

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA



DIPARTIMENTO DI FARMACIA

Corso di Laurea Magistrale in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

Tesi di Laurea

Analisi ed attività farmacologica del succo di *Citrus bergamia* Risso

Candidato

Federica Lia

Relatori

Prof.ssa Alessandra Braca

Dott. Mario Giorgi

ANNO ACCADEMICO 2012 – 2013

Riassunto

Citrus bergamia Risso et Poiteau, famiglia delle Rutaceae, è un albero di 4 m di altezza coltivato principalmente in Italia (95%), nella fascia costiera della provincia di Reggio Calabria che va da Villa San Giovanni fino a Gioiosa Jonica. La pianta ha rami irregolari e foglie di colore verde scuro, alterne, oblunghe, prive di peluria e ricche di ghiandole contenenti olio essenziale. I frutti sono tondeggianti, qualche volta sferici, con buccia liscia e spessa che va dal verde al giallo con il progredire della maturazione. Tre sono le principali cultivar di questo albero: Fantastico, Femminello e Castagnaro.

Il bergamotto è utilizzato soprattutto nella produzione di olio essenziale, ottenuto dopo pelatura della buccia del frutto. Il succo, a differenza degli altri agrumi, è considerato uno scarto della produzione di olio essenziale; infatti, finora non ha trovato efficace impiego nell'industria alimentare a causa della ristretta disponibilità e del gusto aspro. Solo nell'ultimo decennio, il succo ha riscosso un maggiore interesse tra gli agricoltori, il Consorzio del Bergamotto e gli ambienti della ricerca, poiché ha una peculiare ricchezza di flavanoni rispetto agli altri agrumi.

L'interesse verso il succo di bergamotto è scaturito dalla volontà di analizzare i componenti del fitocomplesso e successivamente testarli sull'uomo, per uno sfruttamento migliore ai fini nutraceutici e commerciali.

Lo studio è stato articolato in due fasi:

- *Analisi fitochimica del succo.* Caratterizzazione del complesso flavonoidico tramite cromatografia liquida ad alta pressione accoppiata alla spettrometria di massa (LC-PDA-MS);
- *Analisi clinica* durante e dopo la somministrazione di 20 ml di succo, per 60 giorni.

L'analisi fitochimica è stata rivolta allo studio di eventuali differenze fra i costituenti del succo di ogni singola cultivar di bergamotto (fantastico, femminello, castagnaro) e il succo preparato tramite mezzi industriali. I risultati ottenuti hanno mostrato un'eguaglianza da un punto di vista qualitativo tra le tre cultivar e una differenza rispetto al fitocomplesso del succo industriale. A differenza dei dati riportati in letteratura, abbiamo riscontrato nel succo industriale la presenza in tracce di furanocumarine, tipiche del flavedo degli agrumi. Inoltre, è stato riscontrato un picco corrispondente ad un derivato della neoeriocitrina, che è stato tentativamente identificato come 3-idrossi-3-metilglutarilneoriocitrina, la cui completa caratterizzazione si rende auspicabile in futuro mediante isolamento del composto puro.

L'analisi clinica invece ha previsto la valutazione dell'effetto terapeutico del succo di bergamotto monitorando i parametri emocoagulativi in soggetti sani, o comunque non sottoposti a terapie antiaggreganti o anticoagulanti, così come a terapie ipolipidizzanti o supplementazioni vitaminiche, al fine di accertare se, dopo l'assunzione per via orale di tale prodotto, si siano registrate nei suddetti parametri, variazioni tali da poter dimostrare una riduzione degli indici di attivazione della coagulazione. Dopo il periodo di assunzione del succo di bergamotto è stata riscontrata una riduzione dei livelli di colesterolo totale, LDL e trigliceridi in più della metà dei soggetti studiati, così come si è avuto un aumento del colesterolo HDL. Inoltre gli indici infiammatori quali VES e PCR sono aumentati, mentre il Fibrinogeno e il Fattore VIII si sono ridotti. I parametri che si riferiscono all'elettroforesi proteica si sono ridotti anche se in maniera meno evidente rispetto agli altri, tranne che nel caso dell'alfa-2-globulina.

INDICE

Riassunto.....	ii
Capitolo 1.....	2
GENERALITÀ BOTANICHE	2
1.1 Rutaceae	2
1.1.1 Genere Citrus.....	2
1.2 <i>Citrus bergamia</i> Risso et Poiteau.....	3
1.2.1 Cenni storici.....	3
1.2.2 Botanica.....	3
1.2.3 Caratteristiche delle tre cultivar.....	6
1.2.4 Distribuzione geografica	10
1.2.5 Usi tradizionali	10
Capitolo 2.....	12
PRECEDENTI STUDI FITOCHIMICI E BIOLOGICI.....	12
2.1 Studi fitochimici.....	12
2.1.1 Flavonoidi.....	12
2.1.2 Furanocumarine	17
2.1.3 Derivati dell'acido caffeico	17
2.1.4 Fitochimica del succo delle tre cultivar di <i>Citrus bergamia</i>	18
2.2 Precedenti studi biologici dei flavonoidi in vitro e in vivo.....	20
2.2.1 Attività biologica dei flavonoidi.....	20
2.2.1.1 Attività ipolipidica, protettiva del fegato e ipoglicemica	21
2.2.1.2 Antiossidante	22
2.2.1.3 Ipocolesterolemizzante	22
2.2.1.4 Cardioprotettiva.....	22
2.2.2 Attività biologica delle furanocumarine.....	23
Capitolo 3.....	24
RISULTATI E DISCUSSIONE	24
3.1 Studi fitochimici.....	24
3.1.1 Analisi LC-PDA-MS	24
3.1.2 Identificazione dei composti.....	28
3.2 Studi clinici	37
3.2.1 Analisi dell'effetto del succo di bergamotto in vivo	37
Capitolo 4.....	43

PARTE SPERIMENTALE	43
4.1 Studio fitochimico	43
4.1.1 Estrazione delle tre cultivar	43
4.1.2 Estrazione succo industriale	44
4.2 Studio clinico	46
4.2.1 Studio di riferimento.....	46
4.2.1.1 Campione di volontari	46
4.2.1.2 Estrazione del succo e somministrazione	46
4.2.1.3 Prelievo e dosaggi.....	46
4.2.2 Studio clinico 2013.....	49
4.2.2.1 Volontari.....	49
4.2.2.2 Dosaggio e prelievo	49
Capitolo 5.....	50
MATERIALI E METODI	50
5.1 Studi fitochimici.....	50
5.1.1 Metodi chimico-fisici	50
5.1.1.1 Spettri di massa.....	50
5.1.1.2 HPLC-PDA-ESI-MS	50
5.2 Studi clinici	52
5.2.1 Analisi della VES	52
5.2.2 Analisi Fibrinogeno e Fattore VIII.....	52
5.2.3 Analisi Colesterolo totale, HDL, LDL, trigliceridi e proteine totali	52
5.2.4 Analisi PCR.....	52
5.2.5 Analisi dell'elettroforesi proteica	53
CONCLUSIONI	54
BIBLIOGRAFIA	56

SCOPO DELLA TESI

Questo lavoro di tesi è stato condotto presso il Dipartimento di Farmacia dell'Università di Pisa, mentre i test di attività biologica sono stati eseguiti in collaborazione con il Dott. Gianluca Sottilotta, medico presso Centro di Emofilia- Trombosi ed Emostasi, Azienda Ospedaliera "Bianchi-Melacrino-Morelli" di Reggio Calabria.

L'interesse verso il succo di bergamotto, *Citrus bergamia* Risso et Poiteau, famiglia Rutaceae, è scaturito dalla volontà di analizzare i componenti del fitocomplesso e successivamente testarli in vivo, per una utilizzazione migliore ai fini nutraceutici e commerciali.

Lo studio è incentrato sulla ricerca e la valutazione dell'effetto terapeutico del succo di bergamotto e consiste sul monitoraggio dei parametri emocoagulativi in soggetti sani, o comunque non sottoposti a terapie antiaggreganti o anticoagulanti, così come a terapie ipolipidizzanti o supplementazioni vitaminiche, al fine di accertare se, dopo l'assunzione per via orale di tale prodotto, si siano registrate dei suddetti parametri, tali da poter dimostrare una riduzione degli indici di attivazione della coagulazione.

Lo studio è stato articolato in due fasi:

- *Analisi fitochimica del succo.* Caratterizzazione del complesso flavonoidico tramite cromatografia ad alta pressione (HPLC) e Spettrometria di massa (LC-PDA-MS);
- *Analisi clinica* durante e dopo la somministrazione di 20 ml di succo, per 60 giorni.

Un primo obiettivo del presente studio è rappresentato dal miglioramento della qualità di vita dei soggetti, che potranno scongiurare l'insorgere di eventi trombotici, cardiovascolari o ischemici mediante l'assunzione del succo di bergamotto. Un altro obiettivo, raggiungibile e misurabile grazie ai risultati acquisiti, consisterebbe nella definitiva conferma delle proprietà del bergamotto, utilizzabile anche efficacemente in campo medico. Ciò permetterebbe un più ampio e razionale impiego di questo agrume, con vantaggi non trascurabili per l'economia della Calabria.

Capitolo 1

GENERALITÀ BOTANICHE

1.1 Rutaceae

Le Rutaceae sono una famiglia di piante Angiosperme dicotiledoni, della sottoclasse delle Rosidae; comprendono circa 1600 specie, in gran parte legnose, ma alcune anche erbacee. Sono caratterizzate dalla presenza di ghiandole oleifere, che producono oli aromatici.

È una famiglia subcosmopolita a distribuzione prevalentemente tropicale e subtropicale. Appartengono a questa famiglia gli agrumi, appartenente al genere *Citrus*, per lo più originari della Cina e coltivati nelle regioni temperate calde (Maugini *et al.*, 2006).

1.1.1 Genere *Citrus*

Il genere *Citrus* è appartenente alla sottofamiglia Aurantioideae, e si ritiene abbia avuto origine in Asia tropicale e subtropicale.

Generalmente, comprende tre specie e numerosi ibridi naturali e coltivati, compresi alberi come arancio, limone, pompelmo e limetta. La classificazione del genere è complessa, ma si individuano principalmente tre specie:

- *Citrus maxima* L.;
- *Citrus medica* L.;
- *Citrus reticulata* L.

Tutti gli altri membri del genere, prima considerati specie e sottospecie, sono da considerarsi ibridi tra queste tre specie. Si presentano sotto la forma di grandi arbusti sempreverdi o di alberelli che raggiungono i 5-15 m di altezza.

I frutti sono fragranti e molti sono ricchi di succo. Contengono una larga percentuale di acido citrico, che conferisce ai frutti il caratteristico odore e sapore astringente. Sono ottime fonti di vitamina C.

Dal momento che gli alberi del genere ibridizzano molto facilmente, tutti gli alberi coltivati sono prodotti innestando le desiderate cultivar su piante progenitrici.

Gli alberi del genere *Citrus* non sono generalmente resistenti alle gelate. Pochi ibridi possono sopportare temperature sotto il punto di gelo (0 C) ma non producono frutti di qualità. Gli alberi crescono bene in un clima costantemente soleggiato e umido e in terreni ben irrigati. Sebbene siano latifoglie, sono sempreverdi e non perdono mai il fogliame. Gli alberi fioriscono in primavera e i frutti cominciano a maturare in autunno o all'inizio dell'inverno, a seconda della specie. Il loro succo tende ad addolcirsi con la maturazione (Maugini *et al.*, 2006).

1.2 *Citrus bergamia* Risso et Poiteau

1.2.1 Cenni storici

Le notizie di carattere storico sulle modalità e i tempi che hanno segnato l'introduzione del bergamotto nella provincia di Reggio Calabria sono piuttosto controverse. Fra le probabili località d'origine si pensa alla Grecia, alla Spagna e alle Canarie.

In uno scritto del reggino Morisani, apparso nel 1878 e riportato dal Mottareale nella rivista "L'Italia agricola" (1928), viene confermata la tradizione popolare secondo la quale Cristoforo Colombo avrebbe portato il bergamotto dalle Canarie, nella città di Berga (Spagna) dalla quale sarebbe poi giunto a Reggio Calabria intorno alla fine del Quattrocento. L'etimologia più attendibile della parola "bergamotto" è fornita da Sicur Barbe nel libro "Le parfumer français", pubblicato nel 1693. Egli fa derivare il nome "bergamotto" alla somiglianza del frutto con la *pera bergamotta*, il cui nome proverrebbe dal turco *Beg'- armudu*, "la principessa delle pere", con cui ha alcune somiglianze. Il primo bergamotteto a Reggio Calabria è stato impiantato nel 1750 da Nicola Parisi (Mangiola *et al.*, 1997).

1.2.2 Botanica

Alcuni botanici hanno considerato il bergamotto come un ibrido derivato dalla limetta dolce e dall'arancio amaro, con il quale condivide alcuni caratteri. Attualmente, prevale la convinzione che si tratti di una specie a sé, forse frutto di un innesto casuale, definita dai botanici con il nome di *Citrus bergamia* Risso et Poiteau. Tre sono le principali cultivar di questo albero:

- Castagnaro;
- Femminello;
- Fantastico.

La riproduzione si effettua sull'arancio amaro, al quarto anno della semina, ma occorre attendere tre anni perché l'albero cominci a dare i frutti.

La *pianta* di bergamotto non supera i 4 m di altezza. Ha rami irregolari e foglie di colore verde scuro, alterne, oblunge, prive di peluria e ricche di ghiandole contenenti olio essenziale.

I *frutti* sono tondeggianti, qualche volta sferici, con buccia liscia e spessa che va dal verde al giallo con il progredire della maturazione. Il peso varia dagli 80 ai 200 g. Essi sono costituiti da:

- Una parte esterna, *epicarpo* o *flavedo*, ricca di otricoli contenenti l'olio essenziale e di pigmenti, colorati dal verde al giallo. L'epicarpo è ricoperto all'esterno da una cuticola sottile contenente gli stomi.
- Una parte sottostante, *mesocarpo* o *albedo*, che presenta un tessuto bianco spugnoso, composto per il 20% da sostanze pectiche.
- Una parte interna, *endocarpo* o *polpa*, che rappresenta il 65-70% del frutto.

L'endocarpo contiene segmenti o spicchi, distribuiti intorno ad un asse centrale detto *medula*, di composizione spugnosa, come l'albedo. Gli spicchi sono avvolti da una leggera cuticola e contengono al loro interno le vescichette con il succo. I semi sono situati in prossimità dell'asse centrale. Il bergamotto comincia a fiorire nel corso degli ultimi giorni di marzo, nelle località soleggiate prossime al mare e per tutto aprile nelle zone più interne. La maturazione varia da novembre a marzo (Mangiola *et al.*, 1997).



Figura 1 Albero del bergamotto



Figura 2 Foglie e frutto Fantastico



Figura 3 Foglie e frutto Castagnaro



Figura 4 Foglie e frutto Femminello

1.2.3 Caratteristiche delle tre cultivar

Nelle Tabelle 1-3 si riportano le caratteristiche delle tre cultivar in relazione alla pianta, al frutto e alle caratteristiche produttive

Tabella 1 Caratteristiche della pianta delle tre cultivar

CARATTERISTICHE DELLA PIANTA	FANTASTICO	FEMMINELLO	CASTAGNARO
VIGORE	Forte	Debole	Medio
PORTAMENTO	Assurgente e compatto	Mediamente assurgente	Assurgente con densità semicompatta
SPINE	Assenti	Assenti	Assenti
FOGLIA	Ellittica con apice appuntito. Margine seghettato e lamina piana	Ellittica con apice appuntito. margine seghettato e lamina piana	Ellittica con apice appuntito. Margine seghettato e lamina piana
LUNGHEZZA DEL PICCIOLO	Medio	Medio	Medio
GRANDEZZA FIORI	Media	Media	Media
PRESENZA POLLINE	Abbondante e fertile	Abbondante e fertile	Abbondante e fertile
RESISTENZA AI VENTI	Bassa	bassa	bassa

Tabella 2 Caratteristiche del frutto delle tre cultivar

FRUTTO	FANTASTICO	FEMMINELLO	CASTAGNARO
COLORE BUCCIA	Crema	Crema	Crema
SUPERFICIE	Papillata con presenza di costole poche e superficiali	Finemente papillata	Grossolanamente papillata
FORMA	Simmetrica e obovoidale	Simmetrica e obovoidale	Simmetrica e obovoidale
PESO MEDIO	190 g	165 g	220 g
ATTACCO AL PEDUNCOLO	Forte	Medio	Forte
CICATRICE STILLARE	Presente, grande e piana	Presente, grande e piana	Presente, grande e piana
ADERENZA ALBEDO	Forte	Forte	Forte
SPESSORE BUCCIA	Medio	Medio	Medio
COLORE POLPA	Verde chiaro	Verde chiaro	Verde chiaro
RESA IN SUCCO	Media	Media	Media
SOLIDI TOTALI SOLUBILI	Basso	Basso	Medio
ACIDITA' TOTALE	Alta	Alta	Alta
SEMI	Numerosi e monoembrionici	Numerosi e monoembrionici	Numerosi e monoembrionici

Tabella 3 Caratteristiche produttive delle tre cultivar

CARATTERISTICHE PRODUTTIVE	FANTASTICO	FEMMINELLO	CASTAGNARO
FRUTTIFICAZIONE	Costante	Costante	Alternante
PRODUTTIVITÀ	Alta	Bassa	Alta
PERIODO MATURAZIONE	Dicembre- Gennaio	Dicembre- Gennaio	Dicembre- Gennaio
PERSISTENZA DEL FRUTTO SULLA PIANTA	Elevata	Elevata	Elevata
RESISTENZA DEL FRUTTO AI VENTI	Bassa	Bassa	Bassa

Di seguito si riportano le immagini dei frutti e della polpa delle tre cultivar.

