'acido ascorbico (composto di riferimento, con un valore di $0.91 \mu\text{mol}_{\text{TEAC}}/\mu\text{mol}$), tutti e tre i composti evidenziano un'attività decisamente più elevata.

Si evince una netta differenza di capacità antiossidante tra l'acido rosmarinico e acido clorogenico, che presenta l'attività minore, pari a $5.11 \mu\text{mol}_{\text{TEAC}}/\mu\text{mol}$, rispetto a $13.30 \mu\text{mol}_{\text{TEAC}}/\mu\text{mol}$ dell'acido rosmarinico.

Per quanto riguarda la luteolina, dato precedentemente ottenuto in laboratorio, ha un valore TEAC simile a quello dell'acido rosmarinico. Si osserva inoltre che l'acido caffeico e l'acido clorogenico esplicano un'attività tra loro confrontabile.

5.3. BSA assay

Per valutare l'attività antiglicativa di acido rosmarinico, acido caffeico e luteolina è stato effettuato il *BSA assay*, un saggio che prevede la misura della fluorescenza emessa nel tempo dagli AGEs, prodotti della reazione tra ribosio e BSA in presenza dei composti studiati.

La lettura della fluorescenza è stata effettuata dopo due, cinque, sette e nove giorni di incubazione. Come controllo positivo è stata utilizzata l'aminoguanidina 25 mM, che è in grado di prevenire la formazione di AGEs grazie alla reattività dei suoi gruppi nucleofili (Edelstein & Brownlee, 1992; Thornalley, 2003).

Nella Figura 28 è stata rappresentata la misura della fluorescenza della glicazione massima tra BSA e ribosio (controllo).

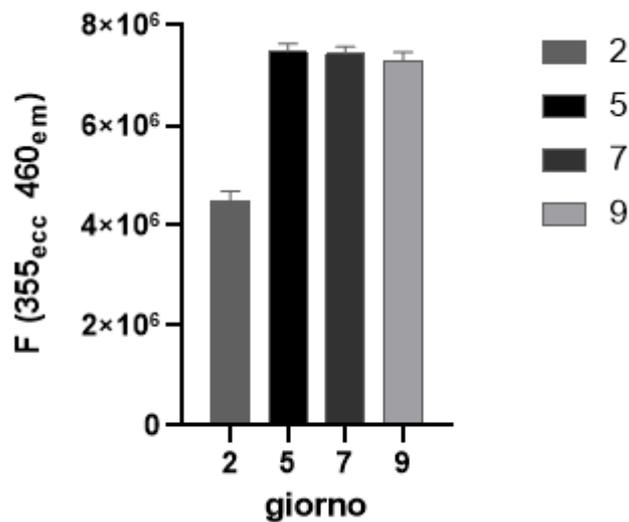


Figura 28: Glicazione massima nel tempo. I valori sono espressi come media \pm SEM di n=9 esperimenti

Si osserva che la glicazione massimale comincia ad aumentare nel secondo giorno di lettura ma il massimo si ottiene nei giorni 5 (di poco superiore) e 7, la reazione di glicazione inizia a diminuire al giorno 9.

Definito il *range* di tempo ottimale per valutare l'attività antiglicativa dei composti, è stato possibile studiare e confrontare i profili di glicazione (e quindi di inibizione di tale reazione) dei singoli composti studiati, in funzione della loro concentrazione. Si è infatti deciso di valutare solo i dati dei giorni 5 e 7, per osservare l'attività dei composti al massimo grado di glicazione.

Dal grafico in Figura 29 si osserva come tutti i composti studiati hanno attività antiglicativa, con gradi diversi.

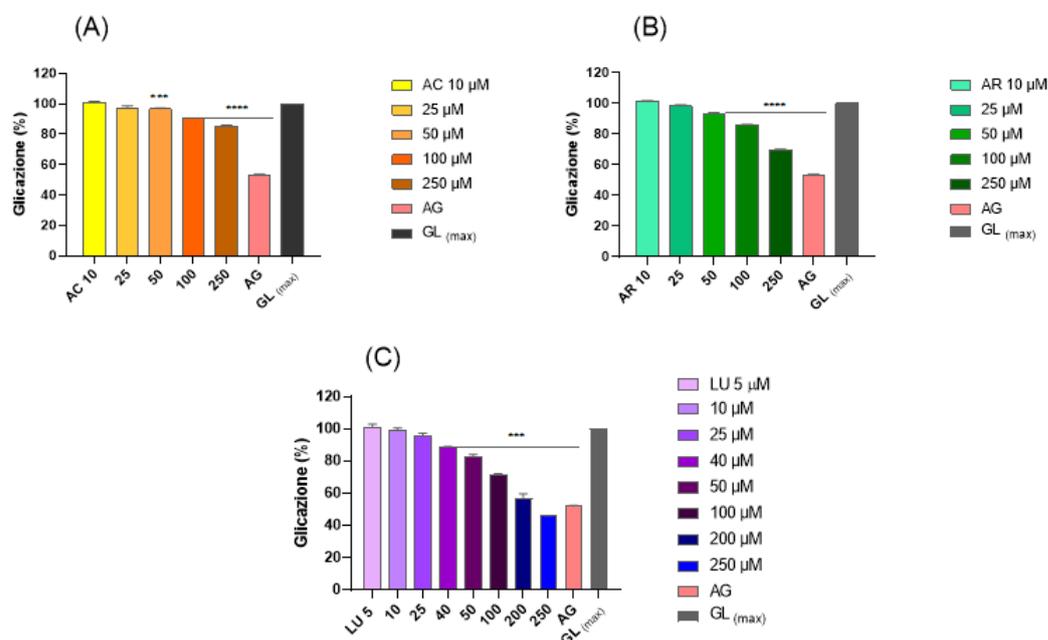


Figura 29: Glicazione espressa in percentuale dopo 5 giorni di incubazione con BSA e ribosio in presenza di (A) acido caffeico (AC), (B) acido rosmarinico (AR), (C) luteolina (LU) e aminoguanidina (AG).

I valori sono espressi come media \pm SEM con $n = 3$ esperimenti *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ trattamento vs controllo.

Si osserva che tutti i composti hanno un'attività dose-dipendente e si assiste a un effetto inibitorio sempre più rilevante, misurabile come riduzione della percentuale di glicazione. Inoltre acido caffeico e acido rosmarinico hanno attività simile: quasi nulla alle più basse concentrazioni e maggiore alle concentrazioni 100 μ M e 250 μ M. L'acido rosmarinico inibisce poco di più dell'acido caffeico, infatti la concentrazione 250 μ M porta la glicazione al 70% mentre la stessa concentrazione di acido caffeico all'85%. Per quanto riguarda la luteolina è, tra i composti studiati, quello a maggior attività. Infatti, la glicazione diminuisce decisamente all'aumentare della concentrazione, iniziando alla concentrazione 40 μ M e risultando la metà alle concentrazioni 200 μ M e 250 μ M, fino a raggiungere e superare l'attività inibitoria dell'aminoguanidina.

La stessa lettura è stata effettuata dopo 7 giorni di incubazione e le percentuali di glicazione rimangono pressoché invariate, come dimostra la Figura 30.

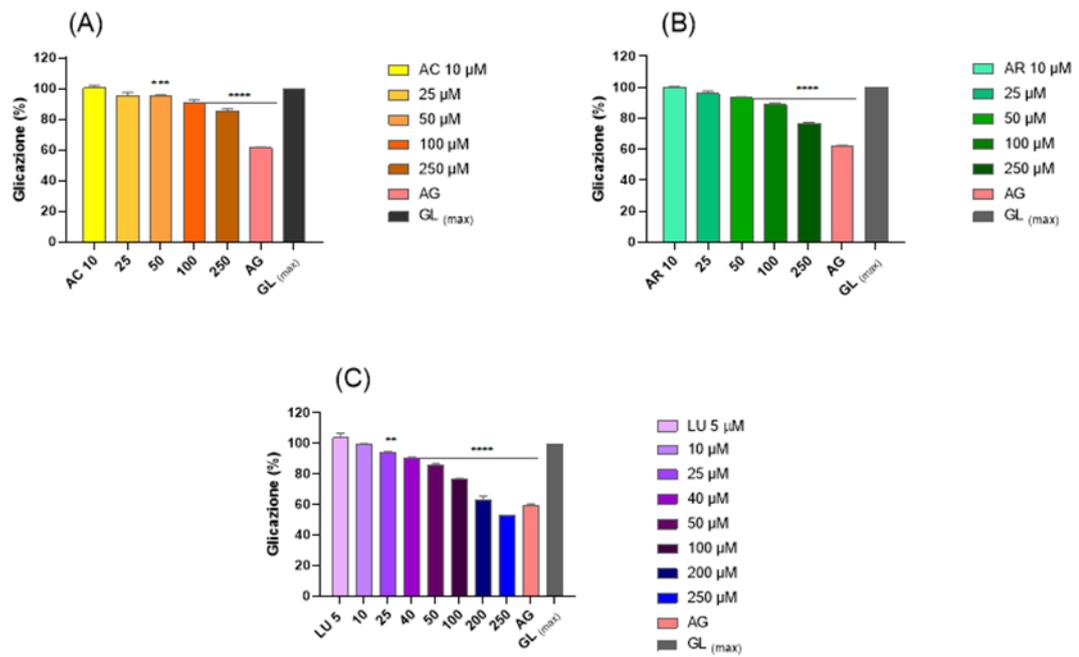


Figura 30: Glicazione espressa in percentuale dopo 7 giorni di incubazione con BSA e ribosio in presenza di (A) acido caffeico (AC), (B) acido rosmarinico (AR), (C) luteolina (LU) e aminoguanidina (AG). I valori sono espressi come media \pm SEM di $n = 3$ esperimenti. *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ trattamento vs controllo.

In Figura 31 è rappresentata la lettura della fluorescenza al giorno 5 in relazione allo Z-Focus, parametro riportato sull'asse delle ascisse.