Castagnaro

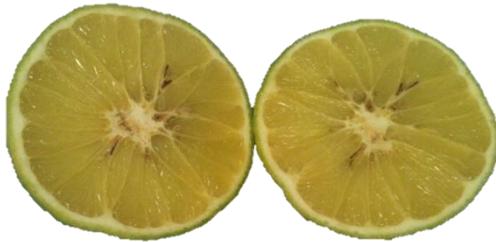


Figura 5 Castagnaro frutto aperto



Figura 6 Frutto Castagnaro

Fantastico

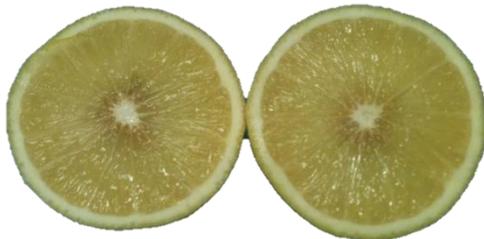


Figura 7 Fantastico frutto aperto



Figura 8 Frutto Fantastico

Femminello

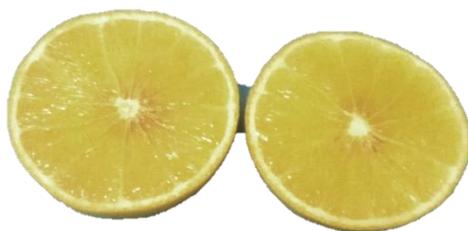


Figura 9 Femminello frutto aperto



Figura 10 Frutto Femminello

1.2.4 Distribuzione geografica

Il principale produttore di bergamotto è l'Italia. Il 95% della produzione viene coltivato in 1500 ettari distribuiti nella fascia costiera della provincia di Reggio Calabria, che va da Villa San Giovanni fino a Gioiosa Jonica. La produzione media annuale è di 200.000 kg di frutto.



Figura 11 Calabria



Figura 12 Zona di coltivazione

Il secondo maggiore produttore è la Costa d'Avorio. La diffusione del bergamotto in questo paese della costa atlantica dell'Africa ebbe inizio più di mezzo secolo fa. La produzione di essenza africana è sino a 3 volte inferiore, per ettaro di piantagione, rispetto a quella calabrese. La differenza dipenderebbe dalle metodiche produttive, dal clima e dalla composizione del terreno (ISMEA, Nocella, Report Bergamotto 10/5/2012).

1.2.5 Usi tradizionali

Il bergamotto viene utilizzato soprattutto nella produzione di olio essenziale, ottenuto dopo pelatura della buccia del frutto.

L'essenza di bergamotto, riconosciuta DOP dal 1999, è usata in questi ambiti:

- nell'industria *farmaceutica* per le proprietà antisettiche e antibatteriche;
- nell'industria *cosmetica* (in profumi, creme, saponi, aromaterapia) per l'intensa fragranza e freschezza;
- nell'industria *alimentare* come aromatizzante nella produzione di dolci, liquori e tea.

Il succo, a differenza degli altri agrumi, è considerato uno scarto della produzione di olio essenziale. Finora non ha infatti trovato efficace impiego nell'industria alimentare, a causa della ristretta disponibilità e del gusto aspro.

Solo nell'ultimo decennio, il succo ha riscosso un maggiore interesse tra gli agricoltori, il Consorzio del Bergamotto e gli ambienti della ricerca.

Capitolo 2

PRECEDENTI STUDI FITOCHIMICI E BIOLOGICI

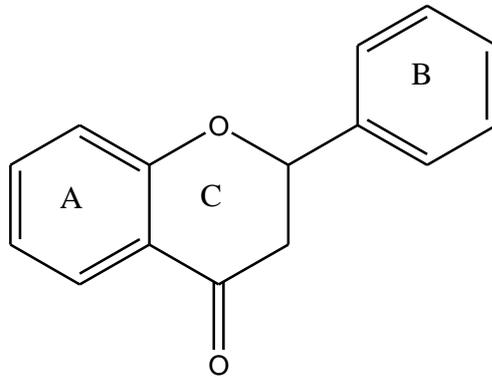
2.1 Studi fitochimici

Sulla base dei precedenti lavori d'indagine fitochimica, riportati in letteratura, sul succo di bergamotto preparato industrialmente, esso risulta essere chimicamente ricco di costituenti peculiari quali i flavonoidi (flavanoni, flavoni, 3-idrossi-3metil-glutaril flavanoidi), furanocumarine, derivati dell'acido caffeico, zuccheri e amminoacidi. In Tabella si riportano i principali componenti del succo di bergamotto evidenziando la differenza con il succo di limone. Si evidenzia la peculiare ricchezza di flavanoni rispetto al limone in cui è presente solo l'esperidina (Cautela *et al.*, 2008).

Table 1. Compositional Parameters of Bergamot Juice * Compared to the AJIN Reference Guideline for Lemon Juice

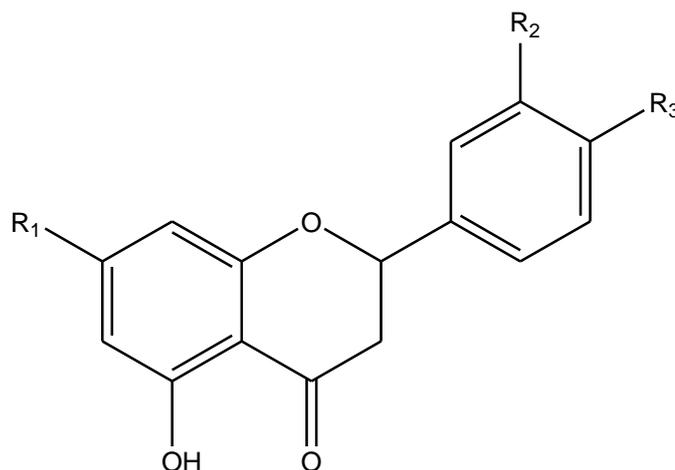
compositional parameters	bergamot juice				bergamot juice adjusted to 8.0 °Brix				lemon AJIN reference guide
	mean	SD	min	max	mean	SD	min	max	
soluble solids (%)	9.2	0.5	8.2	10.4					8
L-ascorbic acid (mg/L)	414	26	378	465	360	37	305	454	minimum 150
titration acidity at pH 8.1 (g/L)	44.8	4	38.9	51.5	38.9	3.8	32.2	49.2	44.8–62
D-isocitric acid (mg/L)	423	43	364	531	368	45	318	494	230–500
citric acid/isocitric acid ratio	107	14	80	137	93	13	72	132	maximum 200
L-malic acid (g/L)	1.6	0.5	0.9	2.9	1.4	0.5	0.7	2.5	1.00–7.05
formol number	24.2	3.1	19.9	30.1	21.1	3.2	16.4	26.1	13–26
ash (g/L)	3.2	0.23	2.81	3.61	2.78	0.20	2.48	3.37	2.02–4.03
sodium (mg/L)	17	5	9	26	15	4	8	24	maximum 30
potassium (mg/L)	1359	109	1169	1567	1181	114	992	1441	1100–2000
magnesium (mg/L)	92	17	67	123	80	15	58	113	70–120
calcium (mg/L)	76	12	57	98	66	12	49	89	45–160
sugars (g/L)									
glucose	12	2	9	14	10	1	8	13	3–12
fructose	12	2	9	15	10	1	8	13	3–11
sucrose	17	4	10	24	15	3	8	20	maximum 7.00
glucose/fructose	1	0.04	0.94	1.06	1.00	0.04	0.94	1.06	0.95–1.03
water-soluble pectins (mg/L)	308	28	247	361	268	28	206	314	maximum 700
amino-acids (mg/L)									
L-aspartic acid	222	10	201	241	193	14	170	223	300–800
L-glutamic acid	166	10	144	182	144	11	119	168	160–400
L-serine	180	5	169	194	156	11	139	180	135–370
L-asparagine	84	4	77	91	73	5	64	83	130–600
L-glycine	7	1	7	8	6	1	5	7	7–25
L-glutamine	23	1	22	25	20	1	18	23	maximum 45
L-histidine									maximum 10
GABA	66	3	61	70	57	4	51	66	60–185
L-threonine	29	5	21	36	25	4	17	34	10–30
L-alanine	84	6	74	97	73	7	61	90	80–260
L-arginine	30	4	21	35	26	4	18	31	maximum 100
L-proline	230	6	219	243	200	13	177	226	100–800
L-tyrosine	6	1	5	7	5	0	4	6	maximum 7
L-valine	12	2	9	19	10	2	8	18	8–35
L-methionine									maximum 5
L-isoleucine	6	1	4	8	5	1	3	7	3–10
L-leucine	8	2	5	12	7	2	4	11	3–10
L-phenylalanine	19	3	13	29	16	3	12	24	8–40
L-lysine	10	1	7	12	9	1	6	11	5–20
flavonoids HPLC (mg/L)									
neohesperidin	121	22	64	164	105	18	57	140	
eriodictin	8	3	5	12	7	2	4	11	
naringin	14	8	5	34	12	7	4	26	
naringenin	106	22	68	147	92	19	57	125	
hesperidin	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	200–800
neohesperidin	64	14	41	98	56	13	36	86	
flavonoids according to Davis (mg/L)	547	39	480	615	476	40	397	540	maximum 1500

I flavonoidi sono una classe di metaboliti secondari molto diffusa nel regno vegetale, di norma sotto forma glicosidata. Dal punto di vista strutturale sono caratterizzati da un'unità base rappresentata da uno scheletro a 15 atomi di carbonio detto flavano (γ -benzopirone), costituito da due anelli benzenici (A e B) tenuti insieme da una catena a 3 atomi di carbonio facente parte del sistema eterociclico del pirano



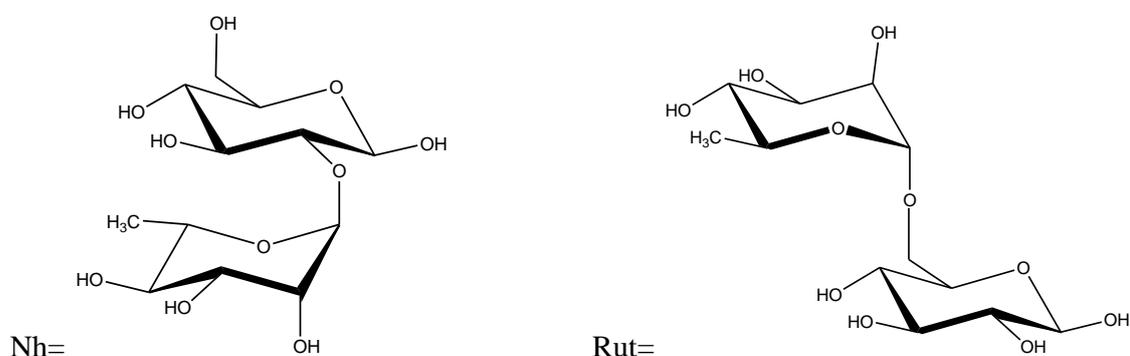
Nel succo di bergamotto, sono stati identificati come elementi principali, tramite analisi HPLC-ESI-MS/MS:

- **flavanoni O-glicosilati:** eriocitrina, neoeriocitrina, naringina, e neoesperidina (Figura 13) (Gattuso *et al.*, 2006)
- **flavanoni O-glicosilati esterificati** con due molecole di ossalato: neoeriocitrina-di-ossalato, naringina-di-ossalato, neohesperidina-di-ossalato (Figura 13) (Gardana *et al.*, 2008)



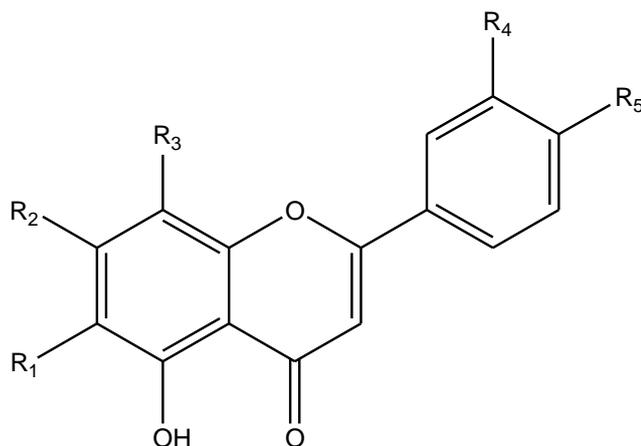
R₁	R₂	R₃	STRUTTURA	Nome comune
<i>O</i> -Rut	OH	OH	eriodictiolo 7- <i>O</i> -rutinoside	eriocitrina
<i>O</i> -Nh	OH	OH	eriodictiolo 7- <i>O</i> -neohesperidoside	neeriocitrina
<i>O</i> -Nh-di-ox	OH	OH		neeriocitrina-di-ox
<i>O</i> -Nh	H	OH	naringenina 7- <i>O</i> -neohesperidoside	naringina
<i>O</i> -Nh-di-ox	H	OH		naringina-di-ox
<i>O</i> -Nh	OH	OMe	esperetina 7- <i>O</i> -neohesperidoside	neoesperidina
<i>O</i> -Nh-di-ox	OMe	OH		neoesperidina-di-ox

Figura 13 Flavanoni *O*-glicosilati



Secondo lo studio di Gardana *et al.*, 2008, lo spettro UV del succo di bergamotto presenta alcuni picchi che corrispondono a una struttura di derivati flavanonici i cui spettri di massa hanno dimostrato ioni molecolari a m/z 739 $[M-H]^-$, 723 $[M-H]^-$ e 753 $[M-H]^-$. La frammentazione di questi ioni porta all'ottenimento di ioni corrispondenti a m/z 651 $[(M-H)-62]^-$, 602 $[(M-H)-102]^-$, 609 $[(M-H)-144]^-$. Tutti i dati ottenuti fanno presumere agli autori che gli ioni molecolari a m/z 739, 723 e 753 potrebbero essere la neeriocitrina, naringina ed esperidina esterificati con due molecole di acido ossalico, ma non spiegano tramite quale frammentazione di legame si ottengono i relativi frammenti.

- **flavoni C-glicosilati e flavoni O-glicosilati** (Figura 14) (Gattuso *et al.*, 2006)



R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	STRUTTURA	COMPOSTO
Glc	OH	Glc	OH	OH	luteolina 6,8-di-C-glucoside	lucenina-2
Glc	OH	Glc	H	OH	apigenina 6,8-di-C-glucoside	vicenina-2
Glc	OH	Glc	OMe	OH	chrisoeriolo 6,8-di-C-glucoside	stellarina-2
Glc	OH	Glc	OH	O-Me	diosmetina 6,8-di-C-glucoside	lucenina 2,4'-metiletere
H	O-Nh	H	H	O-Glc	apigenina 7-O-neohesperidoside-4'-glucoside	rhoifolina 4'-glucoside
H	O-Nh	H	OMe	O-Glc	chrisoeriolo 7-O-neohesperidoside-4'-glucoside	
Glc	OH	H	H	OH	apigenina 6-C-glucoside	isovitexina
H	OH	Glc	OMe	OH	chrisoeriolo 8-C-glucoside	scoparina
H	OH	Glc	OH	OMe	diosmetina 8-C-glucoside	orientina 4'-metiletere
H	O-Nh	H	H	OH	apigenina 7-O-neohesperidoside	rhoifolina
H	O-Nh	H	OMe	OH	chrisoeriolo 7-O-neohesperidoside	
H	O-Nh	H	OH	OMe	diosmetina 7-O-neohesperidoside	neodiosmina

Figura 14 Flavoni C-glicosidi e flavoni O-glicosidi

- **HMG-flavanoni** (Sindona *et al.*, 2010): brutieridina e melitidina. (Figura 15 e 16)
 Questi composti differiscono con gli altri flavonoidi per la presenza dell'acido 3-idrossi-3-metilglutarico legato come estere sulla porzione zuccherina del neoesperidoside. La brutieridina, si trova nell'albedo del bergamotto. Il suo aglicone è un derivato idrossilato e metossilato della naringenina.

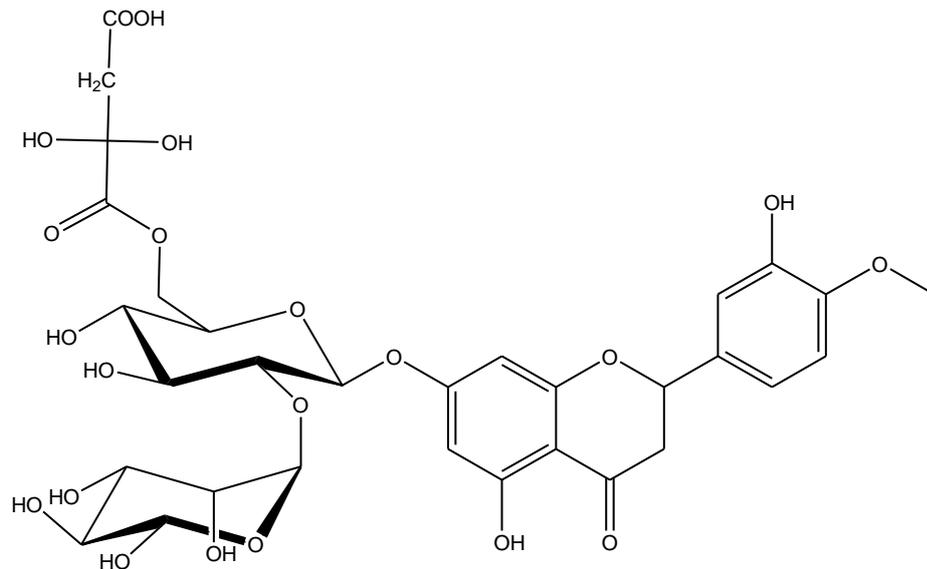


Figura 15 Brutieridina

La melitidina si trova anch'essa nell'albedo del bergamotto. E' un flavanone glicosilato il cui aglicone è la naringenina.

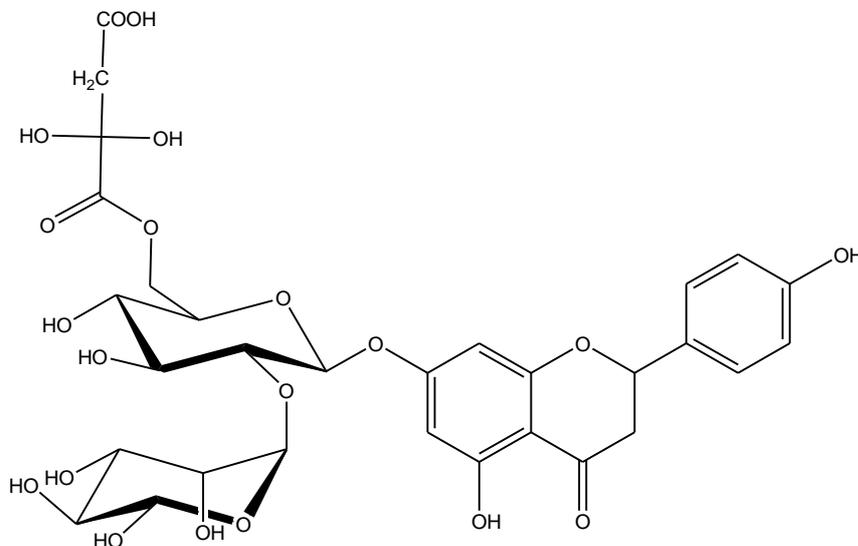


Figura 16 Melitidina

2.1.2 Furanocumarine

La struttura chimica delle furanocumarine consiste in una cumarina fusa con un anello furanico. L'anello furanico può essere fuso alla cumarina in due modi principali, dando luogo a due classi di isomeri, le furanocumarine lineari (capostipite psoralene) e le furanocumarine angolari (capostipite angelicina). Molte furanocumarine sono tossiche e fotomutagene e sono prodotte dalle piante principalmente come meccanismo di difesa dai predatori. Sono presenti nella buccia di molti agrumi (in particolare di bergamotto).