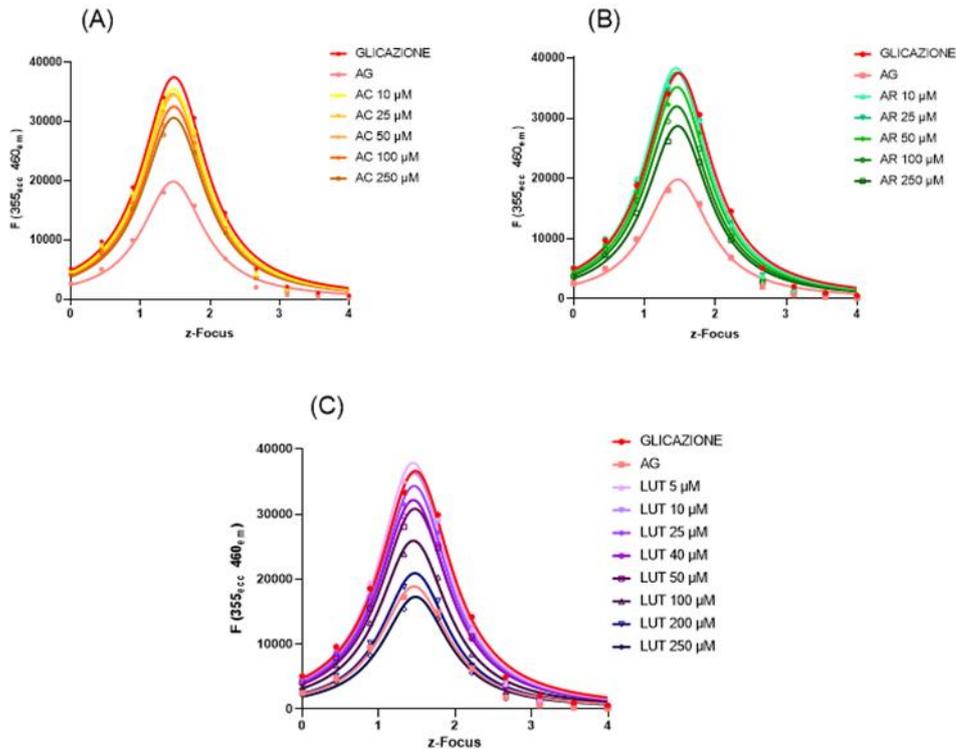


Figura 31: Fluorescenza degli AGEs formati dalla reazione tra BSA e ribosio dopo 5 giorni di incubazione, in presenza di (A) acido caffeico (AC), (B) acido rosmarinico (AR) e (C) luteolina (LUT) e aminoguanidina (AG).

Al variare del parametro Z-Focus varia anche la fluorescenza registrata. La migliore registrazione si ottiene con Z-Focus tra 1.3 e 1.7. Si può osservare che la glicazione massima diminuisce all'aumentare della concentrazione del composto. L'inibizione è maggiore per la luteolina, la cui curva alla concentrazione di 200 μM è simile a quella dell'aminoguanidina, mentre le concentrazioni minori di tutti i composti studiati non diminuiscono la fluorescenza massima.

5.4. Progetto Wikipedia

L'aggiornamento della voce in Wikipedia italiana "Acido rosmarinico" ha previsto l'utilizzo della Sandbox personale come pagina di bozze per la scrittura del testo. Nel tempo è stata implementata di informazioni, fino al 12 novembre 2020 in cui tutto il testo e le immagini presenti nella Sandbox sono state sovrascritte nella pagina effettivamente già presente in Wikipedia.

In Figura 32 e Figura 33 è mostrato il confronto tra la voce "Acido rosmarinico" precedentemente presente (11 novembre 2020), con ultima modifica il 6 agosto 2020 eseguita da altro utente, e come si presenta ora, dopo la pubblicazione del lavoro effettuato (*Cronologia Acido Rosmarinico - Wikipedia*).

The screenshot shows the Wikipedia article for "Acido rosmarinico" as of November 11, 2020. The page layout includes a left sidebar with navigation options, a main content area with the article text and a "Note" section, and a right sidebar with a detailed chemical information table. The article text describes it as a polyphenolic acid found in plants like rosemary and sage. The chemical structure is shown as a 3,4-dihydroxyphenylprop-2-enoic acid derivative. The table on the right lists various identifiers and properties.

Acido rosmarinico	
Nome IUPAC	acido 3-(3,4-diidrossifenil)-2-prop-1-enoilpropanoico
Nomi alternativi	acido rosmarinico
Caratteristiche generali	
Formula	C ₁₈ H ₁₆ O ₈
Intra o molecolare	
Massa molecolare (u)	360,31
Aspetto	solido giallo-arancio
Numero CAS	20283-92-5
EINECS	606-487-1
PubChem	5281792
SMILES	C1=CC(=C(C=C1)C(=O)O)C=C(C=C2)C(=O)O
Proprietà chimico-fisiche	
Densità (g/cm³, in c.s.)	0,91
Temperatura di fusione	171 °C (444 K)
Indicazioni di sicurezza	
Frase H	---
Consigli P	---

Figura 32: Voce "Acido rosmarinico" precedente, in data 11 novembre 2020.

Acido rosmarinico

Da Wikipedia, l'enciclopedia libera.

L'**acido rosmarinico** è un acido polifenolico, correlato alla struttura dell'**acido caffeico**.

Per la prima volta è stato isolato dal *Rosmarinus officinalis* L. nel 1958 da Scarpati e Oriente^[2], successivamente è stato identificato in piante della famiglia delle **Lamiaceae** e nella sottofamiglia delle **Nepetoideae** (appartenente alla famiglia delle **Boraginaceae**)^[3].

Indice [nascondi]	
1	Chimica
1.1	Solubilità
1.2	Sintesi
1.3	Derivati
1.4	Trasporto
2	Distribuzione nelle piante
2.1	Espressione degli enzimi ^[5]
2.2	Presenza nel regno delle Piante ^[5]
3	Assorbimento, metabolismo ed escrezione
4	Attività biologiche
4.1	Effetto antimicrobico
4.2	Effetti immunomodulatori
4.3	Effetti antinfiammatori e analgesici
4.4	Effetto antitumorale
4.5	Antiossidante
4.6	Effetto antidiabetico
4.7	Effetto neuroprotettivo e anti-Alzheimer
5	Tossicità
6	Note
7	Bibliografia
8	Voci correlate
9	Collegamenti esterni

Chimica [modifica | modifica wikitesto]

L'acido rosmarinico è considerato l'estere tra l'acido caffeico e il gruppo alcolico in posizione α dell'acido 3,4-diidrossifenil lattico^[3].

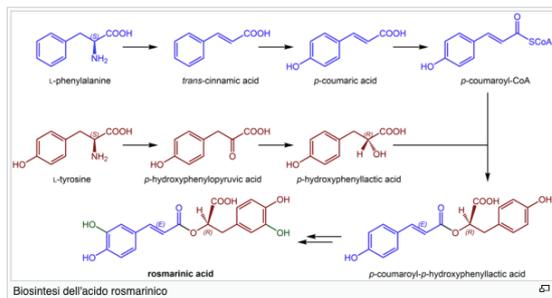
Solubilità [modifica | modifica wikitesto]

L'acido rosmarinico è molto lipofilo e per questo la sua solubilità in acqua è limitata; risulta invece molto solubile in solventi organici^[4].

Sintesi [modifica | modifica wikitesto]

La molecola di acido rosmarinico, diversamente da quanto riportato spesso in letteratura, non si forma dall'unione di due molecole di acido caffeico ma deriva dai due amminoacidi aromatici **tirosina** e **fenilalanina**. Quest'ultima segue la via dei fenilpropanoidi mediante tre passaggi catalizzati in successione dai seguenti enzimi: la fenilalanina ammoniaca liasi (**PAL**), l'acido cinnamico 4-idrossilasi (**C4H**) e l'acido 4-cumarico CoA-ligasi (**4CL**) che trasformano la fenilalanina in **4-cumaril-CoA**. La L-tirosina invece è trasformata in 4-idrossi fenilpiruvato (**pHPP**) dalla tirosina ammino-transferasi (**TAT**) dipendente dal **piridossalfosfato**. Il pHPP è poi ridotto dalla 4-idrossifenilpiruvato reductasi (**HPPR**) a D-4-idrossifenilattato (**pHPL**) utilizzando **NADH**^[5].

A questo punto interviene l'acido rosmarinico sintasi (**RAS**), cioè una idrossicinnamoli transferasi, che si occupa di trasferire la frazione 4-cumaril dal 4-cumaril-CoA al gruppo OH allilatico di pHPL, rilasciando CoA, e ottenendo 4-cumaril-4'-idrossifenilattato (**pC-pHPL**). Le ultime fasi biosintetiche prevedono l'introduzione di gruppi OH nelle posizioni 3 e 3' della molecola, arrivando quindi al prodotto finale che è l'acido rosmarinico^[5].



Derivati [modifica | modifica wikitesto]

Tra i derivati di questa molecola ci sono tantissimi composti che contengono una o più molecole di acido rosmarinico e altre frazioni aromatiche, tra i più importanti ci sono l'**acido litospermico**, formato dall'unione di acido rosmarinico e acido caffeico, e l'**acido litospermico B**, dimero dell'acido rosmarinico^[6].

Trasporto [modifica | modifica wikitesto]

L'acido rosmarinico, dopo la sua sintesi, viene immagazzinato in vacuoli intracellulari presenti nelle cellule delle piante^[5].