Nel succo di bergamotto sono presenti bergaptene (Figura 17) e bergamottina (Figura 18) (Gattuso *et al.*, 2006).

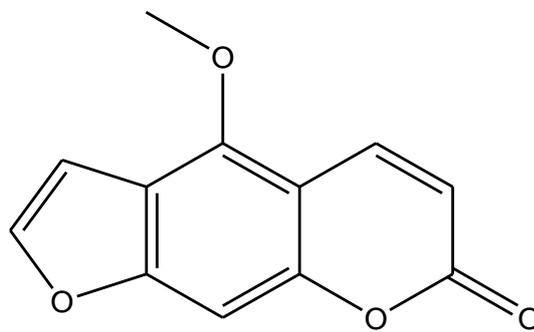


Figura 17 Bergaptene

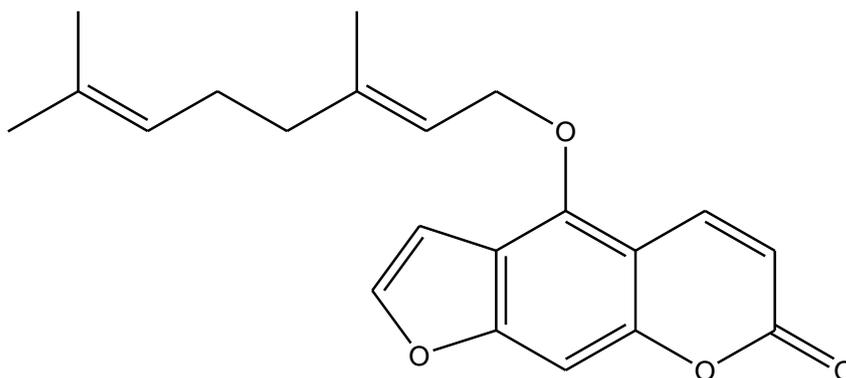
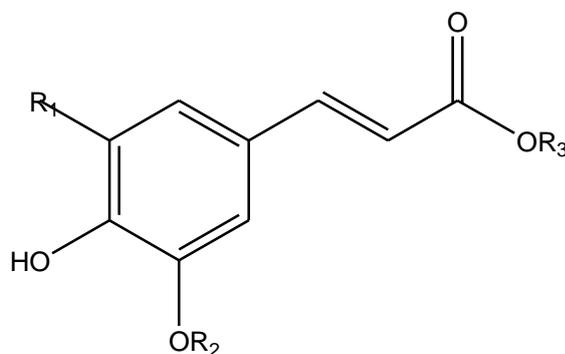


Figura 18 Bergamottina

2.1.3 Derivati dell'acido caffeico

L'acido caffeico è il più comune acido idrossicinnamico delle piante, che è presente in tutte le piante superiori e che, sotto forma di estere (comuni quello con l'acido chinico) si

ritrova spesso insieme agli acidi ferulico e sinapico. Di essi sono noti anche i corrispondenti alcoli che, per dimerizzazione forniscono i lignani (Morelli *et al.*, 2005). Si riportano in Figura 19 i derivati dell'acido caffeico riscontrati nel succo di bergamotto da Gardana *et al.*, 2008.



R ₁	R ₂	R ₃	STRUTTURA
H	COCH ₃	COCH ₃	acido di-acetil caffeico
H	CH ₃	esoso	acido ferulico esoso
OCH ₃	CH ₃	esoso	acido sinapico esoso

Figura 19 Derivati acido caffeico

2.1.4 Fitochimica del succo delle tre cultivar di *Citrus bergamia*

L'unico studio effettuato sulla differente distribuzione dei flavonoidi e furanocumarine nelle tre cultivar del bergamotto è stato eseguito nel 2007 (Gattuso *et al.*, 2007). Secondo gli autori, i contenuti trovati per tutti i composti sono inferiori a quelli riportati nel loro studio sul succo ottenuto industrialmente (Gattuso *et al.*, 2006) e questo può essere spiegato dalla differente distribuzione del fitocomplesso tra la buccia e l'endocarpo. Il succo industriale è arricchito dal rilascio dei componenti dell'albedo e flavedo. In Figura si riportano i cromatogrammi delle tre cultivar.

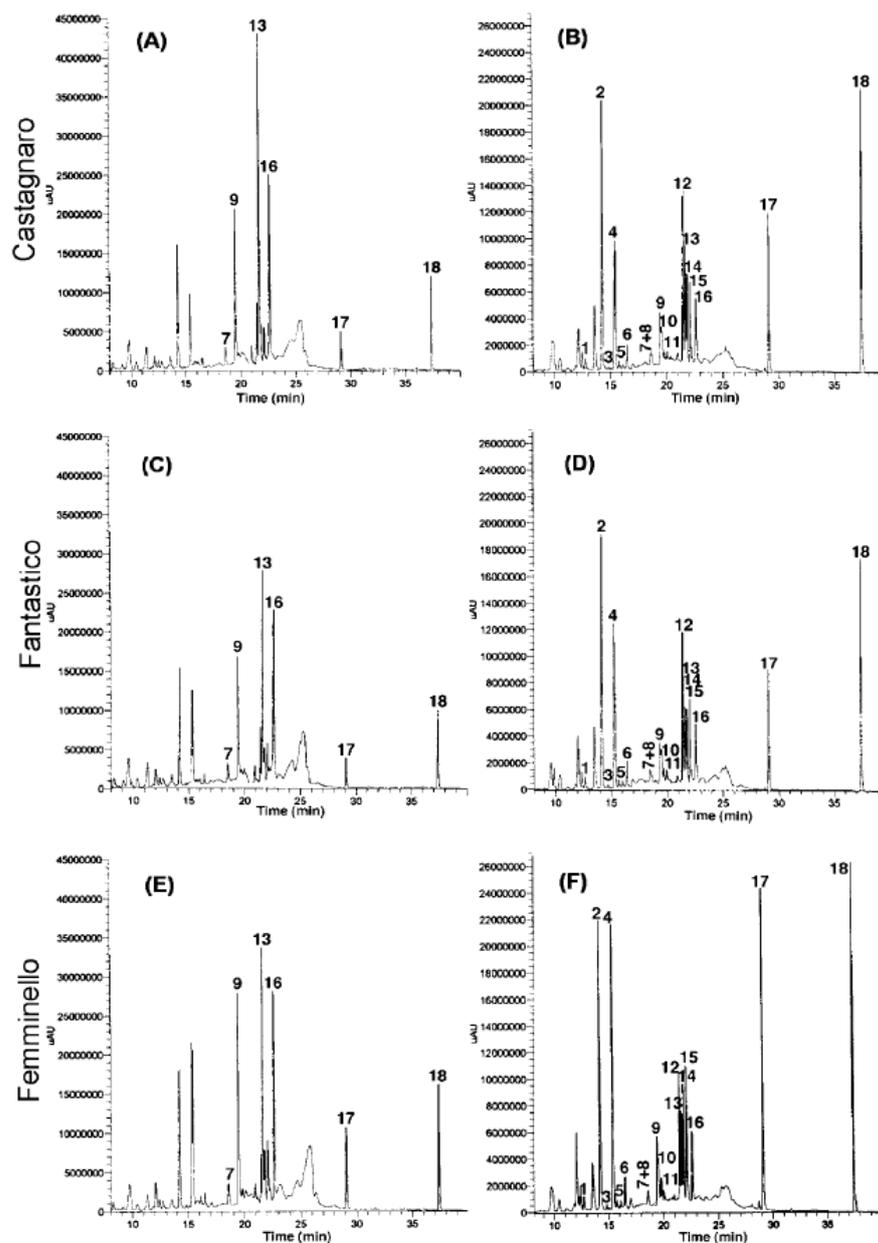


Figure 1. Typical DAD chromatograms of bergamot juices recorded at 278 nm (left) and 325 nm (right) from (A, B) "Castagnaro", (C, D) "Fantastico", and (E, F) "Femminello". Components 1–18 were identified as follows: 1, lucenin-2; 2, vicerin-2; 3, stellarin-2; 4, lucenin-2 4'-methyl ether; 5, rhoifolin 4'-glucoside; 6, chrysoeriol 7-O-neohesperidoside-4'-glucoside; 7, eriocitrin; 8, isovitexin; 9, neohesperidin; 10, scoparin; 11, orientin 4'-methyl ether; 12, rhoifolin; 13, naringin; 14, chrysoeriol 7-O-neohesperidoside; 15, neodiosmin; 16, neohesperidin; 17, bergapten; 18, bergamottin.

In accordo con la letteratura (Kawaii *et al.*, 1999; Gattuso *et al.*, 2006), i flavanoni-*O*-glicosilati naringina, neoesperidina e neohesperidina sono i derivati flavonoidici più abbondanti e le tre cultivars presentano fra loro differenze quantitative. E' stato effettuato uno studio quantitativo del fitocomplesso di ogni singola cultivar. In particolare, la naringina (picco **13**) è più abbondante nella cultivar Castagnaro (129.8 mg/L), mentre nel Femminello ha un quantitativo intermedio (104 mg/L), che nel Fantastico scende a 83.5 mg/L. La neohesperidina (picco **9**) è più ricca nel succo di Femminello (88.3 mg/L). Di seguito, il Femminello risulta la cultivar più ricca di flavonoidi totali (512 mg/L), mentre il Castagnaro ne possiede 435 mg/L e il Fantastico 373 mg/L.

Per quel che riguarda le furanocumarine: il bergaptene (picco **17**) è più abbondante nel succo di Femminello (10.0 mg/L), il Fantastico ne possiede 7.6 mg/L ed infine il meno abbondante è il Castagnaro 6.7 mg/L; la bergamottina (**18**) è contenuta in quantità pari a 40.2 mg/L nel Femminello, 27.2 mg/L nel Castagnaro e 23.5 mg/L nel Fantastico. Si riportano in tabella i dati ottenuti dall'analisi quantitativa.

Table 3. Flavone-C-glucosides (1–4, 8, 10, and 11), Flavone-O-glycosides (5, 6, 12, 14, and 15), Flavanone-O-glycosides (7, 9, 13, and 16), and Furocoumarins (17 and 18): Contents of Bergamot Juice (mg/L)^a

		"Castagnaro"		"Fantastico"		"Femminello"	
		mean	range	mean	range	mean	range
Flavonoids							
1	lucenin-2	2.2 a	2.1–2.4	2.5 a	2.3–2.6	3.3 b	3.1–3.5
2	vicenin-2	47.5 a	46.5–49.2	44.1 b	42.6–44.8	55.2 c	54.6–58.4
3	stellarin-2	0.6 ns	0.5–0.6	0.7 ns	0.6–0.8	1.1 ns	0.9–1.3
4	lucenin-2 4'-OMe	25.4 a	22.1–27.5	32.7 b	30.5–34.6	62.8 c	60.5–66.8
5	rhofolin 4'-O-Glu	1.2 ns	1.0–1.4	1.2 ns	1.1–1.3	1.3 ns	1.2–1.3
6	chrysoeriol 7-O-Nh-4'-O-Glu ^b	3.8 a	3.6–3.9	4.1 a	3.8–4.4	5.3 b	4.8–5.3
7	eriocitrin	8.4 ns	7.9–9.4	10.8 ns	9.6–11.7	10.2 ns	10.2–13.5
8	isovitexin	2.5 b	2.4–2.6	2.2 a	2.1–2.3	3.1 c	2.8–3.2
9	neeroerocitrin	62.6 b	59.8–64.5	52.2 a	50.3–57.8	88.3 c	85.4–94.5
10	scoparin	5.4 a	5.1–5.9	5.9 a	5.5–6.8	9.1 b	8.4–10.1
11	orientin 4'-OMe	1.7 a	1.3–1.8	1.9 a	1.5–2.1	4.2 b	3.9–4.8
12	rhofolin	28.9 b	26.5–29.8	26.2 b	25.8–30.4	22.8 a	19.8–23.8
13	naringin	129.8 c	125.8–136.7	83.5 a	79.5–85.4	104.5 b	101.2–109.7
14	chrysoeriol 7-O-Nh ^b	10.6 a	9.5–11.4	9.3 a	8.6–10.1	17.2 b	15.6–20.5
15	neodiosmin	15.3 a	14.5–16.8	15.5 a	14.7–16.1	27.1 b	26.1–29.7
16	neohesperidin	89.5 b	85.7–91.2	80.0 a	76.2–82.4	96.4 c	95.4–101.2
Furocoumarins							
17	bergapten	6.7 a	6.4–7.2	7.6 b	7.2–8.5	10.0 c	9.5–11.8
18	bergamottin	27.2 b	26.4–29.5	23.5 a	22.5–24.6	40.2 c	38.5–43.7

^a Different letters in the same row represent significant differences at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test (ns = not significant). ^b O-Neohesperidose.

2.2 Precedenti studi biologici dei flavonoidi in vitro e in vivo

2.2.1 Attività biologica dei flavonoidi

Molte sono le azioni farmacologiche dei flavonoidi. Fra queste possiamo ricordare:

- **Vaso-protettore:** riduzione della permeabilità e fragilità delle pareti interne (endotelio) dei capillari, mentre ne aumentano contemporaneamente la resistenza (effetto capillarotropo);
- **Antiossidante** della vitamina C, per cui ne ritardano l'ossidazione e ne prolungano gli effetti;
- **Diuretica**, per l'inibizione della fosfatasi renale;
- **Antispasmodica**, per antagonismo verso i recettori acetilcolinici, soprattutto sulla muscolatura liscia del tratto gastrointestinale;
- **Antinfiammatoria**, per inibizione enzimatica del rilascio di mediatori dell'infiammazione e stabilizzazione delle membrane cellulari;
- **Antimicrobica** (inibizione di alcuni sistemi enzimatici);
- **Epatoprotettrici**.

(Chiereghin, 2005). Dopo ingestione come cibo, i flavanoni glicosidati sono metabolizzati dalla microflora batterica intestinale nei rispettivi agliconi, che possiedono proprietà antiossidante, anticancerogene, epatolipidica e antinfiammatoria. Naringina ed esperidina possono legare il recettore degli estrogeni o inibire l'attività dell'aromatasi, l'enzima che converte gli androgeni in estrogeni. E' stato trovato che la naringina abbassa il colesterolo totale e abbassa la densità delle lipoproteine nel plasma, mentre l'esperidina riduce i livelli dei trigliceridi nel plasma (Gardana *et al.*, 2008).

Inoltre, i flavonoidi estratti dal succo di bergamotto sono stati studiati rispetto la loro attività:

- Ipolipidica e protettiva del fegato
- Antiossidante
- Ipocolesterolemizzante
- Ipoglicemica
- Cardioprotettiva

2.2.1.1 Attività ipolipidica, protettiva del fegato e ipoglicemica

Tale effetto ipolipidemico e protettore è stato studiato, in vivo, nei ratti iperlipidici. Il consumo cronico (1 mL/ratto/giorno) provoca una significativa riduzione nel siero di colesterolo, trigliceridi e livelli di LDL, ma un incremento dei livelli di HDL. Le osservazioni istopatologiche hanno dimostrato la capacità del succo di *Citrus bergamia* a proteggere il parenchima epatico. Inoltre, è stato esaminato l'aumento dell'escrezione di steroli neutri fecali e biliari. Il consumo continuo del succo potrebbe ridurre il rischio di alcune malattie cardiovascolari (Miceli *et al.*, 2007).

In uno studio di Mollace *et al.*, 2011 si riscontra l'attività ipolipidica e ipoglicemica in 237 soggetti affetti da iperlipidemia con e senza iperglicemia, a cui viene somministrato il succo industriale di bergamotto. Vengono ridotti LDL e colesterolo totale con relativo aumento di cHDL, riduzione dei livelli di trigliceridi e una riduzione significativa di glucosio nel sangue. Inoltre, l'estratto inibisce l'enzima HMG-CoA riduttasi e aumenta l'attività vasodilatatoria reattiva. Per valutare le proprietà nutraceutiche del bergamotto, gli autori hanno concentrato il succo in una forma di polvere molto ricca di polifenoli: neoeriocitrina, neoesperidina, naringina e, in minime quantità rispetto agli altri, brutieridina e melitidina.

2.2.1.2 Antiossidante

E' stato effettuato il test di attività antiossidante mediante il DPPH (radicale 2,2-difenil-1-picrilidrazil). Il quenching del DPPH è principalmente dovuto ai quattro flavonoidi recanti l'anello "B" catecolico. Il succo Fantastico e Castagnaro hanno presentato una buona attività antiossidante (46 e 44% rispettivamente), mentre il Femminello ha la più alta attività radical scavenger, pari al 49% (Gattuso *et al.*, 2007).

2.2.1.3 Ipocolesterolemizzante

Recentemente sono state scoperte due nuove molecole, brutieridina e melitidina (Sindona *et al.*, 2010) le quali sono analoghi strutturali delle statine. Esse, avendo struttura compatibile con il sito attivo dell'enzima HMG-reduttasi, riescono a bloccare la riduzione dell'acido 3-idrossi-3-metil glutarico coniugato al coenzima-A (HMG-CoA) ad acido mevalonico.

Gli autori (Leopoldini *et al.*, 2010), offrono analisi dettagliate delle caratteristiche del legame che si instaura fra questi composti e l'enzima 3-idrossi-3-metilglutaril-CoA riduttasi.

Un'altra ricerca (Lombardo *et al.*, 2010) descrive l'isolamento ed estrazione del fitocomplesso dal frutto di bergamotto a cui sono state eliminate le cuticole esterne ed il flavedo, per ottenere una miscela poi sottoposta ad una serie di processi per ottenere un estratto secco. Presentano, inoltre, i risultati di test effettuati su 100 soggetti, affetti da familiarità (primitive familiar hypercolesterolaemia) associato e non a ipertriglicemia, riscontrando risultati rilevanti in termini di riduzione dei livelli plasmatici di colesterolo totale LDL, aumento di HDL e una riduzione dei livelli plasmatici di trigliceridi.

2.2.1.4 Cardioprotettiva

L'attività cardioprotettiva è stata studiata nei confronti del danno ischemico. Attività sul genere *Citrus* in cui è presente la naringenina. In un modello in vivo d'infarto acuto nel ratto, la naringenina (100 mg / Kg ip) ha ridotto significativamente il danno cardiaco indotto da I / R. (ischemia/reperfusion). Questo effetto è antagonizzato dalla paxillina, BK-bloccante selettivo. La naringenina ha portato al miglioramento dei parametri funzionali post-ischemici e di riduzione del danno miocardico (Testai *et al.*, 2013).

2.2.2 Attività biologica delle furanocumarine

Le furanocumarine sono responsabili dell'inibizione dell'attività dei sistemi microsomiali epatici. Si ha un blocco dell'attività di un enzima e pertanto i farmaci saranno metabolizzati in misura inferiore dalla stessa via enzimatica, con conseguente accumulo e persistenza dell'effetto farmacologico. Un esempio noto è sul succo di pompelmo, *Citrus paradisi* M. L'utilizzo simultaneo del succo di pompelmo, contenente anche bergamottina, e di alcuni farmaci aventi un elevato metabolismo epatico determina un incremento della concentrazione del farmaco nel plasma, con conseguente intensificazione degli effetti farmacologici e la comparsa di effetti collaterali. (Capasso *et al.*, 2006).

Secondo uno studio di Giorgi *et al.*, 2003, il succo di pompelmo, liquido o liofilizzato, cambia i parametri farmacocinetici di una varietà di farmaci metabolizzati principalmente dal citocromo P450 3A. Questo effetto è stato studiato su sei cani beagle maschi. Per esempio, nel caso del praziquantel, dopo somministrazione del succo di pompelmo sia liquido sia liofilizzato, si ha un aumento delle concentrazioni plasmatiche del farmaco. Infatti, si è notato un aumento della C_{max} di circa tre volte, l'AUC di 2,5 volte e la T_{max} è stata significativamente migliorata.

Lo stesso risultato è stato ottenuto fornendo il succo di pompelmo associato alla somministrazione di cefalosporine nei cani. Lo studio ha mostrato un aumento della biodisponibilità e suggerisce la possibilità di usare questo succo per diminuire la dose di cefalosporina e diminuire gli effetti collaterali associati alla terapia con ketoconazolo (Giorgi *et al.*, 2004). La bergamottina nel succo di pompelmo è un principale inibitore del CYP3A4 intestinale contribuendo al legame tra succo e farmaco (Paine *et al.*, 2004).

Poche sono le informazioni riguardo la somministrazione orale del bergaptene. E' stato studiato solo come costituente dell'olio essenziale, che applicato sulla pelle può causare reazioni di sensibilizzazione alla luce solare (fotosensibilizzante).

Capitolo 3

RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Studi fitochimici

3.1.1 Analisi LC-PDA-MS

I succhi delle tre cultivar di bergamotto e del succo industriale, trattati come riportato nel capitolo 4, sono stati sottoposti ad analisi LC-PDA-MS. Mediante la valutazione dei tempi di ritenzione, degli spettri di assorbimento UV-Vis e dello spettro di MS e MSⁿ è stato possibile confermare ed identificare i vari composti (Tabella 4 e Tabella 5). Di fondamentale importanza è stato il supporto di standard puri e dei dati presenti in letteratura concernenti il genere *Citrus* che ci hanno permesso di identificare con certezza molti composti appartenenti principalmente alla classe dei flavonoidi. I cromatogrammi ottenuti da LC-PDA-MS (Figure 20- 23) risultano parecchio complessi e mostrano composti con peso molecolare compreso tra 192 e 754. L'analisi delle tre cultivar evidenzia una loro equivalenza da un punto di vista qualitativo, mentre il succo industriale risulta essere diverso. Numerosi sono i picchi che sono stati visualizzati ma, per alcuni di questi, non è stata possibile l'identificazione. Si riportano nelle figure 20- 23 i cromatogrammi Total Scan PDA e Base Peak MS delle tre cultivar e del succo industriale.

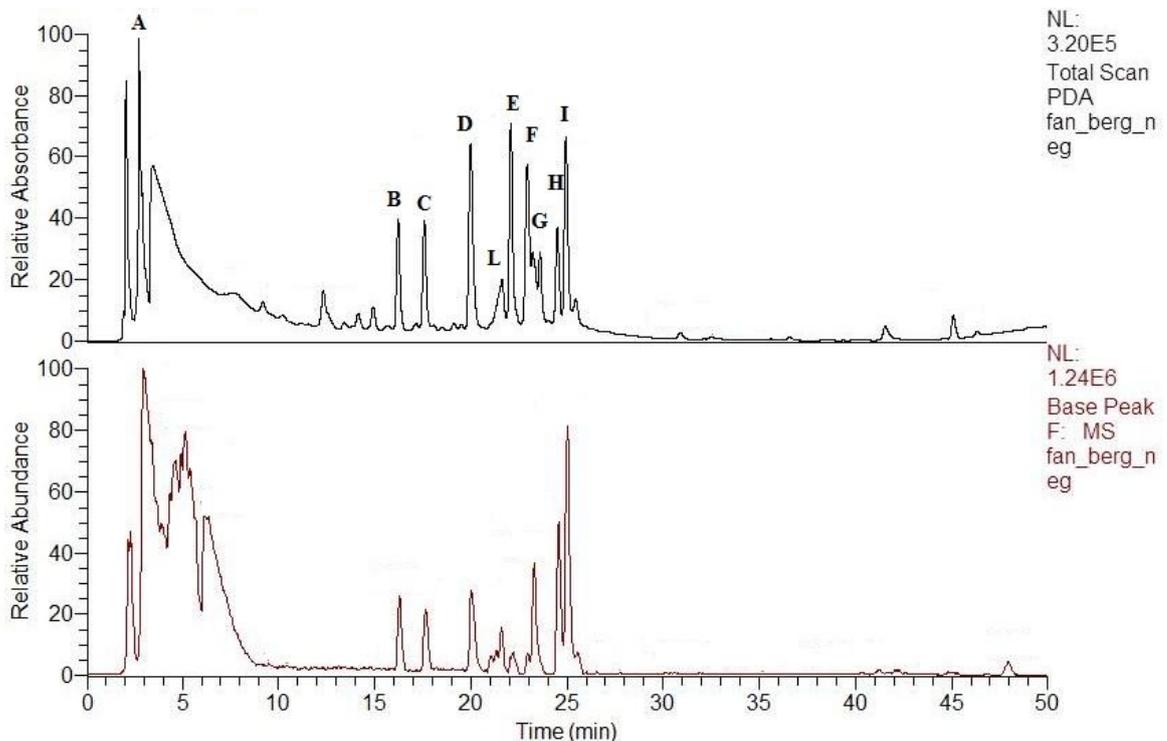


Figura 20 Cromatogramma Total Scan PDA e Base Peak MS della cultivar Fantastico

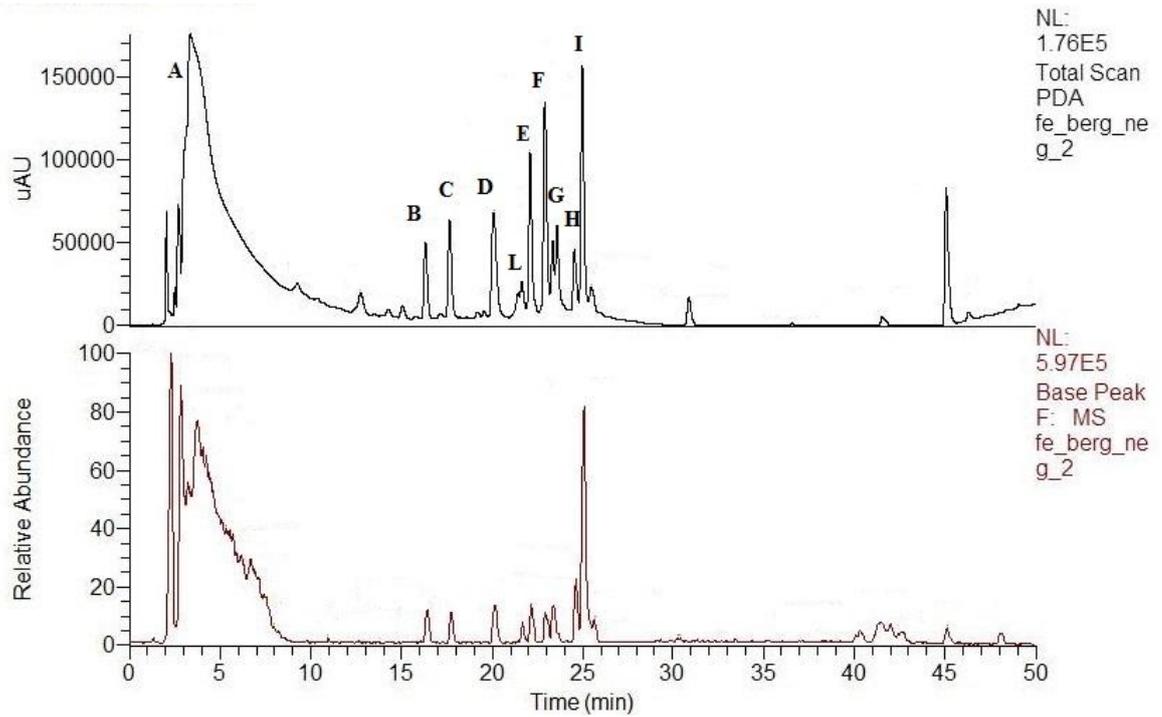


Figura 21 Cromatogramma Total Scan PDA e Base Peak MS della cultivar Femminello

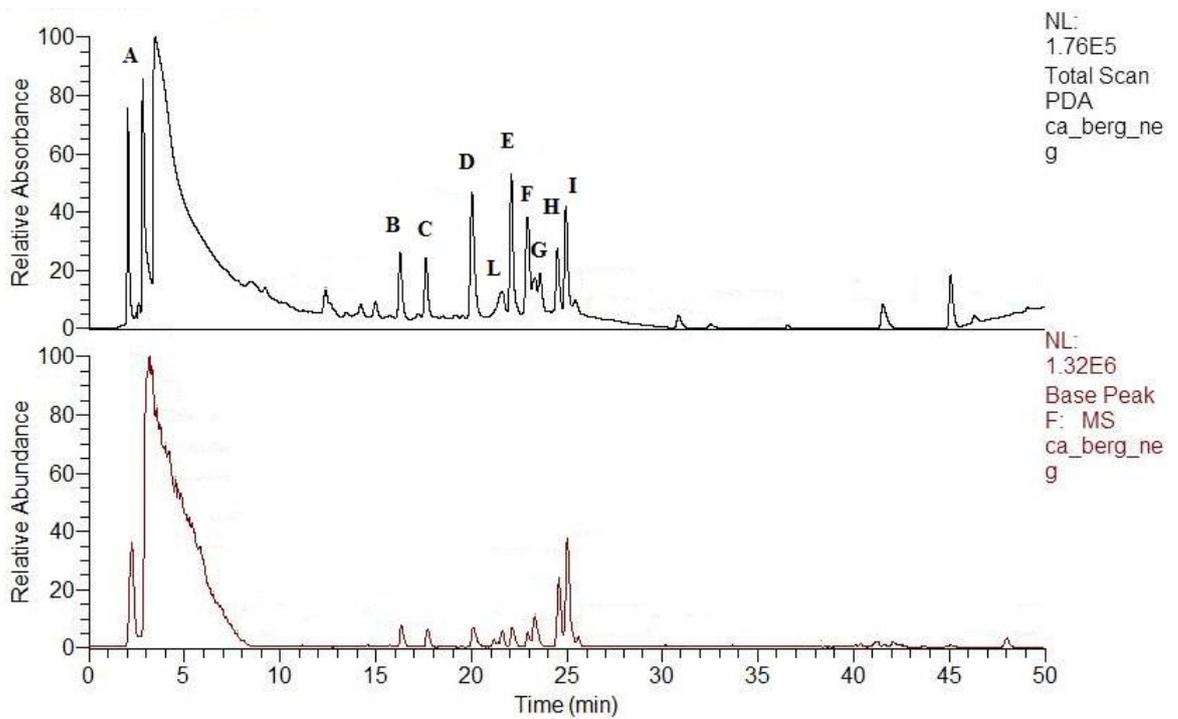


Figura 22 Cromatogramma Total Scan PDA e Base Peak MS della cultivar Castagnaro

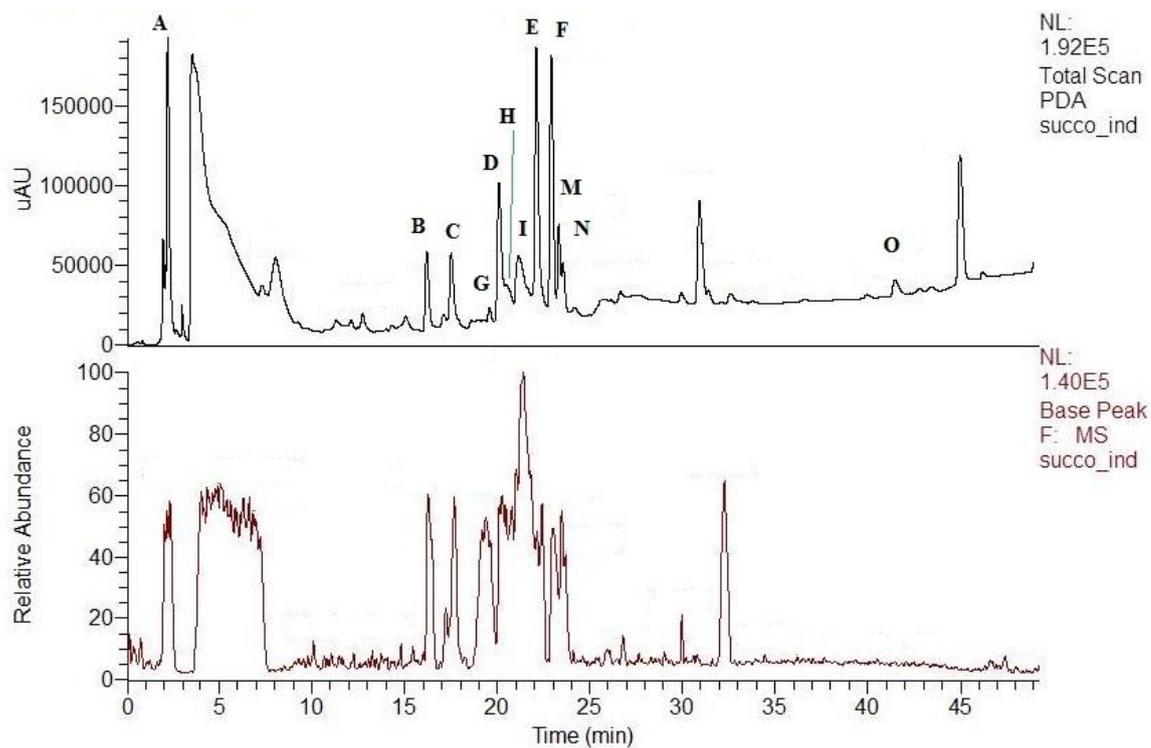


Figura 23 Cromatogramma Total Scan PDA e Base Peak MS del succo industriale

Tabella 4 Composti identificati nelle tre cultivar di *Citrus bergamia*

PICCO	COMPOSTO	t_R (min)	$[M-H]^-$ (m/z)	MS (m/z)	UV (λ_{max})	Fantastico	Femminello	Castagnaro
A	Acido chinico	3.4	191	173, 111	255	X	X	X
B	Vicenina-2	16.3	593	503, 473, 353	270, 335	X	X	X
C	Lucenina 2,4'-metiletere	17.7	623	533, 503, 383	270, 345	X	X	X
D	Eriocitrina o Neoeriocitrina	20.1	595, 631	459, 441, 235	255, 285	X	X	X
L	Scoparina o Orientina-4'-metiletere	21.6	885	661, 621, 579	270, 345	X	X	X
E	Naringina	22.1	615; 579	579	285, 330	X	X	X
F	Neoesperidina	23.0	645, 609		270, 335	X	X	X
G	Neoeriocitrina-HMG	23.3	739	677, 637, 595	285, 335	X	X	X
H	Melitidina	24.5	723	621, 579	285, 325	X	X	X
I	Brutieridina	24.9	753	651, 609	285	X	X	X

Tabella 5 Composti identificati nel succo industriale

PICCO	COMPOSTO	t_R (min)	$[M-H]^-$ (m/z)	MS (m/z)	UV (λ_{max})
A	Acido chinico	2.2	191	173, 111	265
B	Vicenina-2	16.3	593	503, 473, 353	270, 335
C	Lucenina-2,4'-metiletere	17.6	663, 623		275, 345
G	Neoeriocitrina-HMG	19.3	739		280, 330
D	Eriocitrina o Neoeriocitrina	20.3	631, 595	459, 329, 235	285, 330
H	Melitidina	20.8	723	661, 579	280, 330
I	Brutieridina	21.1	753	651, 609	285, 325
E	Naringina	22.1	579, 615		280, 330
F	Neoesperidina	22.9	645, 609		285, 330
M	Chrisoeriol-7- <i>O</i> -neoesperidoside	23.4	643, 607		255, 270, 345
N	Diosmetina-7- <i>O</i> -neoesperidoside	23.7	643, 607		270, 340
O	Composto non identificato	44.9			250, 305

3.1.2 Identificazione dei composti

I cromatogrammi riportati nelle figure 20- 23 possono essere suddivisi in due parti, in cui all'inizio eluiscono l'acido chinico e i flavoni-*C*-glicosilati (picchi B, C, L), successivamente i flavanoni-*O*-glicosilati (picchi D, E, F, G, H, I). Le tre cultivar presentano cromatogrammi simili. Il composto che eluisce a $t_R = 3.4$ min, avente uno spettro di assorbimento UV con assorbimento massimo a 255 nm, ione quasi molecolare a m/z 191 $[M-H]^-$ (PM = 192) è stato identificato come **acido chinico** (picco A), (Figure 24 e 25), grazie alla presenza dei tipici picchi di frammentazione a m/z 111 $[M-H-80]^-$ e 173 $[M-H-18]^-$.