Acido rosmarinico	
Nome IUPAC	
acido 3-(3,4-diidrossifenil)-2R-[(3-(3,4-diidrossifenil)prop-2E-enil)ossi]propanoico	
Nomi alternativi	
Acido Rosmarinico, Rosmarinato	
Caratteristiche generali	
Formula bruta o molecolare	C18H16O8
Massa molecolare (u)	360,31 g·mol ⁻¹
Aspetto	Solido giallo-arancio
Numero CAS	537-15-5
Numero EINECS	606-487-1
PubChem	5281792
SMILES	C1=CC(=C(C=C1)OC(=O)C=C(C=C2)O)O)O
Proprietà chimico-fisiche	
Densità (g/cm³, in c.s.)	0,91
Densità (g/l, in c.s.)	1.547 g/cu cm
Costante di dissociazione acida (pKa a {{{Ka_temperatura}}})	3,57
Solubilità in acqua	bassa, molto solubile in solventi apolari
Coefficiente di ripartizione 1-ottanolo/acqua	1,82
Temperatura di fusione	171-175 °C (444 K)
Tensione di vapore (Pa) a {{{tensione_di_vapore_temperatura}}})	1.1X10-13 mm Hg a 25 °C
Indicazioni di sicurezza	
Consigli P	--- ^[1]
Modifica dati su Wikidata - Manuale	

Figura 33: Voce "Acido rosmarinico" implementata, in data 12 dicembre 2020 (parte 1).

Distribuzione nelle piante [modifica | modifica wikitesto]

Espressione degli enzimi ^[5] [modifica | modifica wikitesto]

Nel regno delle piante ci sono tantissime famiglie che esprimono i geni per gli enzimi necessari alla sintesi dell'acido rosmarinico, ad esempio l'enzima **PAL**, comunque necessario ad altre vie metaboliche, che si trova nelle Lamiaceae e tra queste è stato identificato in *Salvia miltiorrhiza*, *Perilla frutescens*, *Melissa officinalis*, *Agastache rugosa*. Di interesse anche la sua presenza nella famiglia delle Boraginaceae, ad esempio nelle specie *Arnebia euchroma* e *Lithospermum erythrorhizon*.

L'enzima **C4H** è abbondante nelle Lamiaceae ed è stato identificato in *Agastache rugosa* e *Salvia miltiorrhiza*; così come in *Arnebia euchroma* e *Lithospermum erythrorhizon* (entrambe della famiglia delle Boraginaceae).

Il gene dell'acido **4-cumarico CoA-ligasi** viene espresso nella *Salvia miltiorrhiza*, *Melissa officinalis*, *Agastache rugosa* (famiglia delle Lamiaceae), nella *Arnebia euchroma* e *Lithospermum erythrorhizon* (appartenenti alla famiglia delle Boraginaceae).

Gli enzimi **TAT** e **HPPR** sono espressi anche in altre due specie della famiglia delle Lamiaceae: *Perilla frutescens* e *Coleus blumei*, ma lo si ritrova anche, così come tutti gli altri enzimi della via, nella *Salvia miltiorrhiza*.

L'enzima **RAS** è presente nella famiglia Lamiaceae, in particolare nelle specie *Coleus blumei*, *Melissa officinalis*, *Lavandula angustifolia* e *Salvia miltiorrhiza*.

Presenza nel regno delle Piante ^[5] [modifica | modifica wikitesto]

L'acido rosmarinico è stato rilevato in diverse quantità in moltissime famiglie botaniche di seguito elencate.

<ul style="list-style-type: none">AnthocerotaceaeBlechnaceaeDennstaedtiaceaeChloranthaceae	<ul style="list-style-type: none">CyperaceaeCannaceaeMarantaceae	<ul style="list-style-type: none">CucurbitaceaeOnagraceaeMyrtaceaeSapindaceaeMalvaceaeBrassicaceaePortulacaceaeAmaranthaceaePolygonaceaeRubiaceaeLamiaceae (di cui fanno parte rosmarino, salvia, maggiorana, origano, timo, menta	<ul style="list-style-type: none">piperita e melissa)^[7]PlantaginaceaeAcanthaceaeScrophulariaceaeLinderniaceaeSolanaceaeBoraginaceaeAsteraceaeApiaceaeAraliaceaeDipsacaceae
---	--	--	--

Tra le monocotiledoni troviamo:

- Araceae
- Potamogetonaceae
- Zosteraceae
- Meliantaceae
- Iridaceae
- Poaceae

Le famiglie di piante eudicotiledoni che presentano l'acido rosmarinico sono:

- Crassulaceae
- Celastraceae
- Fabaceae
- Rosaceae
- Moraceae

Assorbimento, metabolismo ed escrezione [modifica | modifica wikitesto]

In uno studio clinico **randomizzato**, in aperto, con somministrazione di una singola dose di acido rosmarinico si è osservato che non ci sono differenze tra i due sessi nella **farmacocinetica** mentre l'**escrezione urinaria** risultò intorno al 20-25%^[8]. In un altro studio clinico, **cross-over**, si è evidenziato che la **concentrazione massima plasmatica** si ottiene dopo circa 30 minuti con un aumento contemporaneo di un metabolita metilato che raggiunge il picco dopo 2 ore. Si è inoltre osservato che il 75% dei metaboliti vengono escreti con le urine in circa 6 ore. Questi dati indicano che l'acido rosmarinico è rapidamente assorbito. Successivamente, si ha la formazione di derivati di coniugazione e metilazione che poi sono eliminati mediante escrezione urinaria^[9].

Attività biologiche [modifica | modifica wikitesto]

L'acido rosmarinico attualmente non ha utilizzi farmacologici, tuttavia sono state suggerite molteplici attività perlopiù non supportate da adeguati studi clinici. L'acido rosmarinico è un acido polifenolico e come la maggior parte dei composti fenolici è considerato un **antiossidante**. Si è inoltre evidenziato un possibile utilizzo come **antimicrobico**, **antielimitico**, **coccidiostatico**, dimostrando anche proprietà **antinfiammatorie**. Viene considerato uno stimolante del **sistema endocrino** e **immunitario**. Inoltre, stimola la secrezione degli enzimi digestivi e aumenta la motilità intestinale. Per quanto riguarda l'attività spermatica potrebbe aumentare la crescita e la produzione degli **spermatozoi**. È considerato anche un potenziale **antiallergico** e **antidiabetico**. Sono state anche suggerite attività **antiangiogenica**, **antitumorale** e **neuroprotettiva**^[4].

Effetto antimicrobico [modifica | modifica wikitesto]

L'attività antimicrobica di diversi estratti vegetali con diverse concentrazioni di acido rosmarinico è stata studiata evidenziando che estratti etanolici (al 5% di acido rosmarinico) hanno un'azione contro i **Gram positivi** e **negativi**, mentre quelli acquosi (al 15% di acido rosmarinico) presentano attività antimicrobiche modeste^[10]. Un altro studio ha dimostrato la capacità dell'acido rosmarinico di abbassare la carica virale e di inibire la crescita fungina^[11]. Viene anche dimostrata *in vitro* l'inibizione della formazione del **biofilm** dovuta al **quorum sensing**^[12]. Inoltre, si è osservato che l'acido rosmarinico può agire in sinergismo con alcuni antibiotici, come ad esempio la **vancomicina**, nel trattamento delle infezioni da *Staphylococcus aureus resistente* (MRSA)^[10].

Effetti immunomodulatori [modifica | modifica wikitesto]

Si suggerisce che l'acido rosmarinico, come anche altri polifenoli, possa modulare il **sistema immunitario**; a tale proposito, alcuni studi stanno cercando di valutare la sua utilità nel trattamento di alcune patologie autoimmuni^[4]. In particolare, si è visto che è in grado di aumentare alcuni indici immunitari, come l'**attività fagocitica**, e alcuni parametri biochimici ematici quali la conta dei **trigliceridi**, del **colesterolo** e delle **lipoproteine a bassa e alta densità**. Si è inoltre osservato che aumenta l'interleuchina **IL-10** e diminuisce alcuni fattori pro-infiammatori^[13].

Effetti antinfiammatori e analgesici [modifica | modifica wikitesto]

L'effetto antinfiammatorio principalmente è stato studiato sull'infiammazione indotta da *Propionibacterium acnes*; *in vitro* si è osservato la soppressione delle citochine pro-infiammatorie (**IL-8**, **IL-1β** e fattore di necrosi tumorale **TNF-α**) nel linea cellulare THP-1 monocitica. Inoltre, *in vitro* si è evidenziato l'attenuazione dell'infiammazione indotta sperimentalmente in un modello murino grazie alla soppressione del fattore nucleare kappa-B (**NF-κB**) e del **recettore Toll-like-2** (**TLR-2**)^[14]. Questo dato è stato anche confermato in un altro studio in cui si è osservato la diminuzione della concentrazione di **interferone γ**, **IL-6**, **IL-12** e **TNF-α** in animali infetti^[15]. È stato anche evidenziato un effetto antiallergico mediato dalla soppressione dell'attività infiammatoria con la diminuzione di **IgE** e **COX-2**^[4].

Per quanto riguarda l'effetto analgesico quest'ultimo è stato evidenziato in un modello sperimentale di **dolore neuropatico** del nervo sciatico^[16].

Effetto antitumorale [modifica | modifica wikitesto]

L'acido rosmarinico, per via dei suoi effetti antiossidanti, è proposto nella prevenzione e nel trattamento di numerose malattie. Dati preliminari *suggeriscono* che possa inibire lo sviluppo di tumori in molti organi come il colon, il fegato, lo stomaco e la mammella^[4]. In particolare, si è osservato in modelli sperimentali che l'acido rosmarinico inibisce AP-1, proteina responsabile dell'attivazione di **COX-2**^[17], i livelli di espressione della proteina **p65** e la proliferazione mediata da **NF-κB**^[18].