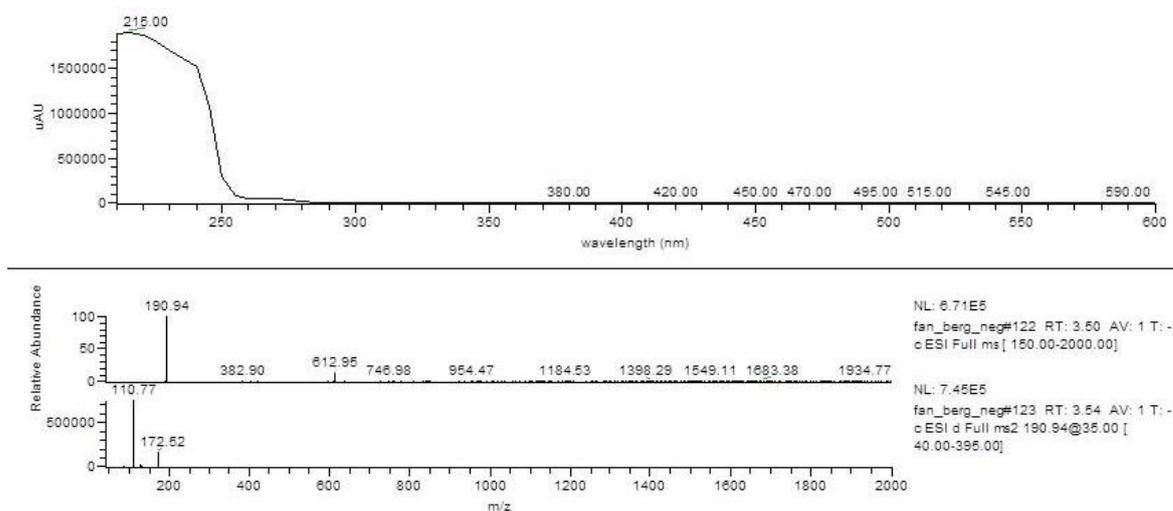


Figura 24 Spettro UV, MS e MS² dell'acido chinico

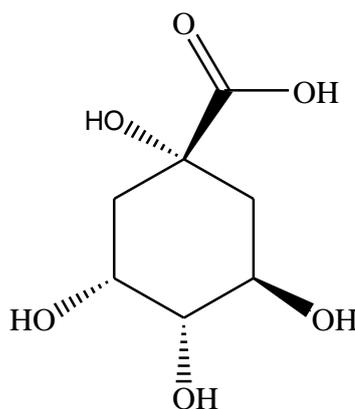


Figura 25 Struttura acido chinico

Un altro composto che eluisce con $t_R = 16.3$ min è stato identificato mediante l'ausilio di uno standard puro, come **vicenina-2** (picco B), (Figure 26 e 27). Tale composto ha uno

spettro UV con bande a lunghezza d'onda di 270 e 335 nm, lo spettro di massa presenta uno ione quasi molecolare a m/z 593 $[M-H]^-$, (PM = 594), con picchi di frammentazione a m/z 503 $[M-H-90]^-$, 473 $[M-H-120]^-$ e 353 $[M-H-240]^-$ tipici dei di-*C*-esosilflavoni (Mencherini *et al.*, 2012). A $t_{R}= 17.7$ min, confrontando i dati in letteratura (Gattuso *et al.*, 2007) è stata identificata la **lucenina-2,4'-metiletere** (picco C), (Figura 27), che possiede uno spettro di assorbimento UV con $\lambda_{max}= 270$ e 345 nm, uno spettro di massa con ione quasi molecolare a m/z 623 $[M-H]^-$, (PM = 624) e picchi di frammentazione a m/z 533 $[M-H-90]^-$, 503 $[M-H-120]^-$, e 383 $[M-H-240]^-$.

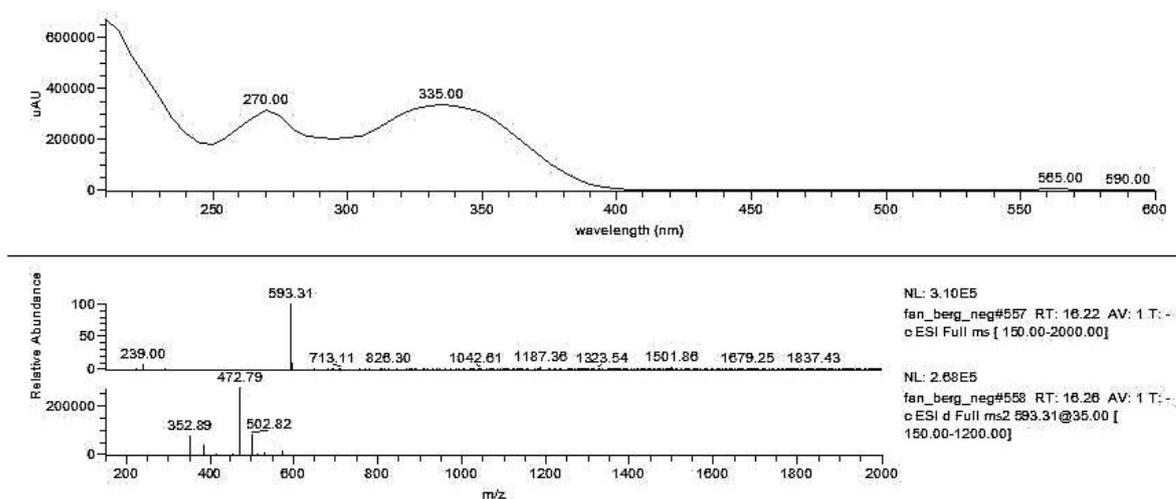
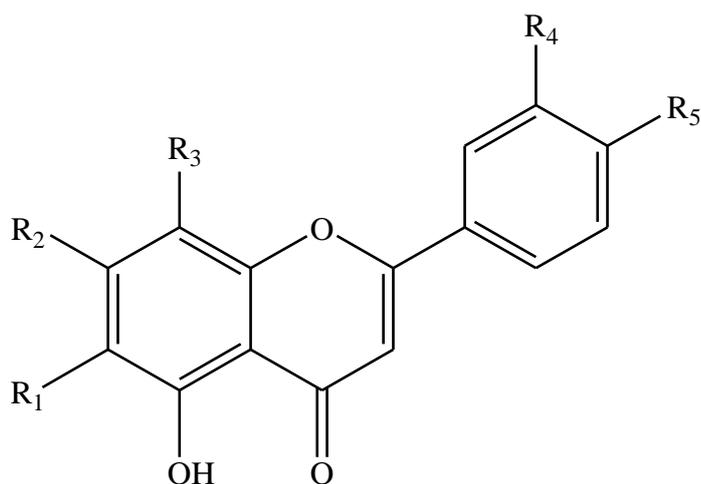


Figura 26 Spettro UV, MS e MS^2 della vicenin-2

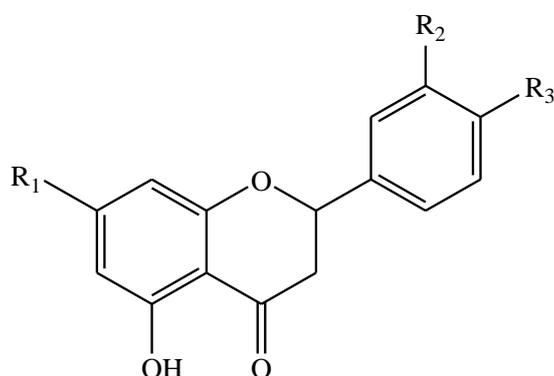


$R_1 = \text{Glc}$; $R_2 = \text{OH}$; $R_3 = \text{Glc}$; $R_4 = \text{H}$; $R_5 = \text{OH}$ Vicenina-2

$R_1 = \text{Glc}$; $R_2 = \text{OH}$; $R_3 = \text{Glc}$; $R_4 = \text{OH}$; $R_5 = \text{OCH}_3$ Lucenina-2-4'-metiletere

Figura 27 C-glicosil Flavoni

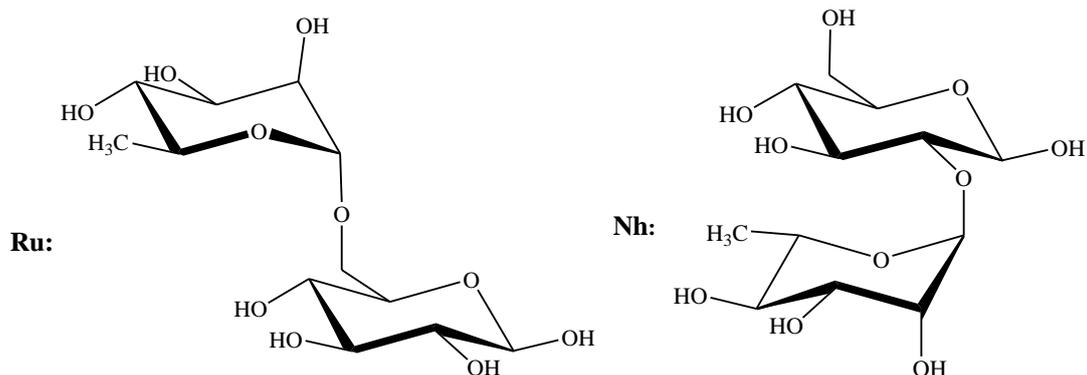
Al tempo di ritenzione 20.1 minuti, eluisce un composto avente uno spettro di massa con ione quasi molecolare pari a m/z 595 $[\text{M}-\text{H}]^-$ e uno pari a m/z 631 $[\text{M}+\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$. Quest'ultimo sembra essere un addotto del composto con due molecole di H_2O . Entrambi possiedono spettro di assorbimento UV con lunghezza d'onda di 255 e 285 nm. Confrontando i dati in letteratura (Gattuso *et al.*, 2007), abbiamo pensato che a questo picco possa corrispondere la **eriocitrina** o **neoeriocitrina** (picco D) (Figura 28) poiché lo spettro di massa presenta uno ione quasi molecolare a m/z 595 $[\text{M}-\text{H}]^-$ e picchi di frammentazione a m/z 459 $[\text{M}-\text{H}-136]^-$ (prodotto tramite retro-Diels-Alder sull'anello C del flavanone), 441 $[\text{M}-\text{H}-154]^-$ e 235 $[\text{M}-\text{H}-360]^-$ (Mencherini *et al.*, 2012).



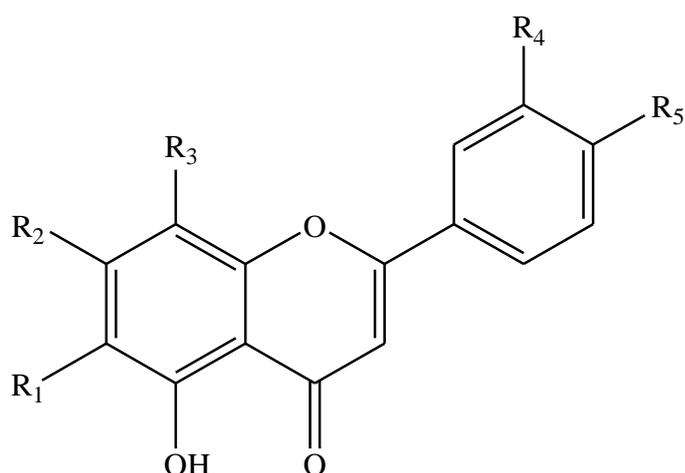
$R_1 = \text{O-Ru}$; $R_2 = \text{OH}$; $R_3 = \text{OH}$ Eriocitrina

$R_1 = \text{O-Nh}$; $R_2 = \text{OH}$; $R_3 = \text{OH}$ Neoeriocitrina

Figura 28 Struttura eriocitrina e neoeriocitrina



Al $t_R = 21.5$ min non è stato possibile identificare con certezza il composto per mancanza di standard puri, ma facendo un confronto con i dati in letteratura, potrebbe essere la **scoparina** o la **orientina-4'-metiletere** (picco L) (Figura 29) con PM = 462 (m/z 461 $[M-H]^-$) (Gattuso *et al.*, 2007).



$R_1 = H$; $R_2 = OH$; $R_3 = Glc$; $R_4 = OCH_3$; $R_5 = OH$ Scoparina

$R_1 = H$; $R_2 = OH$; $R_3 = Glc$; $R_4 = OH$; $R_5 = OCH_3$ Orientina-4'-metiletere

Figura 29 Struttura scoparina e orientina-4'-metiletere

Al $t_R = 22.1$ min eluisce un composto con spettro di assorbimento UV $\lambda_{max} = 280$ e 330 nm, spettro di massa con ioni quasi molecolari a m/z 579 $[M-H]^-$ e m/z 615 $[M+2H_2O-H]^-$ corrispondenti alla **naringina** (picco E) e al suo complesso con due molecole di H_2O (Figure 30 e 31). La frammentazione del picco a m/z 615 $[M+2H_2O-H]^-$ ci conferma la perdita di due molecole di H_2O dando come frammento lo ione a m/z 579 $[M-H]^-$.

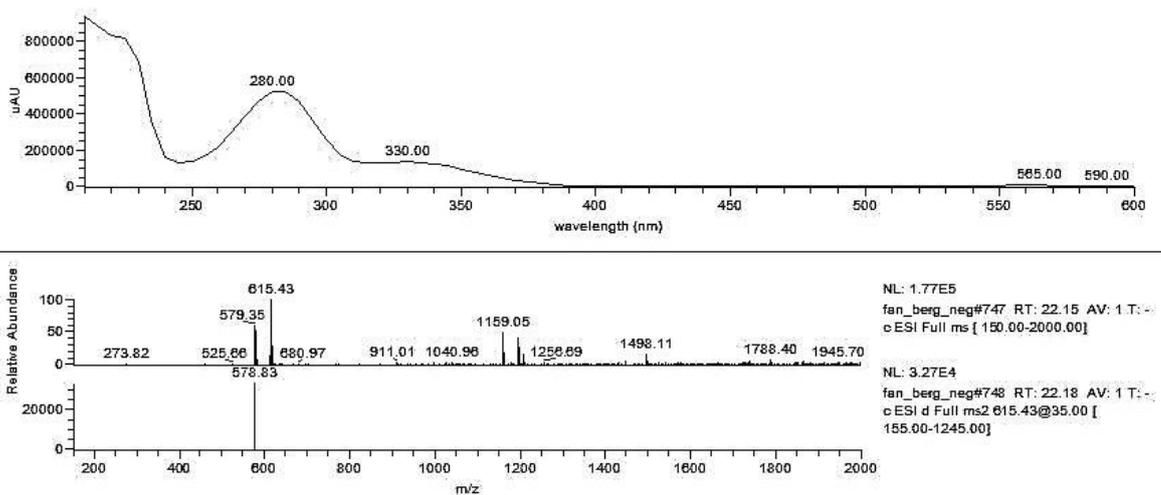
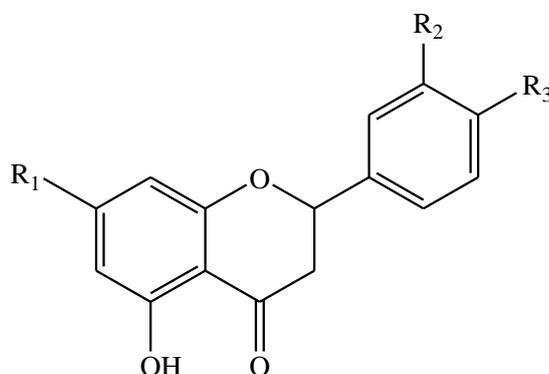


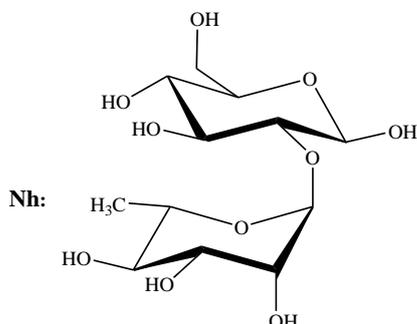
Figura 30 Spettro UV e MS MS² della naringina



R₁= O-Nh; R₂= H; R₃= OH Naringina

R₁= O-Nh ; R₂= OH ; R₃= OMe Neoesperidina

Figura 31 Flavanoni O-glicosilati: naringina e neoesperidina



Al $t_R = 22.9$ min eluisce un picco avente spettro di massa in cui sono presenti due picchi uno a m/z 609 $[M-H]^-$ (PM = 610) che corrisponde alla **neoesperidina** (picco F) (Figura 31) e un suo addotto con due molecole d'acqua a m/z 645 $[M+2H_2O-H]^-$. Tale composto possiede uno spettro di assorbimento UV con $\lambda_{max} = 280$ e 330 nm. Al tempo di ritenzione

di 23 minuti, vi è la presenza di un composto con spettro di assorbimento UV con λ_{\max} = 285 nm e 325 nm, spettro di massa con ione quasi molecolare a m/z 739 $[M-H]^-$ (PM= 740), picchi di frammentazione a m/z 595 $[M-H-144]^-$ (ovvero perde lo ione $[C_6H_8O_4]^-$), a 637 $[M-H-102]^-$, che corrisponde alla perdita di $[C_4H_6O_3]^-$, e 677 $[M-H-62]^-$ con perdita di $[CO_2-H_2O]^-$ (Figura 32). Questo composto sembra poter essere un derivato della neoeriocitrina sostituita con acido 3-idrossi-3-metilglutarico, legato sotto forma di estere sulla porzione zuccherina del neoesperidosio, ovvero la **3-idrossi-3-metilglutarilneoeriocitrina** (picco G) (Figura 33). Tale composto risulta non essere mai stato isolato in precedenza e pertanto potrebbe essere un nuovo composto naturale. La completa caratterizzazione del composto si rende auspicabile in futuro mediante l'isolamento del composto puro.