Antiossidante [modifica | modifica wikitesto]

Secondo uno studio *in vitro* effettuato nel 2015 l'acido rosmarinico presenta attività antiossidante, dimostrato da test quali il **DPPH assay** e il test dell'ossidazione del modello di liposoma di fosfolidocolina di soia, e si è rilevato anche un effetto sinergico con l'**α-tocoferolo**^[19]. In diversi studi *in vitro* è stato osservato che l'acido rosmarinico contrasta l'azione dei **ROS**, in quanto è in grado di eliminare il radicale DPPH libero mediante la donazione di elettroni: azione simile a quella di acido caffeico e **quercetina**^[20]. In altri studi effettuati da J.H.Chen e C.Ho, l'acido rosmarinico esplica una elevata attività antiossidante, soprattutto come scavenger dei radicali, con un meccanismo di **HAT (Hydrogen Atom Transfer)** perchè l'aggiunta del composto nello strutto ha allungato significativamente il tempo di induzione dell'ossidazione lipidica, oltretutto, sempre col il test del DPPH, l'acido rosmarinico ha dimostrato una fortissima attività antiossidante^[21]. Si è anche evidenziato che l'acido rosmarinico aumenta, nelle **cellule stellate epatiche** (HSCs), la sintesi di **GSH** e, partecipando all'inibizione dell'attività di **MMP-2** dipendente da **NF-κB**, aumenta anche l'espressione del **glutammato cisteina ligasi**^[22]. La somministrazione, in ratti albini, maschi, adulti, di **licopene** e acido rosmarinico ha ridotto l'azoto ureico nel sangue, la **malondialdeide renale** (MDA), l'espressione della **proteina proapoptica** (Bax), livelli inducibili di **ossido nitrico sintasi** (iNOS) e proteina marcatore autofagico (**LC3B**) indotti dalla **gentamicina**. Questa combinazione ha anche aumentato la **SOD** ridotta, l'espressione della proteina antiapoptica (**Bcl2**) e i livelli di **GPx** e **GSH**, oltretutto ha migliorato i cambiamenti istopatologici indotti dalla gentamicina^{[23][24]}. L'acido rosmarinico ha prevenuto lo stress ossidativo nelle **cellule gliali C6** aumentando la vitalità cellulare e inibendo la **perossidazione lipidica**, ha ridotto l'espressione di **COX-2** e **iNOS** indotta da **H₂O₂**. Inoltre ha aumentato l'espressione e l'attività di **CAT**, **SOD**, **eme ossigenasi-1** (**HO-1**) e del fattore di trascrizione **Nrf2**^[25].

Figura 33: Voce “Acido rosmarinico” implementata, in data 12 dicembre 2020 (parte 2).

Effetto antidiabetico [modifica | modifica wikitesto]

Alcuni studi hanno evidenziato un'azione inibitoria dell'acido rosmarinico nei confronti dell'**amilasi pancreatica**, l'enzima che porta alla liberazione di **glucosio** dall'**amido**. Questa inibizione può essere utile per abbassare l'iperglicemia ^[26].

Uno studio del 2014 suggerisce che l'acido rosmarinico può essere utile nel trattamento del danno neuropatico nei ratti diabetici ^[27]. L'acido rosmarinico inoltre potrebbe ridurre l'**ipertrofia glomerulare**, la **perdita glomerulare**, l'**ulosclerosi glomerulare** e anche la **creatinina sierica** e i livelli di **urea** nei ratti con diabete ^[28]. Inoltre, studi sperimentali hanno evidenziato come l'acido rosmarinico possa diminuire l'iperglicemia e migliorare la sensibilità all'**insulina** grazie a un aumento dei trasportatori **GLUT-4** e a un controllo della presenza di **SGLT1** nella membrana dell'**orletto a spazzola** intestinale, mitigando l'assorbimento intestinale del glucosio ^[4].

Effetto neuroprotettivo e anti-Alzheimer [modifica | modifica wikitesto]

Alla sua azione antiossidante è legato l'effetto neuroprotettivo, soprattutto per quanto riguarda le malattie neurodegenerative come la malattia di Alzheimer. Numerosi studi hanno evidenziato come l'acido rosmarinico sia antiossidante e inibisca l'**apoptosi** delle cellule dovuta allo stress ossidativo indotto dal **perossido di idrogeno** e, inoltre, stimoli l'azione dell'**emeossigenasi 1** ^[29]. Un ulteriore studio ha indagato l'effetto della somministrazione nei ratti di acido rosmarinico alla dose di 1, 2, 4 e 8 mg/kg sul comportamento valutando anche il suo impatto **genotossico** sul tessuto cerebrale. Si è osservato che alla dose di 8 mg/kg l'acido rosmarinico aumenta la motivazione e la locomozione dei ratti, mentre livelli più bassi hanno prodotto un'azione ansiolitica senza alcuna alterazione del movimento o danni al DNA ^[30].

Per quanto riguarda la malattia di Alzheimer è stato evidenziato che l'acido rosmarinico, per via della sua azione antiossidante, potrebbe ridurre la produzione di nitriti indotti da **beta-amiloide** e **malondialdeide** suggerendo un effetto benefico, anche considerando che nell'Alzheimer i peptidi beta-amiloide si depositano nel SNC portando alla produzione di radicali liberi che provocano disfunzione e morte cellulare ^[31].

Tossicità [modifica | modifica wikitesto]

Per quanto riguarda la tossicità, nei ratti la **LD50** è di 561 mg/kg per **somministrazione intravenosa** ^[6] ^[32] indicando che l'acido rosmarinico non ha particolare tossicità infatti non è considerato né tossico né genotossico ^[33] ^[4]. È stata anche valutata l'azione citotossica sulle cellule HepG2 in coltura. In questo modello sperimentale, l'acido rosmarinico fino alla concentrazione 0,7 mM non ha evidenziato una significativa azione citotossica anche se, aumentando la concentrazione, si è evidenziata un'inibizione della crescita cellulare, con una relazione concentrazione-dipendente ^[30].

Figura 33: Voce "Acido rosmarinico" implementata, in data 12 dicembre 2020 (parte 3).

Il confronto può essere fatto anche tramite la valutazione dei caratteri salvati nella cronologia (Figura 34). I caratteri (byte) sono rimasti costanti, circa 2 000, da quando la pagina è stata creata l'11 ottobre 2009, ma sicuramente di grande impatto è stato il contributo dato con il lavoro svolto in questa tesi, con il raggiungimento di 30 753 byte (*Cronologia Acido rosmarinico - Wikipedia*).

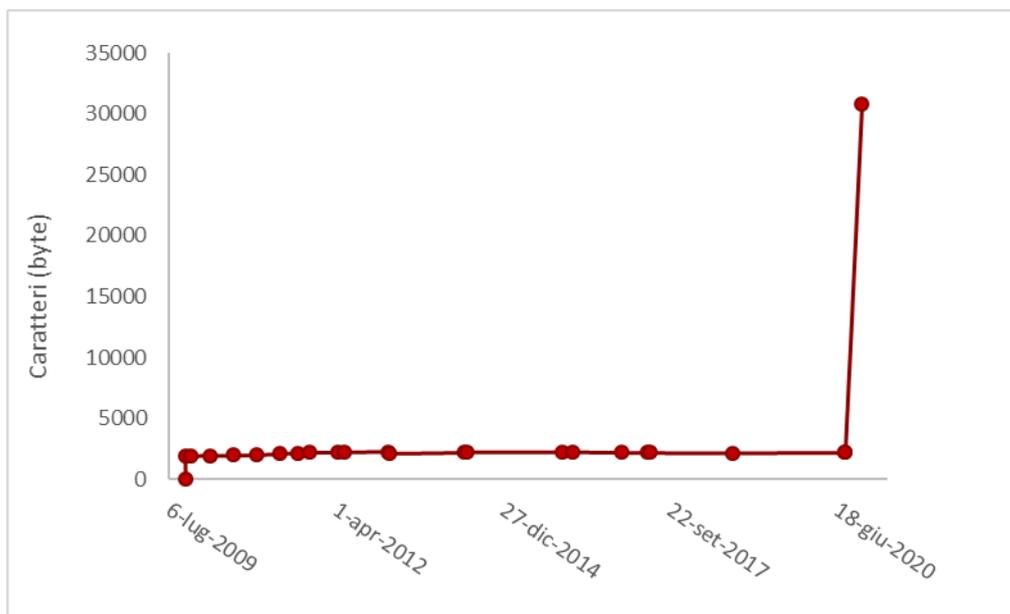


Figura 34: Cronologia dei caratteri (byte) della pagina "Acido rosmarinico" pubblicata in Wikipedia italiana.

6. DISCUSSIONE

Da molto tempo è noto come il diabete sia causa di gravi danni nei pazienti affetti da tale patologia, identificata come una delle più importanti disfunzioni vascolari proprio per le conseguenze sia micro che macroangiopatiche (Pontieri et al., 2015).

Da sempre le piante medicinali sono considerate fonti rinnovabili di innumerevoli composti chimici con potenziale terapeutico e la pianta di *R. officinalis* ha dato spesso prova di molteplici attività effettive, anche nei confronti del diabete (Andrade et al., 2018).

In questo progetto sperimentale sono state valutate le attività ipoglicemizzante, antiossidante e antiglicativa dell'acido rosmarinico, dell'acido caffeico, dell'acido clorogenico e della luteolina ai fini di un potenziale utilizzo in ambito terapeutico o salutistico. Uno degli obiettivi è stato quello di valutare l'attività ipoglicemizzante dei composti, utilizzando il test dell'*α-glucosidase inhibition*, saggio che permette la misurazione dell'assorbanza in relazione al prodotto (*p*-nitrofenolo) che si forma dalla reazione di idrolisi del *p*-NPG catalizzata dall'*α*-glucosidasi, enzima adibito alla scomposizione dei carboidrati per l'assorbimento di glucosio, responsabile dell'iperglicemia post-prandiale (Qurrat-ul-Ain et al., 2017).

I dati ottenuti nelle condizioni sperimentali sopracitate sono coerenti con i dati ritrovati in letteratura. In particolare, l'acido rosmarinico non ha evidenziato attività di inibizione dell'enzima, confermando uno studio pubblicato nel 2011. In questa precedente ricerca è stato osservato che l'acido rosmarinico, valutato a diverse concentrazioni, non dimostrato attività inibitoria, che invece era presente con i composti metil-rosmarinato e pedalitina (Lin et al., 2011). L'attività è stata valutata anche per i suoi glucosidi che non hanno dimostrato alcuna inibizione (Ha et al., 2012). Inoltre, è stato fatto un confronto del saggio con diversi tipi di enzima confermando che l'acido rosmarinico non inibisce l'*α*-glucosidasi, indipendentemente dalla fonte da cui proviene (F. Zhu et al., 2019).

Per quanto riguarda l'acido clorogenico e l'acido caffeico sono stati valutati in un precedente studio entrambi alla concentrazione di 200 μ M; seppur maggiore della concentrazione impiegata in questo lavoro sperimentale, l'inibizione è descritta come modesta, infatti l'acido caffeico inibì del 15% circa e l'acido clorogenico dimostrò un'inibizione leggermente inferiore (Duangjai et al., 2020). Il fatto che l'acido caffeico inibisca maggiormente rispetto all'acido clorogenico è avvalorato anche da uno studio del 2015, che imputa la causa di questo nella struttura dell'acido clorogenico. Infatti, l'inibizione dell'*α*-glucosidasi è legata ad uno specifico pattern di gruppi -OH e probabilmente i gruppi ossidrilici dell'acido clorogenico producono vincoli sterici per il legame nel sito attivo dell'enzima (Oboh et al., 2015). L'attività dell'acido caffeico inoltre è stata valutata anche con l'*α*-glucosidasi derivante dell'intestino di ratto evidenziando che una concentrazione di circa 100 μ M inibiva solo del 4,8% l'attività enzimatica (Mag et al., 2016).

Argomentazioni differenti vanno fatte per la luteolina che evidenziato una significativa attività inibitoria dell'*α*-glucosidasi, infatti le percentuali di attività enzimatica sono

molto diminuite alle concentrazioni maggiori studiate, superando l'attività dell'acarbosio.

Ciò è avvalorato da diversi studi che confermano i dati ottenuti in questa ricerca. In letteratura sono riportate ricerche che confrontano l'inibizione ottenuta con acarbosio ($IC_{50}=607 \pm 56 \mu M$) a quella con luteolina ($IC_{50}=46 \pm 6 \mu M$), indicando che la luteolina ha una potenza maggiore rispetto all'acarbosio (Proença et al., 2017).

La maggiore potenza della luteolina è da ascrivere alla sua particolare struttura chimica (Figura 10), in particolare alla porzione catecolica dell'anello B, al gruppo -OH dell'anello C e al doppio legame tra C2 e C3, che favorisce la quasi planarità dei due anelli. Infatti, è noto che le molecole con struttura quasi planare entrano facilmente nelle tasche idrofobiche degli enzimi inibendoli (Proença et al., 2017).

L'iperglicemia è causa della formazione dei prodotti finali di glicazione avanzata (AGEs), che portano alla modifica strutturale e all'aggregazione proteica, conducendo alla formazione di ROS e alla destabilizzazione dell'endotelio vascolare (Pontieri et al., 2015). L'attività antiglicativa dei composti in esame è stata valutata con il *BSA assay*, saggio che misura la fluorescenza degli AGEs formati dalla reazione non enzimatica tra albumina bovina e ribosio. Si è quindi determinata la diminuzione della fluorescenza in seguito al trattamento effettuato con i composti acido rosmarinico, acido caffeico e luteolina, in confronto con l'aminoguanidina considerata come controllo positivo. Il composto meno attivo tra quelli valutati è stato l'acido caffeico che al quinto giorno di incubazione, quindi al massimo grado di glicazione, alla concentrazione di $100 \mu M$ ha provocato una inibizione di circa il 15%. Questo dato è comparabile con i risultati di uno studio che ha valutato la formazione degli AGEs dalla reazione tra BSA e glucosio (X. Cao et al., 2019). Nella Tabella 1 sono riportati i risultati di uno studio che ha precedentemente valutato il grado di inibizione dell'acido clorogenico, molecola non valutata in questo lavoro di tesi, mediante il *BSA assay*. Si nota come abbia un valore di IC_{50} inferiore rispetto all'aminoguanidina, quindi risulta più attivo nell'inibizione (Junghyun Kim et al., 2011).

Tabella 1: Effetto inibitorio di acido clorogenico e aminoguanidina sulla formazione di AGEs tra BSA e fruttosio+glucosio (Junghyun Kim et al., 2011).

Compound	Conc. (μM)	Inhibition (%)	IC_{50} (μM)
Chlorogenic acid	28.2	1.61 ± 0.35	148.32 ± 3.13
	70.6	27.85 ± 0.53	
	141.1	44.22 ± 1.05	
Aminoguanidine	373.5	39.12 ± 2.87	807.67 ± 58.09
	747	48.66 ± 1.89	
	1120	56.30 ± 1.87	

Dallo studio si evince che a concentrazioni superiori ai $100 \mu M$ si avrà un'inibizione di circa il 50% della formazione dei prodotti di glicazione avanzata (Junghyun Kim et al., 2011).

In base ai risultati ottenuti nella precedente ricerca, anche l'acido rosmarinico mostra una modesta diminuzione della formazione dei prodotti avanzati di glicazione, solo a concentrazioni maggiori di $50 \mu M$ si osserva un'inibizione significativa rispetto al

controllo. Alcuni studi presenti in letteratura che riportano il comportamento dell'acido rosmarinico come composto antiglicativo confermano i nostri risultati ottenuti. Si descrive che l'acido rosmarinico ha azione concentrazione-dipendente, evidente anche dopo 120 minuti di incubazione; si è infatti osservato che, nel modello BSA-glucosio, l'aggiunta di 50 µg/ml di acido rosmarinico (circa 100 µM) diminuisce la formazione degli AGEs del 25% circa (J. Ou et al., 2017). Questo dato è esattamente comparabile con quanto riportato nei nostri risultati. In uno studio recente che ha previsto l'impiego di HSA-metilgliosale, gli autori hanno osservato una forte diminuzione della fluorescenza ha suggerito che l'acido rosmarinico previene la formazione degli AGEs e l'aggregazione di proteine, proprio per la sua azione di legame a punti critici all'ossidazione dell'albumina (Shamsi et al., 2020).

I risultati inoltre suggeriscono che tra i composti studiati, la molecola più attiva nell'inibire la formazione degli AGEs è la luteolina. Per la loro attività antiossidante i flavonoidi hanno anche la capacità di inibire la formazione dei prodotti di glicazione avanzata. In particolare, la luteolina ha un forte impatto in questo processo e, in un modello BSA-glucosio+fruttosio, la sua inibizione è dell'85% alla concentrazione di circa 400 µM (Grzegorzczuk-Karolak et al., 2016). Questo dato è anche in accordo con un altro studio che in un modello BSA-metilgliosale ha evidenziato che la luteolina e altri flavonoidi inducono un'azione inibitoria simile a quella dell'aminoguanidina (controllo positivo) (C. H. Wu & Yen, 2005).

Lo stress ossidativo è uno dei meccanismi che concorrono allo sviluppo delle complicanze del diabete e dell'iperglicemia, di concerto con la formazione dei prodotti avanzati di glicazione, dai quali si possono generare ROS. In questa tesi, l'attività antiossidante dei composti è stata valutata tramite l'*ORAC assay*, che permette di quantificare l'attività scavenging nei confronti dei radicali liberi. In Tabella 2 sono indicati i dati sperimentali ottenuti in questa ricerca posti a confronto con quelli riportati in letteratura.

I dati ottenuti con questo lavoro di ricerca risultano in accordo con quanto riportato negli articoli precedentemente pubblicati e rispecchiano l'andamento dei dati presenti in letteratura. In particolare, essi suggeriscono che l'acido caffeico e l'acido clorogenico hanno valori confrontabili.

Tabella 2 Profilo dell'attività antiossidante dei composti studiati a confronto con i dati presenti in letteratura.

Dati sperimentali		Dati di letteratura	
Composti	$\mu\text{mol}_{\text{TEAC}}/\mu\text{mol}_{\text{camp}} \pm \text{SEM}$	$\mu\text{M}_{\text{TEAC}}/\mu\text{M}_{\text{camp}} \pm \text{SEM}$	
Acido ascorbico	0.91 ± 0.077	0.82 ± 0.03 ^a	0.95 ± 0.02 ^d
Acido clorogenico	5.107 ± 0.304 ****	2.0 ± 0.1 ^b	3.14 ± 0.19 ^d
Acido caffeico	5.763 ± 0.432 ****	2.1 ± 0.1 ^b	4.27 ± 0.24 ^d
Luteolina	11.58 ± 1.37 ****	8.55 ± 0.85 ^c	–
Acido rosmarinico	13.30 ± 0.437 ****	–	7.02 ± 1.03 ^e

**** $p < 0.0001$ acido rosmarinico, luteolina, acido caffeico, acido clorogenico vs acido ascorbico. I valori sono espressi come media ± SEM con almeno 3 esperimenti. a (Nkhili & Brat, 2011); b (Aaby et al., 2004); c (Wolfe & Liu, 2008); d (B. Ou et al., 2001); e (C. Chen et al., 2013).

Il valore TEAC della luteolina, sia dai dati di letteratura che dai dati precedentemente raccolti in laboratorio, si interpone tra acido rosmarinico e caffeico. Ciò che si evince è che l'acido rosmarinico vanta una forte attività antiossidante, difatti a supporto c'è uno studio del 2002 che osserva come la percentuale di scavenging del radicale libero DPPH arrivi fino al 100% con una concentrazione pari a 10 μM di acido rosmarinico (Lo et al., 2002).

Tutti i dati suggeriscono che i composti studiati hanno un'attività nettamente superiore a quella dell'acido ascorbico, usato come composto di riferimento.

Diversi studi hanno identificato il meccanismo d'azione antiossidante degli acidi polifenolici che consiste nella struttura aromatica e nella presenza di gruppi ossidrilici. Questa struttura permette la donazione di atomi di idrogeno e la delocalizzazione delle cariche (Razzaghi-Asl et al., 2013). Da questo, la comprensione della minore attività antiossidante dell'acido clorogenico e dell'acido caffeico nei confronti dell'acido rosmarinico, infatti, quest'ultimo presenta molti più gruppi ossidrilici e i due anelli benzenici che permettono un trasferimento di elettroni migliore di quello delle altre due molecole (Figura 1).

La luteolina presenta la struttura dei flavonoidi che, per la presenza di gruppi ossidrilici nell'anello A e B, sono identificate tra le molecole con maggiori proprietà antiossidanti (Figura 2) (Wolfe & Liu, 2008).