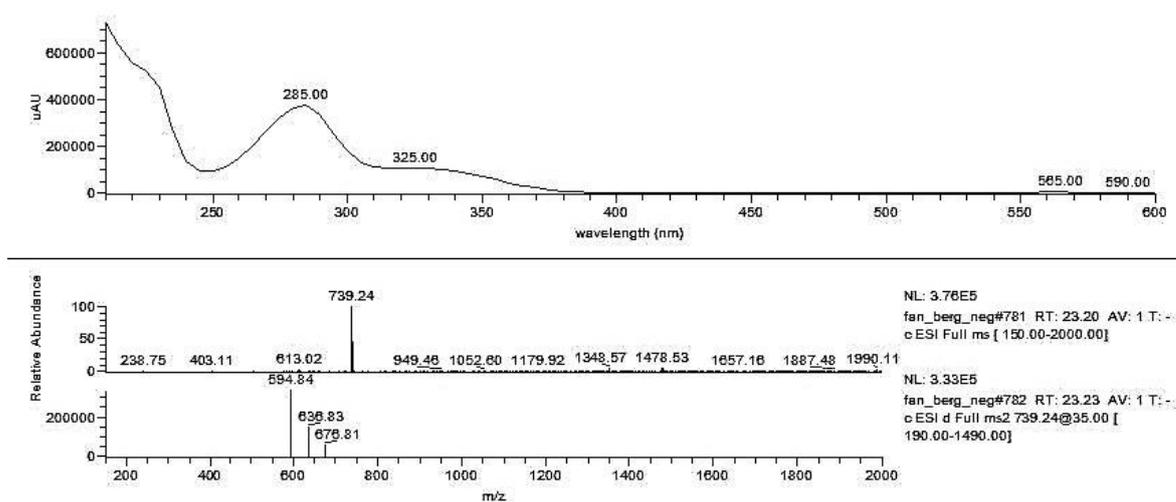


Figura 32 Spettro UV, MS e MS² della 3-idrossi-3-metilglutarilneoeriocitrina

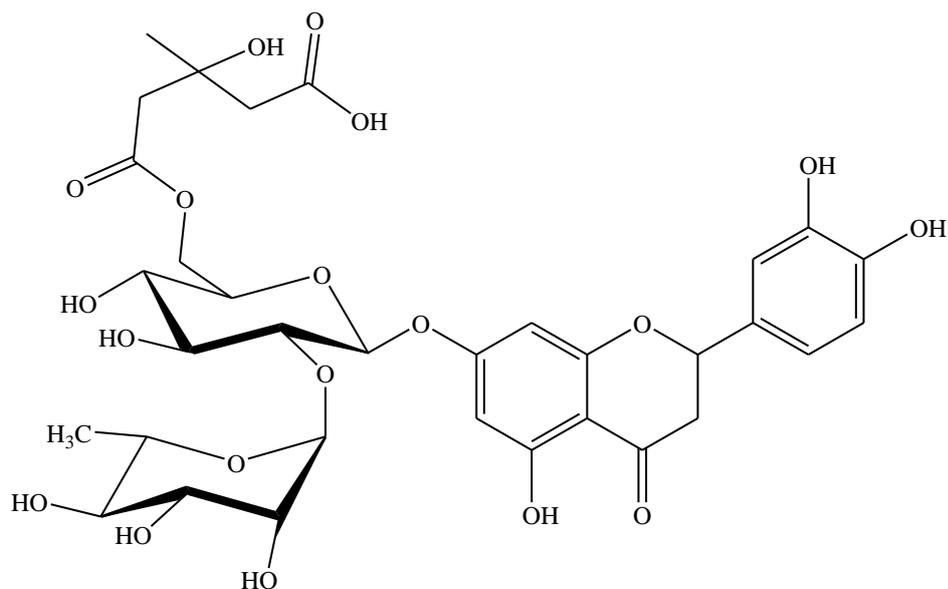


Figura 33 3-idrossi-3-metilglutaril neoericiotrina

Al tempo di ritenzione 24.5 min eluisce un composto con $PM = 724$ (m/z 723 $[M-H]^-$), picchi di frammentazione pari a m/z 579 $[M-H-144]^-$ corrispondente alla perdita di $[C_6H_8O_4]^-$, 621 $[M-H-102]^-$ dovuto alla perdita di $[C_4H_6O_3]^-$ e 661 $[M-H-62]^-$ derivante dalla perdita di $[CO_2-H_2O]^-$ e uno spettro di assorbimento UV con un massimo a 285 nm e uno a 325 nm (Figura 34). Confrontando i dati presenti in letteratura (Sindona *et al.*, 2010; Mencherini *et al.*, 2012), i frammenti ottenuti nello spettro MS^2 indicano la presenza del sostituente 3-idrossi-3-metilglutarilico e il composto risulta essere la **melitidina** (picco H) (Figura 35). Essa è un flavanone glicosilato il cui aglicone è la naringenina, esterificata con acido 3-idrossi-3-metilglutarico. Infine, al $t_R = 23$ min con $PM = 754$ (m/z 753 $[M-H]^-$), picchi di frammentazione a m/z 609 $[M-H-144]^-$ dovuto alla perdita dello ione $[C_6H_8O_4]^-$, m/z 651 $[M-H-102]^-$ corrispondente alla perdita di $[C_4H_6O_3]^-$ e 691 $[M-H-62]^-$ dovuto alla perdita di $[CO_2-H_2O]^-$, è presente un picco corrispondente ad un altro derivato esterificato con acido 3-idrossi-3-metilglutarilico, la **brutieridina** (picco I) (Figura 35), il cui spettro di assorbimento UV risulta simile a quello della melitidina. Il suo aglicone è la neoesperidina (Mencherini *et al.*, 2012).

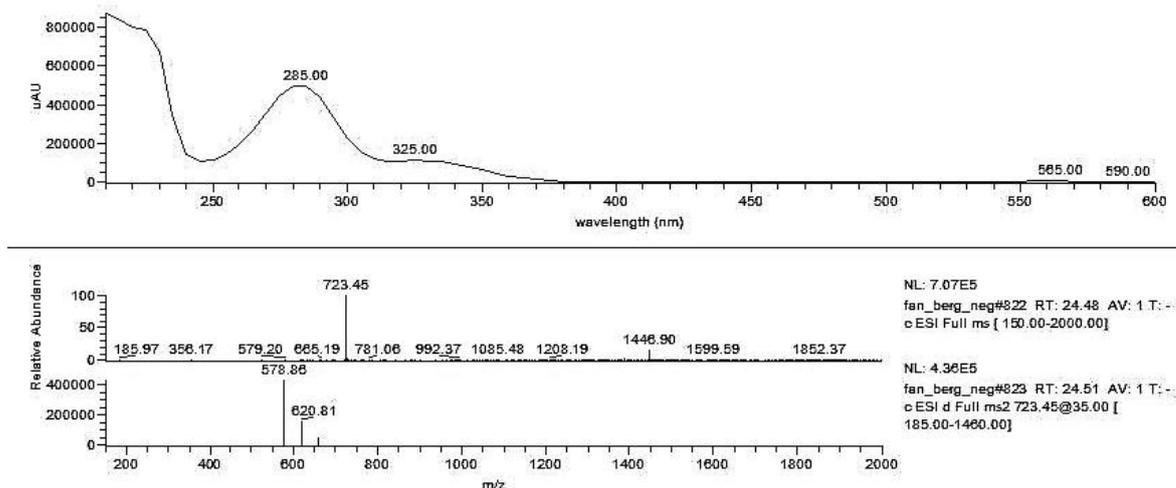


Figura 34 Spettro UV, MS e MS² della Melitidina

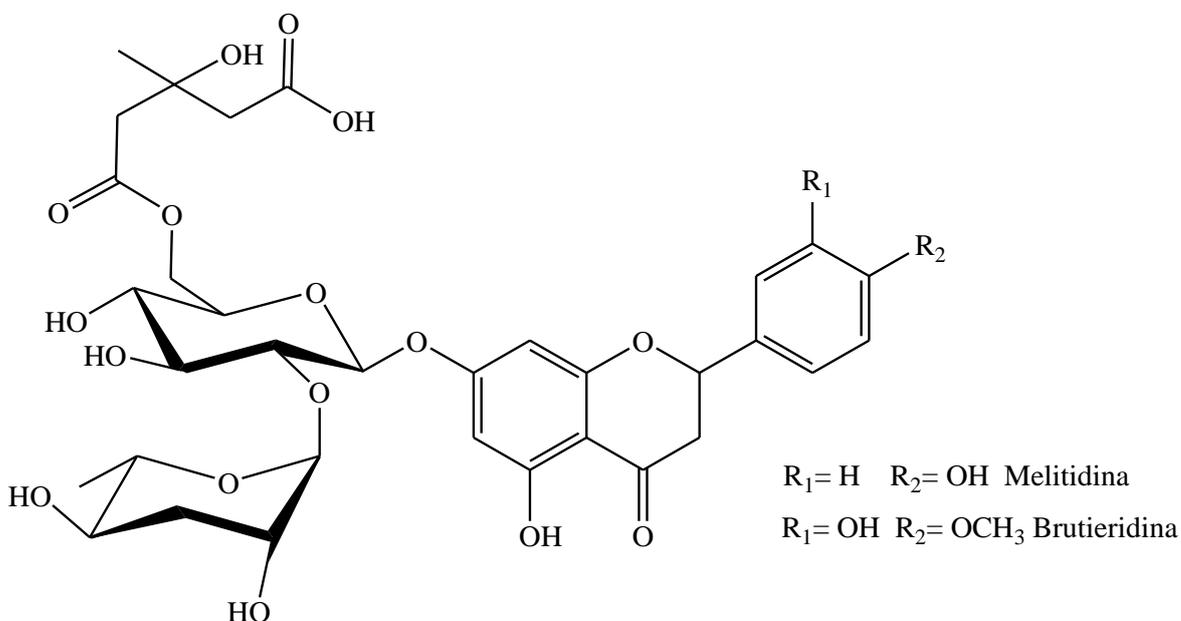


Figura 35 melitidina e brutieridina

Per ciò che riguarda i composti identificati nel succo industriale, abbiamo riscontrato una lieve differenza dei tempi di ritenzione, soprattutto per quel che riguarda i 3-idrossi-3-metilglutarilflavonoidi (HMG-flavonoidi) che eluiscono con tempi anticipati rispetto ai flavanoni. Inoltre, nel succo industriale vi è la presenza di alcuni composti in più. Al $t_R = 23.4$ min eluisce un picco con spettro di assorbimento UV con $\lambda_{max} = 255, 270$ e 345 nm. Nello spettro di massa compaiono due picchi, di cui uno ione quasi molecolare a m/z 607 $[M-H]^-$ (PM = 608) identificato, confrontando la letteratura (Gattuso *et al.*, 2007) come

chrisoeriolo-7-O-neoesperidoside (picco M) (Figura 36 e 37) e l'altro ione quasi molecolare a m/z 643 $[M+2H_2O-H]^-$, PM= 644, sembra essere un addotto dello stesso composto con due molecole d'acqua. Al tempo di ritenzione 23.7 minuti, eluisce un composto con spettro di assorbimento UV a lunghezza d'onda 270 e 340 nm, spettro di massa a m/z 607 $[M-H]^-$ (PM = 608), anch'esso affiancato da un picco a m/z 643 $[M+2H_2O-H]^-$ dovuto all'addotto con due molecole d'acqua. Questo composto corrisponde alla **diosmetina-7-O-neoesperidoside** (picco N) (Figura 37) (Gattuso *et al.*, 2007).

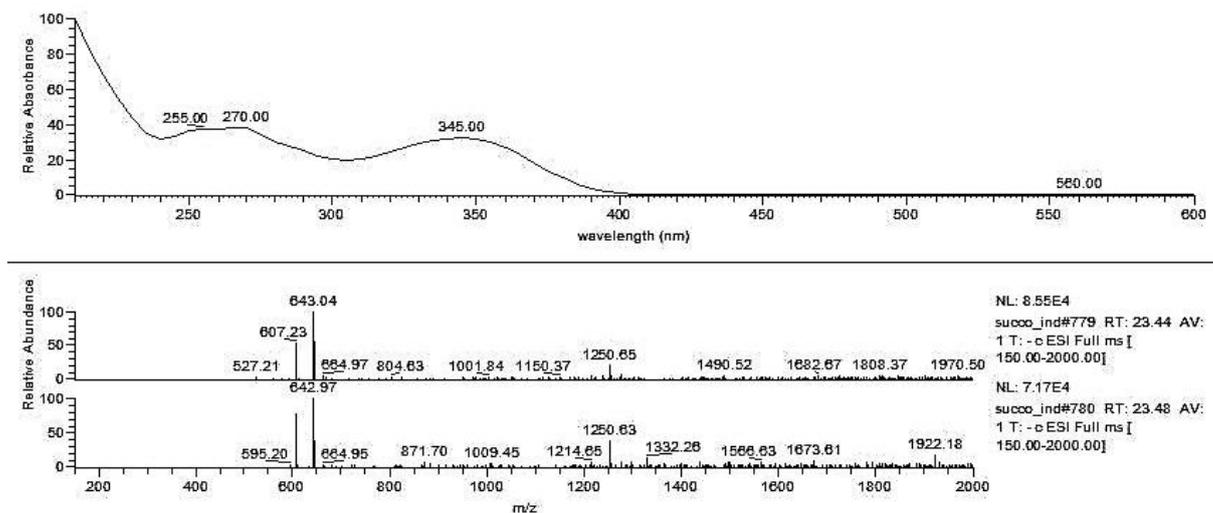
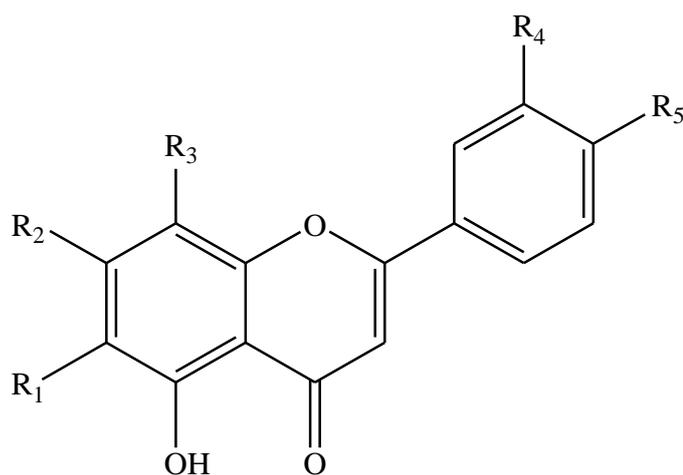


Figura 36 Spettro UV, MS e MS² del chrisoeriolo-7-O-neoesperidoside



$R_1=H$; $R_2=ONh$; $R_3=H$; $R_4=OCH_3$; $R_5=OH$ Chrysoeriolo-7-O-neoesperidoside

$R_1=H$; $R_2=ONh$; $R_3:H$; $R_4=OH$; $R_5=OCH_3$ Diosmetina-7-O-neoesperidoside

Figura 37 Struttura chrisoeriolo e diosmetina

Inoltre nel succo industriale a differenza di quanto riscontrato nelle tre cultivar si ha la presenza in tracce di furanocumarine. (Gattuso *et al.*, 2006). Infatti il picco a $t_R = 44.9$ min ha uno spettro di assorbimento UV tipici delle furanocumarine con $\lambda_{max} = 270$ e 340 nm. Purtroppo lo spettro di massa (Figura 38) non ha dato nessun picco rilevante da cui poter identificare con certezza il composto.

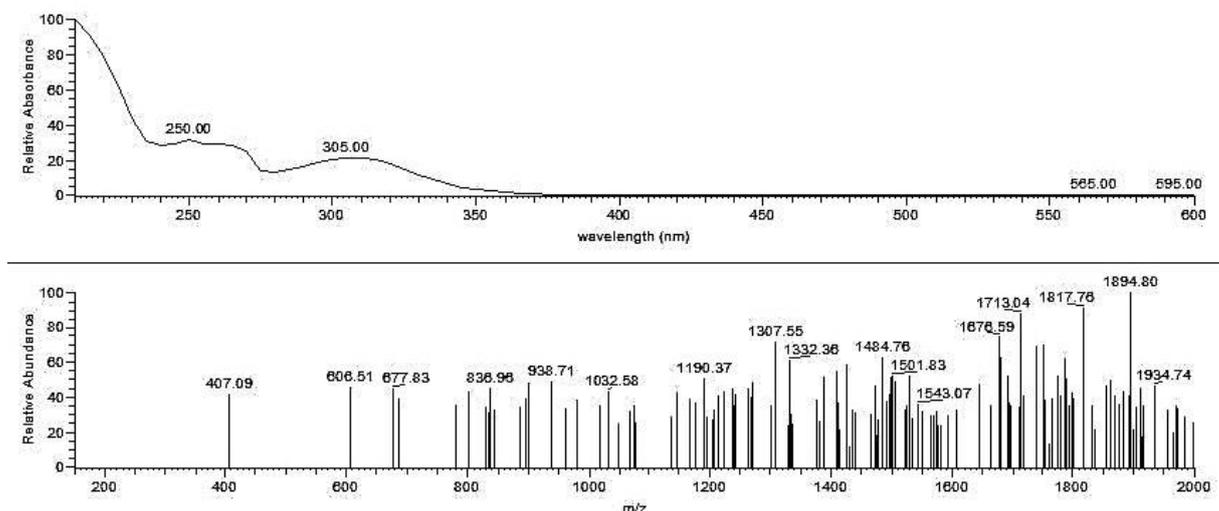


Figura 38 Spettro UV e MS di una probabile furanocumarina

Riassumendo, i composti di nostro interesse identificati mediante analisi LC-PDA-MS sono: acido chinico; cinque C-glucosilflavoni, vicenina-2, lucenina-2,4'-metiletere, scoparina o orientina-4'-metiletere, chrisoeriolo-7-O-neoesperidoside e diosmetina-7-O-neoesperidoside; quattro flavanoniglicosidi, ovvero eriocitrina associata alla neoeriocitrina, naringina, neoesperidina; tre flavanoni glicosidi coniugati all'acido 3-idrossi-3-metilglutarico, ovvero 3-idrossi-3-metil-glutarilneoeriocitrina, melitidina e brutieridina. Ad eccezione della vicenina-2 e della naringina, i quali sono stati identificati tramite il confronto con composti standard puri, i rimanenti composti sono stati identificati mediante i dati riportati in letteratura.

3.2 Studi clinici

3.2.1 Analisi dell'effetto del succo di bergamotto in vivo

I risultati dello studio di riferimento di Sottilotta *et al.*, 2008 (vedi Tabella 6), dal punto di vista statistico, hanno evidenziato una riduzione significativa dei livelli di colesterolo

totale, soprattutto nelle ultime due settimane, in cui la riduzione è stata maggiormente significativa (T0 vs T1 $p < 0.01$), rispetto al periodo di studio totale. (T0 vs T2 $p = 0.01$).