Come ulteriore obiettivo di questa tesi sperimentale si è svolto il Progetto Wikipedia che ha avuto come oggetto l'implementazione della voce "Acido rosmarinico" nella Wikipedia italiana, portando ad un aumento sostanziale dei caratteri del testo, con un ampliamento delle informazioni presenti nella voce, al link https://it.wikipedia.org/wiki/Acido_rosmarinico.

7. CONCLUSIONE

Gli obiettivi di questa ricerca sperimentale sono stati lo studio in vitro delle proprietà ipoglicemizzanti, antiossidanti e antiglicative di alcuni composti naturali identificati in numerose piante medicinali tra cui *Rosmarinus officinalis*; i composti considerati sono stati: l'acido caffeico, l'acido rosmarinico, l'acido clorogenico e la luteolina.

Nello studio si è osservato che per quanto concerne l'attività anti- α -glucosidasi solo la luteolina possiede un'attività significativa nei confronti dell'enzima, coerentemente con quanto descritto in letteratura, essa può essere considerata un potenziale inibitore dell' α -glucosidasi. Solamente dalla concentrazione 50 μ M l'acido caffeico si è dimostrato un inibitore debole dell'attività enzimatica considerata.

Mediante l'ORAC assay è stata valutata l'attività antiossidante e tutti i composti hanno dimostrato una significativa capacità nell'attività di scavenging dei radicali perossidici, decisamente più attivi sono stati l'acido rosmarinico e la luteolina, mentre l'acido caffeico e l'acido clorogenico hanno evidenziato un'attività modesta. Tutti i composti hanno rivelato una capacità antiossidante nettamente migliore di quella dell'acido ascorbico.

Per quanto concerne l'attività antiglicativa, i risultati indicano una significativa inibizione della formazione degli AGEs per la luteolina, una modesta capacità per l'acido rosmarinico e leggermente inferiore per l'acido caffeico.

Infine, il raggiungimento dell'obiettivo inerente l'implementazione della voce "Acido rosmarinico" in Wikipedia italiana ha consentito un sostanziale ampliamento di tale voce rendendo fruibile liberamente le informazioni tratte dalla letteratura scientifica relative al composto studiato.

L'insieme dei risultati sperimentali ottenuti in questo lavoro di tesi, supportati da altri studi presenti in letteratura, suggerisce un possibile uso dell'acido clorogenico per contrastare le condizioni di stress ossidativo. Tuttavia, molto più attivi si sono dimostrati l'acido caffeico, la luteolina e l'acido rosmarinico che hanno evidenziato una spiccata capacità di contrasto nei confronti dei ROS. In particolare, l'acido rosmarinico potrebbe avere un potenziale impiego anche per contrastare la formazione degli AGEs, insieme alla luteolina che oltretutto ha dimostrato una forte attività inibitoria sull' α -glucosidasi. Tuttavia sono necessari altri studi sperimentali in vivo per consentire un loro utilizzo a scopo farmacologico nel trattamento dell'iperglicemia, nel contrasto dello stress ossidativo e nell'inibizione della formazione degli AGEs, tutti meccanismi implicati nello sviluppo delle complicanze cardiovascolari del diabete mellito.

BIBLIOGRAFIA

- Aaby, K., Hvattum, E., & Skrede, G. (2004). Analysis of flavonoids and other phenolic compounds using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection: Relationship to antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4595–4603. <https://doi.org/10.1021/jf0352879>
- Acido rosmarinico* - Wikipedia. (2009). https://it.wikipedia.org/wiki/Acido_rosmarinico
- Adomako-Bonsu, A. G., Chan, S. L., Pratten, M., & Fry, J. R. (2017). Antioxidant activity of rosmarinic acid and its principal metabolites in chemical and cellular systems: Importance of physico-chemical characteristics. *Toxicology in Vitro*, 40, 248–255. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.01.016>
- Agunloye, O. M., Oboh, G., Ademiluyi, A. O., Ademosun, A. O., Akindahunsi, A. A., Oyagbemi, A. A., Omobowale, T. O., Ajibade, T. O., & Adedapo, A. A. (2019). Cardio-protective and antioxidant properties of caffeic acid and chlorogenic acid: Mechanistic role of angiotensin converting enzyme, cholinesterase and arginase activities in cyclosporine induced hypertensive rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 109(October 2018), 450–458. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.044>
- Ai-Sereiti, M. R., Abu-Amer, M., & Sen, P. (1999). Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. In *Indian Journal of Experimental Biology* (Vol. 37).
- Alagawany, M., Abd El-Hack, M. E., Farag, M. R., Gopi, M., Karthik, K., Malik, Y. S., & Dhama, K. (2017). Rosmarinic acid: Modes of action, medicinal values and health benefits. In *Animal Health Research Reviews* (Vol. 18, Issue 2, pp. 167–176). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S1466252317000081>
- Ambasta, R. K., Gupta, R., Kumar, D., Bhattacharya, S., Sarkar, A., & Kumar, P. (2019). *Can luteolin be a therapeutic molecule for both colon cancer and diabetes?* 18(November 2018), 230–239. <https://doi.org/10.1093/bfpg/ely036>
- Andrade, J. M., Faustino, C., Garcia, C., Ladeiras, D., Reis, C. P., & Rijo, P. (2018). *Rosmarinus officinalis* L.: An update review of its phytochemistry and biological activity. In *Future Science OA* (Vol. 4, Issue 4). Future Medicine Ltd. <https://doi.org/10.4155/fsoa-2017-0124>
- Ayasinghe, C. H. J., Otoh, N. A. G., Oki, T. O. A., & Ada, S. H. U. N. W. (2003). *Phenolics Composition and Antioxidant Activity of Sweet Basil (Ocimum basilicum L.)*. 4442–4449. <https://doi.org/10.1021/jf034269o>
- Aziz, N., Kim, M., & Youl, J. (2018). *Anti-inflammatory effects of luteolin: A review of in vitro, in vivo, and in silico studies*. 225(September 2017), 342–358. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.05.019>
- B. Sauro. (2020). *Sandbox*. <https://it.wikipedia.org/wiki/Utente:Trice8/Sandbox>
- Baba, S., Osakabe, N., Natsume, M., Yasuda, A., Muto, Y., Hiyoshi, K., Takano, H., Yoshikawa, T., & Terao, J. (2005). Absorption, metabolism, degradation and urinary excretion of rosmarinic acid after intake of *Perilla frutescens* extract in humans. *European Journal of Nutrition*, 44(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00394-004-0482-2>
- Baluchnejadmojarad, T., Roghani, M., & Kazemloo, P. (2013). *Rosmarinic acid mitigates learning and memory disturbances in amyloid β (25–35) -induced model of Alzheimer's disease in rat*. 5, 7–14.
- Baron, A. D. (1998). Postprandial hyperglycaemia and h-glucosidase inhibitors. In *Diabetes Research and Clinical Practice* (Vol. 40).
- Basta, G., Del Turco, S., & De Caterina, R. (2004). Prodotti di glicosilazione avanzata: Possibili implicazioni per l'aterosclerosi nel diabete. *Recenti Progressi in Medicina*, 95(2), 67–80.
- Basta, G., Schmidt, A. M., & De Caterina, R. (2004). Advanced glycation end products and vascular inflammation: Implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. In *Cardiovascular Research*. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.05.001>
- Bayomy, N. A., Elbakary, R. H., Ibrahim, M. A. A., & Abdelaziz, E. Z. (2017). Effect of Lycopene and Rosmarinic Acid on Gentamicin Induced Renal Cortical Oxidative Stress, Apoptosis, and Autophagy in Adult Male Albino Rat. *Anatomical Record*, 300(6), 1137–1149. <https://doi.org/10.1002/ar.23525>
- Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(5), 749–760. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(96\)00351-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(96)00351-6)
- Cao, X., Xia, Y., Zeng, M., Wang, W., He, Y., & Liu, J. (2019). Caffeic Acid Inhibits the Formation of Advanced Glycation End Products (AGEs) and Mitigates the AGEs-Induced Oxidative Stress and Inflammation Reaction in Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs). *Chemistry and Biodiversity*, 16(10). <https://doi.org/10.1002/cbdv.201900174>
- Caterina, R. De, Madonna, R., & Studi, G. (2011). *Perchè il diabete ha l'aterosclerosi - vie di signaling nella vasculopatia diabetica*. 295–304.
- Chen, C., Li, H., Yuan, Y., Dai, H., & Yang, B. (2013). Antioxidant activity and components of a traditional chinese medicine formula consisting of *Crataegus pinnatifida* and *Salvia miltiorrhiza*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-99>
- Chen, J. H., & Ho, C.-T. (1997). *Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds*. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- Chiba, S. (1997). Molecular Mechanism in α -Glucosidase and Glucoamylase. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 61(8), 1233–1239. <https://doi.org/10.1271/bbb.61.1233>

- Choi, H. G., Tran, P. T., Lee, J. H., Min, B. S., & Kim, J. A. (2018). Anti-inflammatory activity of caffeic acid derivatives isolated from the roots of *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Archives of Pharmacal Research*, 41(1), 64–70. <https://doi.org/10.1007/s12272-017-0983-1>
- Choi, M. Y., Song, H. S., Hur, H. S., & Sim, S. S. (2008). *Whitening Activity of Luteolin Related to the Inhibition of cAMP Pathway in α -MSH-stimulated B16 Melanoma Cells*. 31(9), 1166–1171. <https://doi.org/10.1007/s12272-001-1284-4>
- Cronologia Acido rosmarinico - Wikipedia. (2020). https://it.wikipedia.org/w/index.php?title=Acido_rosmarinico&action=history
- Cronologia Sandbox. (2020). <https://it.wikipedia.org/w/index.php?title=Utente:Trice8/Sandbox&action=history>
- Duangjai, A., Pontip, P., Sumhem, S., Kaweeikul, W., Ontawong, A., Trisat, K., & Saokaew, S. (2020). *Phenolic acids from Coffea arabica L. suppress intestinal uptake of glucose and cholesterol*. 31(3), 59–66.
- Dubois, M., Bailly, F., Mbemba, G., Mouscadet, J., Debyser, Z., & Witvrouw, M. (2008). *Reaction of Rosmarinic Acid with Nitrite Ions in Acidic Conditions : Discovery of Nitro- and Dinitro-rosmarinic Acids as New Anti-HIV-1 Agents*. 2575–2579. <https://doi.org/10.1021/jm7011134>
- Edelstein, D., & Brownlee, M. (1992). *Mechanistic Studies of Advanced Glycosylation End Product Inhibition by Aminoguanidine*. 41(July 1990), 1990–1993.
- Ekambaram, S. P., Perumal, S. S., Balakrishnan, A., Marappan, N., Gajendran, S. S., & Viswanathan, V. (2016). Antibacterial synergy between rosmarinic acid and antibiotics against methicillin-resistant staphylococcus aureus. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 5(4), 358–363. <https://doi.org/10.5455/jice.20160906035020>
- Fang, J., Zhou, Q., Shi, X., & Jiang, B. (2007). *Luteolin inhibits insulin-like growth factor 1 receptor signaling in prostate cancer cells*. 28(3), 713–723. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl189>
- Farkhondeh, T., Samarghandian, S., & Pourbagher-Shahri, A. M. (2019). Hypolipidemic effects of *Rosmarinus officinalis* L. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 234, Issue 9, pp. 14680–14688). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/jcp.28221>
- Friedman, T. (2015). *The Effect of Rosmarinic Acid on Immunological and Neurological Systems : A Basic Science and Clinical Review*. 50–59. <https://doi.org/10.14200/jrm.2015.4.0105>
- Ghasemzadeh, M., Amin, B., & Mehri, S. (2018). *Phytomedicine Rosmarinic acid attenuates development and existing pain in a rat model of neuropathic pain : An evidence of anti-oxidative and anti-inflammatory effects*. 40(November 2017), 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.01.001>
- Grzegorzczak-Karolak, I., Golab, K., Gburek, J., Wysokinska, H., & Matkowski, A. (2016). Inhibition of Advanced Glycation End-Product Formation and Antioxidant Activity by Extracts and Polyphenols from *Scutellaria alpina* L. and *A. altissima* L. *Molecules*, 21(739).
- Ha, T. J., Lee, J. H., Lee, M. H., Lee, B. W., Kwon, H. S., Park, C. H., Shim, K. B., Kim, H. T., Baek, I. Y., & Jang, D. S. (2012). Isolation and identification of phenolic compounds from the seeds of *Perilla frutescens* (L.) and their inhibitory activities against α -glucosidase and aldose reductase. *Food Chemistry*, 135(3), 1397–1403. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.104>
- Hasanein, P., Zaheri, L. M., Hasanein, P., & Zaheri, L. M. (2014). *Effects of rosmarinic acid on an experimental model of painful diabetic neuropathy in rats* Effects of rosmarinic acid on an experimental model of painful diabetic neuropathy in rats. 0209. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.894090>
- Huang, B. X., Kim, H. Y., & Dass, C. (2004). Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 15(8), 1237–1247. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2004.05.004>
- Huang, Y., Hwang, J., Lee, P., Ke, F., Huang, J., Huang, C., Kandaswami, C., Jr, E. M., & Lee, M. (1999). *Effects of luteolin and quercetin , inhibitors of tyrosine kinase , on cell growth and metastasis-associated properties in A431 cells overexpressing epidermal growth factor receptor*. 999–1010.
- Imran, M., Rauf, A., Abu-Izneid, T., Nadeem, M., Shariati, M. A., Khan, I. A., Imran, A., Orhan, I. E., Rizwan, M., Atif, M., Gondal, T. A., & Mubarak, M. S. (2019). Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 112(September 2018). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108612>
- Iswandana, R., Pham, B. T., van Haaften, W. T., Luangmonkong, T., Oosterhuis, D., Mutsaers, H. A. M., & Olinga, P. (2016). Organ- and species-specific biological activity of rosmarinic acid. *Toxicology in Vitro*, 32, 261–268. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.01.009>
- Jia, J. Y., Lu, Y. L., Li, X. C., Liu, G. Y., Li, S. J., Liu, Y., Liu, Y. M., Yu, C., & Wang, Y. P. (2010). Pharmacokinetics of depside salts from *Salvia miltiorrhiza* in healthy Chinese volunteers: A randomized, open-label, single-dose study. *Current Therapeutic Research - Clinical and Experimental*, 71(4), 260–271. <https://doi.org/10.1016/j.curtheres.2010.08.004>
- Karthikkumar, V., Sivagami, G., Viswanathan, P., & Nalini, N. (2015). *Rosmarinic acid inhibits DMH-induced cell proliferation in experimental rats*. 26(2), 185–200. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2014-0044>
- Khan, F. A., Maalik, A., & Murtaza, G. (2016). Inhibitory mechanism against oxidative stress of caffeic acid. In *Journal of Food and Drug Analysis* (Vol. 24, Issue 4, pp. 695–702). Elsevier Taiwan LLC. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.05.003>

- Kim, Jin-ho, Jin, Y., Park, B., Kim, T., Kim, S., Lim, Y., Hong, J., Yoo, H., & Yun, Y. (2005). *Luteolin prevents PDGF-BB-induced proliferation of vascular smooth muscle cells by inhibition of PDGF b -receptor phosphorylation*. 69, 1715–1721. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.04.002>
- Kim, Junghyun, Jeong, I. H., Kim, C. S., Lee, Y. M., Kim, J. M., & Kim, J. S. (2011). Chlorogenic acid inhibits the formation of advanced glycation end products and associated protein cross-linking. *Archives of Pharmacol Research*, 34(3), 495–500. <https://doi.org/10.1007/s12272-011-0319-5>
- Lee, H. J., Cho, H. S., Park, E., Kim, S., Lee, S. Y., Kim, C. S., Kim, D. K., Kim, S. J., & Chun, H. S. (2008). Rosmarinic acid protects human dopaminergic neuronal cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Toxicology*, 250(2–3), 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.06.010>
- Lembo, S., Balato, A., Caprio, R. Di, Cirillo, T., Giannini, V., Gasparri, F., & Monfrecola, G. (2014). *The Modulatory Effect of Ellagic Acid and Rosmarinic Acid on Ultraviolet-B-Induced Cytokine / Chemokine Gene Expression in Skin Keratinocyte (HaCaT) Cells*. 2014.
- Leung, H. W., Kuo, C., Yang, W., Lin, C., & Lee, H. (2006). *Antioxidant enzymes activity involvement in luteolin-induced human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis*. 534, 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.01.021>
- Lin, L., Dong, Y., Zhao, H., Wen, L., Yang, B., & Zhao, M. (2011). Comparative evaluation of rosmarinic acid, methyl rosmarinate and pedalitin isolated from *Rabdosia serra* (MAXIM.) HARA as inhibitors of tyrosinase and α -glucosidase. *Food Chemistry*, 129(3), 884–889. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.039>
- Lo, A. H., Liang, Y. C., Lin-Shiau, S. Y., Ho, C. T., & Lin, J. K. (2002). Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor- κ B in mouse macrophages. *Carcinogenesis*, 23(6), 983–991. <https://doi.org/10.1093/carcin/23.6.983>
- López-lázaro, M. (2009). *Distribution and Biological Activities of the Flavonoid Luteolin*. 31–59.
- Mag, P., Kakarla, L., Katragadda, S. B., Tiwari, A. K., Kotamraju, K. S., Madhusudana, K., Kumar, A., & Botlagunta, M. (2016). *Free Radical Scavenging , α -Glucosidase Inhibitory and Anti-Inflammatory Constituents from Indian Sedges, Cyperus scariosus R. Br and Cyperus rotundus L*. 488–496. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.191467>
- Manzoor, M. F., Ahmad, N., Ahmed, Z., Siddique, R., Wahab, A., Zeng, X. A., Rahaman, A., & Aadil, R. M. (2019). *Novel extraction techniques and pharmaceutical activities of luteolin and its derivatives*. April, 1–19. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12974>
- Marques, V., & Farah, A. (2009). Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. *Food Chemistry*, 113(4), 1370–1376. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.086>
- Mccue, P. P., & Shetty, K. (2004). Inhibitory effects of rosmarinic acid extracts on porcine pancreatic amylase in vitro. In *Asia Pacific J Clin Nutr* (Vol. 13, Issue 1).
- Monteiro Espíndola, K. M., Ferreira, R. G., Mosquera Narvaez, L. E., Rocha Silva Rosario, A. C., Machado Da Silva, A. H., Bispo Silva, A. G., Oliveira Vieira, A. P., & Chagas Monteiro, M. (2019). Chemical and pharmacological aspects of caffeic acid and its activity in hepatocarcinoma. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 9, Issue JUN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00541>
- Nadeem, M., Imran, M., Gondal, T. A., Imran, A., Shahbaz, M., Amir, R. M., Sajid, M. W., Qaisrani, T. B., Atif, M., Hussain, G., Salehi, B., Ostrander, E. A., Martorell, M., Sharifi-Rad, J., Cho, W. C., & Martins, N. (2019). Therapeutic potential of rosmarinic acid: A comprehensive review. In *Applied Sciences (Switzerland)* (Vol. 9, Issue 15). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/app9153139>
- Naguib, Y. M. A., Hari, S. P., Passwater, R., & Huang, D. (2003). Antioxidant Activities of Natural Vitamin E Formulations. In *J Nutr Sci Vitaminol* (Vol. 49).
- Nakazawa, T., & Ohsawa, K. (1998). Metabolism of Rosmarinic Acid in Rats. In *J. Nat. Prod* (Vol. 61). UTC. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- Nardini, M., D’Aquino, M., Tomassi, G., Gentili, V., Di Felice, M., & Scaccini, C. (1995). Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. *Free Radical Biology and Medicine*, 19(5), 541–552. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)00052-Y](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)00052-Y)
- Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Ali, A., Jilany, G., Shumzaid, M., Ahmad, F., & Babazadeh, D. (2018). Biomedicine & Pharmacotherapy Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97(October 2017), 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.064>
- Nikookar, H., Mohammadi-Khanaposhtani, M., Imanparast, S., Faramarzi, M. A., Ranjbar, P. R., Mahdavi, M., & Larijani, B. (2018). Design, synthesis and in vitro α -glucosidase inhibition of novel dihydropyrano[3,2-c]quinoline derivatives as potential anti-diabetic agents. *Bioorganic Chemistry*, 77, 280–286. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.01.025>
- Nkhili, E., & Brat, P. (2011). Reexamination of the ORAC assay: Effect of metal ions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400(5), 1451–1458. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4884-8>
- Oboh, G., Agunloye, O. M., Adefegha, S. A., Akinyemi, A. J., & Ademiluyi, A. O. (2015). Caffeic and chlorogenic acids inhibit key enzymes linked to type 2 diabetes (in vitro): A comparative study. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 26(2), 165–170. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2013-0141>
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food*