La riduzione della colesterolemia totale dopo un mese di assunzione di succo di bergamotto è stata riscontrata in 18 soggetti su 24 (75 %). Per la frazione LDL è stata osservata una diminuzione significativa tra T0 e T2 ($p < 0.01$) e tra T1 e T2 ($p < 0.02$). La dimostrazione di tale cambiamento è l'effetto della somministrazione tra il quattordicesimo (T1) e il ventottesimo giorno (T2). Otto volontari (33.3 %) hanno avuto un aumento, mentre 15 (62.5 %) hanno avuto un decremento dei livelli di LDL. Solo in un caso (4.2 %) non si è avuta nessuna variazione.

Nel caso della variabile FVIII, invece, si è osservata una diminuzione importante fra T0 e T2 ($p < 0.02$) ma non tra T1 e T2 ($p = 0.15$), quindi è conseguenza della somministrazione nell'intero arco dei 28 giorni. I livelli percentuale del Fattore VIII sono stati diminuiti in 20 arruolati su 24 (83.3 %), un aumento si è invece riscontrato in solo 4/24 (16.7%).

Per quanto riguarda il tPA si è avuta una riduzione rilevante tra T1 e T2 ($p < 0.03$), anche qui da riferire alla somministrazione nella seconda parte dello studio. I livelli del t-PA complessivamente sono aumentati in 6 casi su 24 (25 %) e diminuiti in 17/24 (70.8 %), nessuna variazione è stata riscontrata in un solo caso (4.2 %).

Le variazioni riscontrate a proposito dei dosaggi del colesterolo HDL, dei trigliceridi, dell'omocisteina non hanno raggiunto la significatività statistica. Anche gli altri indici di attivazione della coagulazione (D-Dimeri, TAT, Trombina-Antitrombina, F1+2, PAI-1) non hanno evidenziato variazioni significative: un aumento in 12/24 (50 %), una riduzione in 11/24 (45.8 %) e nessuna variazione in un caso (4.2 %).

Tra i risultati più significativi ottenuti vi è stata la riduzione del Fattore VIII che si è osservata nel 83.3 % del campione studiato. Ciò ha fatto ipotizzare un effetto antinfiammatorio indiretto, poichè è noto che il Fattore VIII aumenta negli stati infiammatori, ovvero un'azione antitrombotica in quanto il Fattore VIII è una glicoproteina plasmatica che viene attivato durante i processi coagulativi e agisce come cofattore del fattore IX accelerando fino a 200.000 volte la conversione del fattore X in X attivato ad opera del F IX attivato. L'aumento persistente del Fattore VIII può costituire una condizione di aumentato rischio trombotico.

Tabella 6 Validità statistica studio P-value < 0,05

Variabile	T0 (media+ dev std)	T1 (media+ dev std)	T2 (media+ dev std)	T0 vs T1 p-value	T0 vs T2 p-value	T1 vs T2 p-value
colesterolo	228,6 ± 45,8	223,8 ± 40,7	210,3 ± 37,9	0,3724	0,0102	0,0063
LDL	151,6 ± 37,5	147,5 ± 39,6	139,4 ± 37,7	0,3414	0,0039	0,0191
HDL	48,7 ± 11,1	48,5 ± 10,6	47,6 ± 10,9	0,8670	0,3433	0,3751
trigliceridi	142,5 ± 124,5	177,5 ± 291,1	115,8 ± 59,4	0,3936	0,2303	0,2978
HCV	14,1 ± 11,5	12,2 ± 5,1	13,1 ± 7,9	0,1966	0,3451	0,2736
FVIII	114,0 ± 37,7	106,8 ± 30,5	98,9 ± 28,4	0,1774	0,0109	0,1540
dimero	191,5 ± 43,3	210,0 ± 95,5	193,7 ± 35,3	0,3937	0,8084	0,4301
t-Pa	10,4 ± 7,4	10,6 ± 7,5	9,6 ± 6,5	0,6217	0,0820	0,0226
PAI-1	33,3 ± 22,8	34,8 ± 23,5	33,1 ± 25,1	0,6629	0,9593	0,7315
TAT	2,6 ± 1,1	4,9 ± 11,9	2,7 ± 0,6	0,3563	0,5700	0,3774
F1+2	172,0 ± 66,9	206,9 ± 149,9	170,9 ± 72,2	0,2371	0,9105	0,2432

I limiti del precedente studio consistono in:

- 1) Mancata coincidenza tra il periodo di studio e il periodo di raccolta dell'agrumo (da novembre a marzo), per cui è stato necessario utilizzare il succo congelato derivante dalla raccolta dell'anno precedente;
- 2) Non è stata possibile la distinzione tra le tre diverse cultivar di bergamotto (Femminello, Castagnaro, Fantastico).
- 3) I soggetti arruolati hanno inoltre eseguito tre prelievi a distanza di solo due settimane l'uno dall'altro, per un periodo di studio complessivo di sole quattro settimane.
- 4) Non sono stati valutati parametri importanti come la velocità di eritrosedimentazione (VES), la proteina C reattiva (PCR) e l'elettroforesi proteica,

Per cercare di superare quello che è stato ipotizzato come limite del primo studio, abbiamo realizzato un secondo lavoro con l'obiettivo di analizzare gli effetti derivanti dall'assunzione continua, giornaliera, del succo fresco di bergamotto in un campione di soggetti sani, per verificare l'eventuale variazione di parametri biochimici relativi al metabolismo lipidico, agli indici infiammatori, ed alcuni parametri emocoagulativi. Nelle tabelle 7 - 13 i valori ottenuti per ogni tipologia di prelievo, confrontando i dati tra secondo e terzo prelievo. Dopo il periodo di assunzione del succo di bergamotto è stata riscontrata una riduzione dei livelli di colesterolo totale, LDL, trigliceridi in più della metà dei soggetti studiati, così come si è avuto un aumento del colesterolo HDL. Gli indici infiammatori quali VES e PCR sono risultati aumentati. Il Fibrinogeno e il Fattore VIII si sono ridotti. I parametri relativi all'elettroforesi proteica si sono ridotti anche se in maniera meno evidente rispetto agli altri risultati, tranne che nel caso dell'alfa-2-globulina. I

risultati sono riassunti nella tabella 7. Sfortunatamente la bassa potenza dello studio e l'alta variabilità dei risultati non hanno reso significativa l'indagine statistica. Studi su un campione più numeroso di pazienti sono necessari per valutare se il trend riscontrato nei parametri valutati può risultare significativo.

Tabella 7 Parametri di laboratorio analizzati e relativi risultati

Esame di Laboratorio	Riduzione (%)	Aumento (%)	Invariato (%)	Significatività Statistica
Colesterolo Totale	10 (90.9)	1 (9.1)		>0.05
Colesterolo HDL	2 (18.2)	9 (81.8)		>0.05
Colesterolo LDL	8 (72.7)	3 (27.3)		>0.05
Trigliceridi	7 (63.6)	4 (36.4)		>0.05
VES	2 (18.2)	7 (81.8)	2 (18.2)	>0.05
PCR		11 (100)		>0.05
Fibrinogeno	7 (63.6)	4 (36.4)		>0.05
Albumina	6 (54.5)	5 (45.5)		>0.05
Alfa-1	5 (45.4)	4 (36.4)	2 (18.2)	>0.05
Alfa-2	6 (54.5)	4 (36.4)	1 (9.1)	>0.05
Beta-1	7 (63.6)	4 (36.4)		>0.05
Beta-2	6 (54.5)	3 (27.3)	2 (18.2)	>0.05
Gamma	7 (63.6)	3 (27.3)	1 (9.1)	>0.05
Fattore VIII	7 (63.6)	4 (36.4)		>0.05

Tabella 8 Dosaggi di colesterolo totale, HDL e LDL ottenuti al secondo e terzo prelievo

Paz. N°	Colesterolo TOT 2 mg/dL	Colesterolo TOT 3 mg/dL	HDL 2 mg/dL	HDL 3 mg/dL	LDL 2 mg/dL	LDL 3 mg/dL
1	171	162	71	85	78	76
2	240	215	37	44	183	175
3	249	240	57	67	172	171
4	209	237	31	34	119	108
5	238	205	37	50	107	118
6	282	273	61	54	204	140
7	251	243	54	62	206	199
8	297	295	72	73	206	213
9	188	178	57	59	113	108
10	168	167	54	57	80	85
11	238	238	92	102	135	116
Range	168-297	162-295	31-92	34-102	78-206	76-213
mediana	238	237	57	59	135	118

Tabella 9 Dosaggi di trigliceridi ottenuti al secondo e terzo prelievo

Paz. N°	Trigliceridi 2 mg/dL	Trigliceridi 3 mg/dL
1	68	55
2	185	173
3	126	118
4	275	412
5	318	238
6	141	332
7	94	78
8	66	81
9	99	111
10	152	149
11	67	63
Range	66-318	55-412
mediana	126	118

Tabella 10 Dosaggi di VES e PCR ottenuti al secondo e terzo prelievo

Paz. N°	VES 2 mm	VES 3 mm	PCR 2 mg/L	PCR 3 mg/L
1	11	38	3.8	16
2	8	10	3.5	5
3	25	35	8.2	10.3
4	25	50	3.5	8.6
5	15	11	3.3	7.4
6	15	30	3.7	10.8
7	15	10	3.7	9.6
8	10	10	3.7	5.0
9	6	6	3.5	5
10	11	12	5.6	7.9
11	23	28	3.7	5
Range	6-25	6-38	3.3-8.2	5-10.8
mediana	15	12	3.7	7.9

Tabella 11 Dosaggi di fibrinogeno e fattore VIII ottenuti al secondo e terzo prelievo

Paz. N°	Fibrinogeno 2 mg/dL	Fibrinogeno 3 mg/dL	Fattore VIII 2 %	Fattore VIII 3 %
1	289	266	126	130
2	285	208	106	82
3	396	273.3	128	110
4	299.1	237	184	156
5	262.5	225	111	100
6	303	330	155	134
7	259	305	108	125
8	285.3	303	102	94
9	225	228.6	114	122
10	255.6	246	193	189
11	396.8	303	171	189
Range	225-396.8	208-330	102-193	82-189
mediana	285.3	266	126	125

Tabella 12 Dosaggi proteine ottenuti al secondo e terzo prelievo

Paz. N°	Albumina 2 %	Albumina 3 %	Alfa 1 2 %	Alfa 1 3 %	Alfa 2 2 %	Alfa 2 3 %
1	53.0	53.6	4.6	4.9	10.9	10.8
2	63.1	65.4	4.8	4.1	11.2	10.7
3	58.9	58.2	4.7	4.9	12.3	11.5
4	54.3	54.2	4.8	4.7	13.3	13.1
5	58.1	57.4	4.7	4.8	13.3	12.3
6	63.7	64.0	3.9	3.9	11.4	11.5
7	62.0	62.5	4.4	4.3	9.7	9.7
8	62.4	62.4	4.5	4.5	10.2	10.5
9	55.6	59.4	4.3	3.7	10.5	9.3
10	56.2	56	4.4	4.5	10.3	10.4
11	58.8	58.1	4.2	4.1	11.4	12.0
Range	53.0-63.7	53.6-64.0	3.9-4.8	3.7-4.9	9.7-13.3	9.3-13.1
mediana	58.8	58.2	4.5	4.5	11.2	10.8

Tabella 13 Dosaggi proteine e proteine totali ottenuti al secondo e terzo prelievo

Paz. N°	Beta 1 2 %	Beta 1 3 %	Beta 2 2 %	Beta 2 3 %	Gamma 2 %	Gamma 3 %	Proteine totali 2 g/dL	Proteine totali 3 g/dL
1	7.0	7.3	5.4	4.8	19.1	18.6	5.8	7.0
2	5.7	5.6	4.6	3.9	10.6	10.3	5.5	6.3
3	6.3	6.6	5.4	5.9	12.4	12.9	5.3	6.5
4	6.4	6.6	6.4	6.7	14.8	14.7	5.3	6.3
5	6.8	7.4	4.6	4.6	12.5	13.5	5.5	6.1
6	6.2	6.1	3.9	3.9	10.9	10.6	5.6	6.6
7	5.8	5.7	4.6	4.4	13.5	13.4	6.5	7.0
8	5.9	5.8	3.6	3.7	13.4	13.1	6.1	6.9
9	7.4	6.4	4.9	4.1	17.3	17.1	5.8	6.9
10	6.5	6.1	6.0	5.8	16.6	16.6	6.1	6.9
11	5.2	5.1	4.2	3.9	16.2	16.8	7.3	6.9
Range	5.2-7.4	5.1-7.4	3.9-6.0	3.9-6.7	10.6-19.1	10.3-18.6	5.3-7.3	6.1-7.0
mediana	6.3	6.1	4.6	4.4	13.5	13.5	5.8	6.9

Capitolo 4

PARTE SPERIMENTALE

4.1 Studio fitochimico

4.1.1 Estrazione delle tre cultivar

Il materiale vegetale di partenza è stato raccolto il 4 gennaio 2013 a San Cristoforo dalla ditta Young fruit di Vincenzo Gatto e a Melito Porto Salvo dalla ditta Visalli srl, in provincia di Reggio Calabria. Abbiamo avuto a disposizione: 33 frutti Femminello, di cui 26 sani (3.3 Kg) e 7 rovinati durante il trasporto, con una resa in succo di 1.5 L; 19 frutti Fantastico, di cui 16 sani (3.2 Kg) e 3 rovinati, con resa in succo di 1.4 L; 19 frutti Castagnaro, di cui 16 sani (4.6 Kg) e 3 rovinati, con resa in succo di 1.5 L.

I frutti appartenenti ad ogni cultivar sono stati spremuti manualmente nel nostro laboratorio. Il succo ottenuto è stato filtrato con filtro di ceramica per eliminare i semi, conservato in brik e prontamente congelato a -20 °C. Al momento necessario per procedere con l'analisi, il succo congelato è stato prelevato, grattando, per ottenere circa 10 ml, scongelato e diluito (1:1) con dimetilformammide (DMF) e centrifugato tre volte a 3200 rpm per 15 minuti. In seguito ad ogni centrifugazione è stato prelevato il sovrantante, eliminando il precipitato di cellulosa. Il succo così ottenuto è stato filtrato con una siringa di vetro tramite filtro PTFE 0.45 µm. In figura 39 e 40 si riporta il succo centrifugato (Fig. 39) e la differenza tra succo scongelato e quello centrifugato e filtrato (Fig. 40).



Figura 39 Succo centrifugato



Figura 40 Succo centrifugato-filtrato e succo scongelato

Il succo è stato poi sottoposto ad analisi HPLC-PDA-MS al fine di analizzare e confrontare qualitativamente ogni singola cultivar. Le analisi HPLC-PDA-MS, in modalità negativa, sono state effettuate utilizzando uno strumento Thermofinngan e una colonna Synergi 4u Fusion-RP 80 A, 150 x 4.60 mm. L'eluizione è stata condotta con un flusso di 0.8 mL/min, utilizzando il seguente gradiente:

min	% solvente A (CH ₃ CN)	% solvente B (H ₂ O)
0	5	95
30	30	70
31	70	30
31	100	0
41	100	0

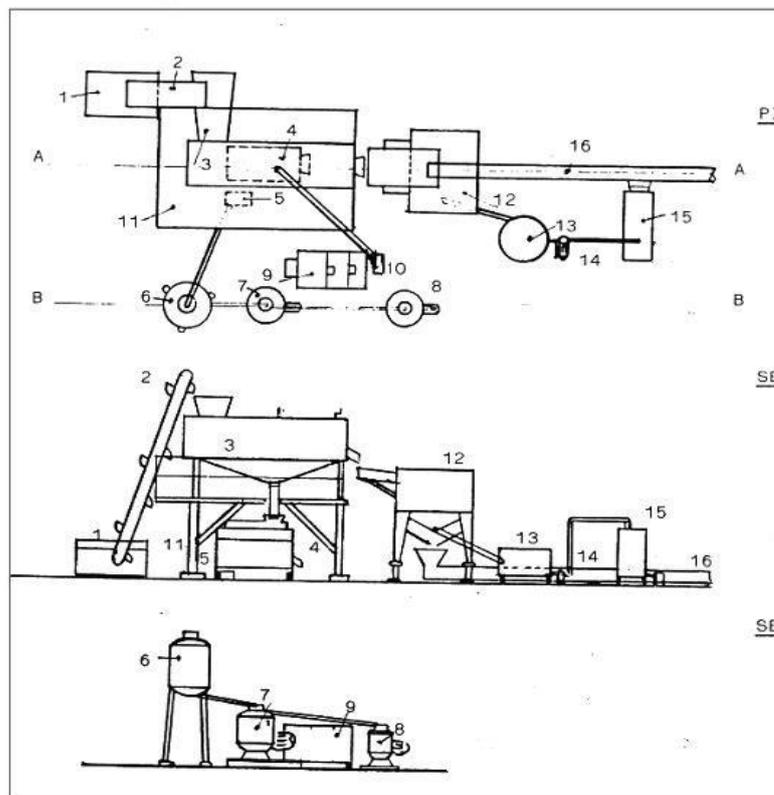
Dall'analisi e confronto dei vari cromatogrammi Full Scan MS e PDA, si evince che le tre cultivar non hanno differenze qualitative, anche se i cromatogrammi ottenuti si sono rivelati abbastanza complessi. I composti sono stati identificati tramite la valutazione dei tempi di ritenzione della separazione cromatografica (t_R), degli spettri di assorbimento UV-Vis e di massa con il supporto dei dati presenti in letteratura sia sul genere *Citrus* che sulla specie *Citrus bergamia*.

4.1.2 Estrazione succo industriale

I frutti utilizzati per ottenere il succo con metodi industriali subiscono un lungo processo in un impianto tipico per l'estrazione dell'olio essenziale e in seguito del succo dagli agrumi. Dopo la raccolta i frutti vengono trasportati allo stabilimento dove si effettua l'estrazione dell'olio essenziale e del succo. Tra la raccolta e la lavorazione i frutti vengono conservati per qualche giorno in appositi box ben areati e asciutti. I frutti provenienti dai box con nastro trasportatore **1** vengono avviati ad un elevatore **2** che li fa cadere nella tramoggia dell'estrattore dell'olio essenziale **3** (chiamato comunemente "pelatrice") dove vengono sottoposti all'abrasione dell'epidermide sotto pioggia d'acqua. L'acqua così arricchitasi di olio essenziale passa nel sottostante filtro-pressa **4**, che filtra la miscela eliminando le parti solide dopo averle spremute nell'apposito torchio continuo a due eliche incorporato nella macchina stessa, quindi a mezzo della pompa **5** e tramite il serbatoio di alimentazione **6** va nella centrifuga a scarico automatico dei detriti solidi **7**, dove avviene la separazione di una miscela ricca al 50% di olio essenziale e dell'acqua, che attraverso la vasca di decantazione a tre settori **9** e la pompa di ricircolazione **10** rientra nella "pelatrice" **3**, dove

il ciclo ricomincia. La miscela ricca di olio essenziale passa invece al separatore centrifugo **8** che separa definitivamente l'olio essenziale dall' acqua residua. I frutti dopo la pelatura vanno a finire nel canale dell' estrattore di succo **12** dove vengono tagliati a metà e spremuti. Il pastazzo così ottenuto esce dallo scarico al centro dell' estrattore e prelevato da una coclea **16** viene avviato ad appositi silos e sarà destinato all'alimentazione del bestiame (ovini,bovini). Il succo viene raccolto in una vasca **13**, quindi a mezzo di una pompa tipo "mono" **14** inviato ad apposite cisterne **15**. Si riporta in figura l'immagine dell'impianto. Il succo industriale da noi analizzato, la descrizione e immagine dell'impianto d'estrazione ci sono stati offerti dalla DITTA DIEGO VISALLI – Estrazione Essenze e Derivati agrumari di Melito Porto Salvo.