- Chemistry*, 49(10), 4619–4626. <https://doi.org/10.1021/jf010586o>
- Ou, J., Huang, J., Wang, M., & Ou, S. (2017). Effect of rosmarinic acid and carnosic acid on AGEs formation in vitro. *Food Chemistry*, 221, 1057–1061. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.056>
- Øyvind M. Andersen, K. R. M. (2006). *FLAVONOIDS Chemistry, Biochemistry and Applications*.
- Petersen, M. (2013). Rosmarinic acid: New aspects. *Phytochemistry Reviews*, 12(1), 207–227. <https://doi.org/10.1007/s11101-013-9282-8>
- Pontieri, G. M., Russo, M. A., & Frati L. (2015). *Patologia Generale e Fisiopatologia Generale* (PICCIN (Ed.); V).
- Proença, C., Freitas, M., Ribeiro, D., Oliveira, E. F. T., Sousa, J. L. C., Tomé, S. M., Ramos, M. J., Silva, A. M. S., Fernandes, P. A., & Fernandes, E. (2017). α -Glucosidase inhibition by flavonoids: an in vitro and in silico structure–activity relationship study. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 1216–1228. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1368503>
- PubChem. (n.d.). *PubChem Database - Caffeic acid*. Retrieved October 10, 2020, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeic-acid>
- PUBCHEM. (n.d.). *PubChem Database - Rosmarinic acid*. Retrieved November 12, 2020, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281792> (accessed on June 29, 2020)
- Qurrat-ul-Ain, Ashiq, U., Jamal, R. A., Saleem, M., & Mahroof-Tahir, M. (2017). Alpha-glucosidase and carbonic anhydrase inhibition studies of Pd(II)-hydrazide complexes. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(4), 488–499. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.02.024>
- Rahman, S., Jahan, R., & Nahian, A. (2014). *Rosmarinic acid : A review of its anticancer action ROSMARINIC ACID : A REVIEW OF ITS ANTICANCER ACTION. September*.
- Razzaghi-Asl, N., Garrido, J., Khazraei, H., Borges, F., & Firuzi, O. (2013). Antioxidant Properties of Hydroxycinnamic Acids: A Review of Structure-Activity Relationships. In *Current Medicinal Chemistry* (Vol. 20).
- Runtuwene, J., Cheng, K. C., Asakawa, A., Amitani, H., Amitani, M., Morinaga, A., Takimoto, Y., Kairupan, B. H. R., & Inui, A. (2016). Rosmarinic acid ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity in diabetic rats, potentially by modulating the expression of PEPCK and GLUT4. *Drug Design, Development and Therapy*, 10, 2193–2202. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S108539>
- Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Sugawara, M., & Iseki, K. (2011). In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, 403(1–2), 136–138. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.09.035>
- Scalbert, A., Johnson, I. T., & Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1 Suppl), 215–217. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.215s>
- Shamsi, A., Ahmed, A., Khan, M. S., Husain, F. M., & Bano, B. (2020). Rosmarinic acid restrains protein glycation and aggregation in human serum albumin: Multi spectroscopic and microscopic insight - Possible Therapeutics Targeting Diseases. *International Journal of Biological Macromolecules*, 161, 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.048>
- Statistiche Wikipedia*. (2020). <https://it.wikipedia.org/wiki/Speciale:Statistiche>
- Sudeep, H. V., Venkatakrishna, K., Patel, D., & Shyamprasad, K. (2016). Biomechanism of chlorogenic acid complex mediated plasma free fatty acid metabolism in rat liver. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 4–8. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1258-y>
- Swarup, V., Ghosh, J., Ghosh, S., Saxena, A., & Basu, A. (2007). *Antiviral and Anti-Inflammatory Effects of Rosmarinic Acid in an Experimental Murine Model of Japanese Encephalitis*. 51(9), 3367–3370. <https://doi.org/10.1128/AAC.00041-07>
- Tavafi, M., Ahmadvand, H., Tamjidipoor, A., Delfan, B., & Reza, A. (2011). Tissue and Cell Satureja khozestanica essential oil ameliorates progression of diabetic nephropathy in uninephrectomized diabetic rats. *Tissue and Cell*, 43(1), 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2010.11.004>
- Thornalley, P. J. (2003). *Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts*. 419, 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2003.08.013>
- Tsai, T., Chuang, L., Lien, T., Liing, Y., Chen, W., & Tsai, P. (2013). *Rosmarinus officinalis Extract Suppresses Propionibacterium acnes –Induced Inflammatory Responses 1*. 16(4), 324–333. <https://doi.org/10.1089/jmf.2012.2577>
- Tysca, D., Oliveira, P., Filot, L., & Nascimento, J. (2005). *Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid*. 52, 199–203. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2005.03.003>
- Van Den Berg, R., Haenen, G. R. M. M., Van Den Berg, H., & Bast, A. (1999). *Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures*. www.elsevier.com/locate/foodchem
- Vistoli, G., De Maddis, D., Cipak, A., Zarkovic, N., Carini, M., & Aldini, G. (2013). Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): An overview of their mechanisms of formation. *Free Radical Research*, 47(S1), 3–27. <https://doi.org/10.3109/10715762.2013.815348>
- Vuorela, P., Saario, E., Leinonen, M., To, L., Saikku, P., & Vuorela, H. (2005). *In vivo treatment of acute Chlamydia pneumoniae infection with the flavonoids quercetin and luteolin and an alkyl gallate, octyl gallate, in a mouse model*. 70, 1222–1230. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.07.012>

- Weij, Y., Shuai, C., Zhou, J., Liu, Y., Chen, L., & Qiao, R. (2012). D-ribose in glycation and protein aggregation. *BBA - General Subjects*, 1820(4), 488–494. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.01.005>
- WHO. (n.d.). *Diabetes - WHO*. Retrieved November 12, 2020, from https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab_1
- Wolfe, K. L., & Liu, R. H. (2008). Structure-activity relationships of flavonoids in the cellular antioxidant activity assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18), 8404–8411. <https://doi.org/10.1021/jf8013074>
- Wu, C. H., & Yen, G. C. (2005). *Inhibitory Effect of Naturally Occurring Flavonoids on the Formation of Advanced Glycation Endproducts*. <https://doi.org/10.1021/jf048550u>
- Wu, W. M., Lu, L., Long, Y., Wang, T., Liu, L., Chen, Q., & Wang, R. (2007). Free radical scavenging and antioxidative activities of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and its related compounds in solution and membranes: A structure-activity insight. *Food Chemistry*, 105(1), 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.049>
- Yan, J., Zhang, G., Pan, J., & Wang, Y. (2014). α -Glucosidase inhibition by luteolin: Kinetics, interaction and molecular docking. *International Journal of Biological Macromolecules*, 64, 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.12.007>
- Yan, Y., Zhou, X., Guo, K., Zhou, F., & Yang, H. (2020). Use of Chlorogenic Acid against Diabetes Mellitus and Its Complications. In *Journal of Immunology Research* (Vol. 2020). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2020/9680508>
- Yong Lin, Ranxin Shi, Xia Wang, and H.-M. S. (2009). Luteolin, a flavonoid with potentials for cancer prevention and therapy. *Curr Cancer Drug Targets*, 8(7), 634–646.
- Zheng, W., & Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5165–5170. <https://doi.org/10.1021/jf010697n>
- Zhu, F., Wang, J., Takano, H., Xu, Z., Nishiwaki, H., Yonekura, L., Yang, R., & Tamura, H. (2019). Rosmarinic acid and its ester derivatives for enhancing antibacterial, α -glucosidase inhibitory, and lipid accumulation suppression activities. *Journal of Food Biochemistry*, 43(2). <https://doi.org/10.1111/jfbc.12719>
- Zhu, H., Chen, S., Hao, S., Zhang, Z., Wang, W., & Yao, S. (2006). Double roles of hydroxycinnamic acid derivatives in protection against lysozyme oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1760(12), 1810–1818. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.08.007>

RINGRAZIAMENTI

I primi doverosi e sentitissimi ringraziamenti vanno alla Professoressa Guglielmina Froidi, attenta relattrice e costante guida in questo percorso. Grazie di cuore per avermi mostrato il significato di competenza e per ciò che mi ha trasmesso, per la disponibilità e la sua presenza gentile e fondamentale.

Ringrazio la Dott.ssa Cinzia Ferranti per l'opportunità, la disponibilità e l'aiuto nel Progetto Wikipedia.

Un grande ringraziamento va alla Dott.ssa Francine, che ha avuto un ruolo fondamentale nella stesura di questo elaborato ma soprattutto nelle avventure di ogni singolo giorno in laboratorio. La ringrazio per la sua pazienza e dedizione, a lei va la mia stima per la sua grande passione e tenacia. Grazie per aver creduto in me e per avermi trasmesso la voglia di puntare sempre in alto.

Un grazie infinito ai miei amici, che mi hanno da sempre sostenuto e accompagnato.

Grazie ad Alberto, Silvia, Valentina e Sara. Importanti in questo percorso perché fedeli compagni di viaggio.

Grazie alle mie coinquiline, presenti e passate. Una parte fondamentale per me in questo percorso universitario e nella vita di tutti i giorni.

A Paolo, il mio più grande ed essenziale sostenitore.

Alla mia famiglia, a cui devo tutto e dedico questo giorno, perché tutti i loro sacrifici mi hanno permesso di raggiungere questo traguardo.