IMPIANTO ESTRAZIONE OLIO ESSENZIALE E SUCCO DAGLI AGRUMI



- | | |
|---------------------------------------|---|
| 1) Nastro trasportatore | 9) Vasca decantazione |
| 2) Elevatore | 10) Pompa ricircolazione acqua |
| 3) Estrattore olio essenziale | 11) Impalcatura di sostegno "Pelatrice" |
| 4) Filtro-prensa rotativo | 12) Estrattore succo |
| 5) Pompa mosto oleoso | 13) Vasca succo |
| 6) Serbatoio alimentazione centrifuga | 14) Pompa "mono" per il succo |
| 7) Centrifuga a scarico automatico | 15) Cisterna per il succo |
| 8) Centrifuga secondaria | 16) Coclea smaltimento pastazzo e detriti |

Figura 41 Impianto estrazione industriale

Il succo industriale per le analisi in laboratorio è stato sottoposto allo stesso trattamento dei precedenti succhi (par. 4.1.1)

4.2 Studio clinico

4.2.1 Studio di riferimento

Il nostro studio clinico prende come riferimento uno del 2007, effettuato presso il Centro Emofilia di Reggio Calabria, in cui sono state testate le proprietà mediche del succo di bergamotto, ottenuto tramite processo industriale. Tale studio ha previsto le seguenti caratteristiche:

4.2.1.1 Campione di volontari

Sono stati arruolati ventiquattro soggetti, volontari, in buone condizioni cliniche generali. Il campione di volontari, analizzato nel 2007, ha un'età compresa fra 22 e 68 anni (media 43,6), composto da 7 maschi e 17 femmine. I criteri di esclusione sono stati il trattamento in corso con anticoagulanti, antiaggreganti, farmaci ipolipidemizzanti o terapie con folati e/o vitamine del gruppo B.

4.2.1.2 Estrazione del succo e somministrazione

Dopo la raccolta e la spremitura del frutto, il succo di bergamotto è stato subito congelato a -20 °C e scongelato al momento dell'assunzione. I soggetti arruolati sono stati sottoposti a tre prelievi. Dopo il primo prelievo (T0), i soggetti hanno assunto 50 ml di succo al giorno. Dopo due settimane è stato fatto un secondo prelievo (T1) e per finire i soggetti arruolati hanno assunto ogni giorno 100 ml di succo per altre due settimane, al termine delle quali sono stati sottoposti a un terzo prelievo (T2).

4.2.1.3 Prelievo e dosaggi

I partecipanti allo studio sono stati sottoposti a tre prelievi di sangue: al primo (T0), al quattordicesimo (T1) e al ventottesimo (T2) giorno dello studio. Per ogni prelievo sono stati eseguiti i seguenti dosaggi:

- **Fattore VIII:** è una glicoproteina plasmatica che è attivato durante i processi coagulativi e agisce come cofattore del fattore IX accelerando fino a 200.000 volte la conversione del fattore X in X attivato per opera del F IX attivato. L'aumento

persistente del Fattore VIII può costituire una condizione di aumentato rischio trombotico (Kamphuisen *et al.*, 1999) (Kraaijenhagen *et al.*, 2000).

- parametri emocoagulativi monitorati in quanto indici d'attivazione della coagulazione
 - **D-Dimeri**: prodotti di degradazione della fibrina che aumentano nel sangue in caso di attivazione della fibrinolisi,
 - **Attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA)**: svolge un ruolo fondamentale nell'attivazione e trasformazione del plasminogeno in plasmina che a sua volta degrada la fibrina dando luogo alla trombolisi. Il tPA viene rilasciato in circolo in seguito a trombosi venosa, sforzo fisico e stress. Livelli aumentati di tale parametro possono fungere da markers di rischio nell'infarto, ictus, ed altri eventi trombotici,
 - **Inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1)**: un'insufficiente attività del PAI-1 si accompagna a disturbi emorragici, mentre elevati livelli sono osservati nei casi d'infarto del miocardio, ictus ed altre patologie cardiovascolari, così come nelle complicanze della gravidanza su base protrombotica,
 - **Complesso Trombina-Antitrombina (TAT)**: è uno degli inibitori fisiologici della coagulazione. La sua azione anticoagulante consiste nell'inattivazione della trombina con cui si lega irreversibilmente,
 - **Frammento Protrombinico 1 e 2 (F1 + 2)**: è un peptide che origina dall'attivazione della protrombina a sua volta attivata dal fattore X,
- **Omocisteina basale**: è un derivato intermedio della via metabolica della metionina. Numerosi dati clinici supportano l'iperomocisteinemia come fattore di rischio per infarto miocardico, ictus cerebrale, vasculopatia periferica e trombosi. Il deposito di omocisteina sulla parete vasale è lesivo, attraverso vari meccanismi: azione diretta sull'endotelio e sulla parete vasale con marcato effetto aterogeno; azione sulle piastrine, con aumento della adesività ed aggregabilità piastrinica; azione sui fattori della coagulazione e sulle lipoproteine
- **Colesterolo** (Totale, HDL, LDL) e **Trigliceridi**. Si riporta in figura 42 la biosintesi del Colesterolo.

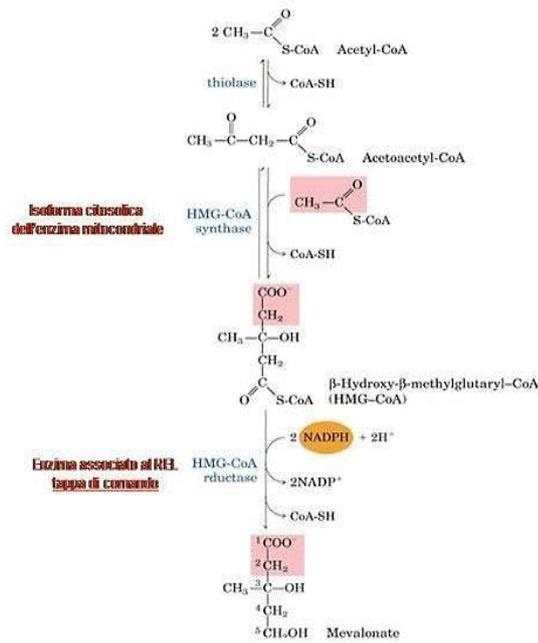


Figura 42 Biosintesi del colesterolo

La particolare attenzione ai fattori e ai cofattori della coagulazione ha avuto l'obiettivo di evidenziare eventualmente un'azione anticoagulante o antiaggregante del succo. Si riporta in figura la cascata emocoagulativa e i fattori coinvolti in essa:

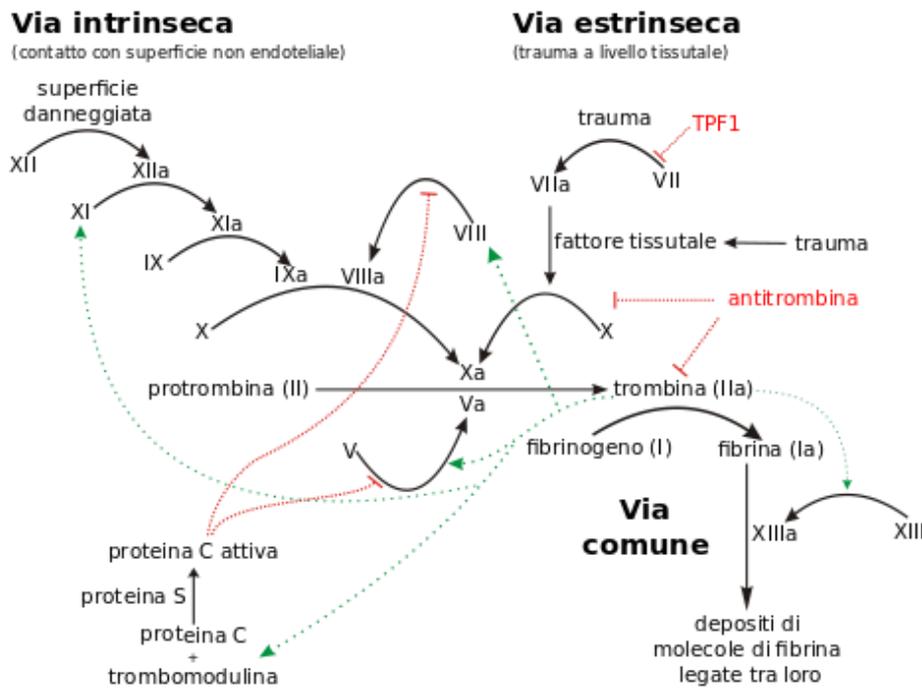


Figura 43 Cascata coagulativa

4.2.2 Studio clinico 2013

4.2.2.1 Volontari

I pazienti studiati sono stati undici (3 maschi e 8 femmine); di età compresa tra 42 e 80 anni (media 52.4). Tutti i pazienti arruolati hanno preventivamente firmato un apposito consenso informato su modalità e scopi dello studio. Il criterio di esclusione è stato l'assunzione di farmaci ipolipidemizzanti.

4.2.2.2 Dosaggio e prelievo

Lo studio è stato condotto tra Febbraio ed Aprile 2013. Ogni paziente ha assunto quotidianamente 20 ml di succo di bergamotto fresco. Il frutto è stato sottoposto a spremitura manuale ogni giorno e immediatamente somministrato. Il periodo di assunzione del succo è stato compreso tra 23 e 37 giorni (media 30.9). Per quanto riguarda la qualità di bergamotto assunto: 7 pazienti hanno assunto frutti della cultivar *Fantastico* e 4 della cultivar *Castagnaro*.

Sono stati analizzati i seguenti parametri di laboratorio:

- **colesterolo** (totale, HDL, LDL),
- **trigliceridi**,
- **velocità di eritrosedimentazione (VES)**,
- **proteina C reattiva (PCR)**,
- **fattore VIII**,
- **elettroforesi proteica**.

Capitolo 5

MATERIALI E METODI

5.1 Studi fitochimici

5.1.1 Metodi chimico-fisici

5.1.1.1 Spettri di massa

Gli spettri di massa ESI-MS (modalità negativa) sono stati registrati con uno spettrometro Thermo Finnigan LC-Q Advantage a trappola ionica equipaggiato con un software Xcalibur. I campioni sono stati sciolti in metanolo ed iniettati nella sorgente ESI utilizzando una pompa a siringa. La velocità del flusso è stata di 5 $\mu\text{l}/\text{min}$.

5.1.1.2 HPLC-PDA-ESI-MS

Le analisi HPLC-PDA-ESI-MS sono state effettuate in uno strumento Thermo Finnigan e una colonna Synergi 4 μ Fusion-RP 80 A, 150 x 4.60 mm. L'eluizione è stata condotta con un flusso di 0.8 ml/min con un sistema di splitting di 2:8 per cui 160 $\mu\text{l}/\text{min}$ al detector MS e 640 $\mu\text{l}/\text{min}$ al PDA (Figura 44). L'analisi è stata condotta con un'interfaccia ESI in modalità negativa. Le condizioni di ionizzazione sono state ottimizzate e i parametri sono stati i seguenti:

- temperatura capillare: 280 °C
- voltaggio capillare: 27.00 V
- tube lens offset: 45.00 V
- sheath gas rate flow: 30.00 unità arbitrarie
- auxiliary gas rate flow: 5.00 unità arbitrarie
- voltaggio spray: 4.50 kV
- range di scansione m/z : 150.00-2000

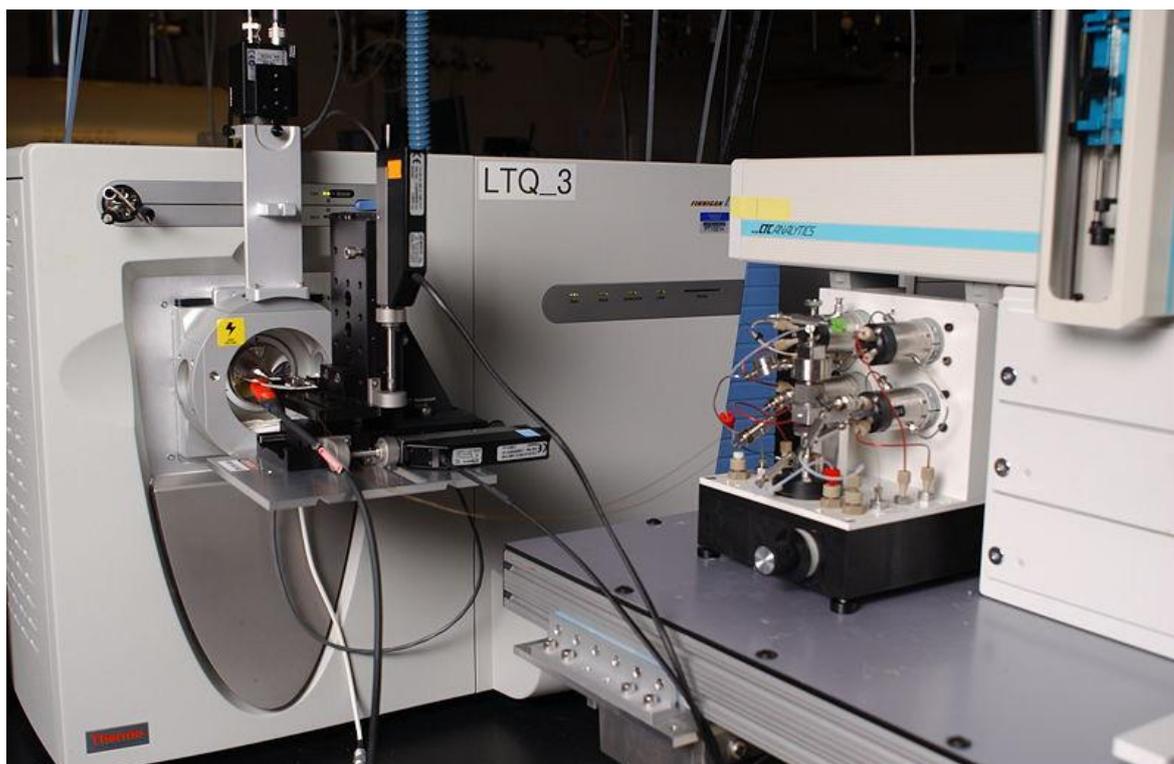


Figura 44 Strumentazione HPLC-PDA-ESI-MS

I dati del PDA sono stati registrati in un range di 200-650 nm. Il volume dell'iniezione è stato 10 μ l. Il metodo utilizzato per le analisi in oggetto prevedeva l'utilizzo di CH₃CN (solvente A) e H₂O (solvente B) utilizzando il seguente gradiente:

min	% solvente A (CH₃CN)	% solvente B (H₂O)
0	5	95
30	30	70
31	70	30
31	100	0
41	100	0

5.2 Studi clinici

5.2.1 Analisi della VES

E' stato utilizzato lo strumento Alifax ESR – Test 1 il quale ha la capacità di analizzare in 20 secondi l'aggregazione dei globuli rossi. Le caratteristiche dello strumento sono le seguenti:

Power supply: 115- 260 VAC 10%, 50/60 Hz;

Power consumption: 150 VA max;

Operative temperature: from +10 to + 30 °C

Size: 510x560x600 mm;

Weight: 45 Kg

In/ out specifications: two RS232 serial ports

Bar code reader: internal

5.2.2 Analisi Fibrinogeno e Fattore VIII

Il Fibrinogeno e il Fattore VIII sono stati dosati con lo strumento denominato BCS XP (Siemens Healthcare Diagnostics).

5.2.3 Analisi Colesterolo totale, HDL, LDL, trigliceridi e proteine totali

E' stata utilizzata la metodica colorimetrica, tramite lo strumento VITROS 5,1 FS della Ortho Clinical Diagnostics, per effettuare i dosaggi di colesterolo totale, HDL, LDL, trigliceridi e proteine totali. Principi di misura: potenziometrico (ISE diretta), Colorimetrico / Rate, Immuno-rate, torbidimetrico

- lunghezze d'onda MicroSlide: 340, 400, 460, 540, 600, 630, 670 e 680 nm
- lunghezze d'onda MicroTip: 340, 380, 405, 510, 540, 575, 600, 620, 660, 700 e 800 nm

5.2.4 Analisi PCR

Viene eseguita tramite la tecnica di nefelometria, supportata dallo strumento BN ProSpec® (Figura 45). E' un sistema dedicato e compatto che offre un ampio menu di reagenti per analisi delle proteine plasmatiche di routine e specialistiche, che includono test per la valutazione del rischio cardiaco, disfunzioni renali, valutazione dello stato nutrizionale, del ferro e dell'anemia.



Figura 45 BN ProSpec System

5.2.5 Analisi dell'elettroforesi proteica

L'elettroforesi proteica si effettua con una metodica detta elettroforesi capillare ad alto voltaggio. Lo strumento utilizzato è il CAPILLARYS 21 della SEBIA (Figura 46). E' dotato di una batteria di 8 capillari in parallelo, che permette il trattamento dei campioni con una produttività elevata. Le migrazioni sono interamente effettuate a temperatura controllata tramite un sistema con effetto PELTIER diretto. La lettura realizzata a lunghezza d'onda di assorbimento specifica per le proteine, contribuisce ad ottenere una sensibilità di misura eccellente e dei risultati correlati con i dosaggi immunochimica. Il monocromatore del sistema ottico permette di lavorare in un intervallo di lunghezze d'onda che va da 200 a 600 nm.

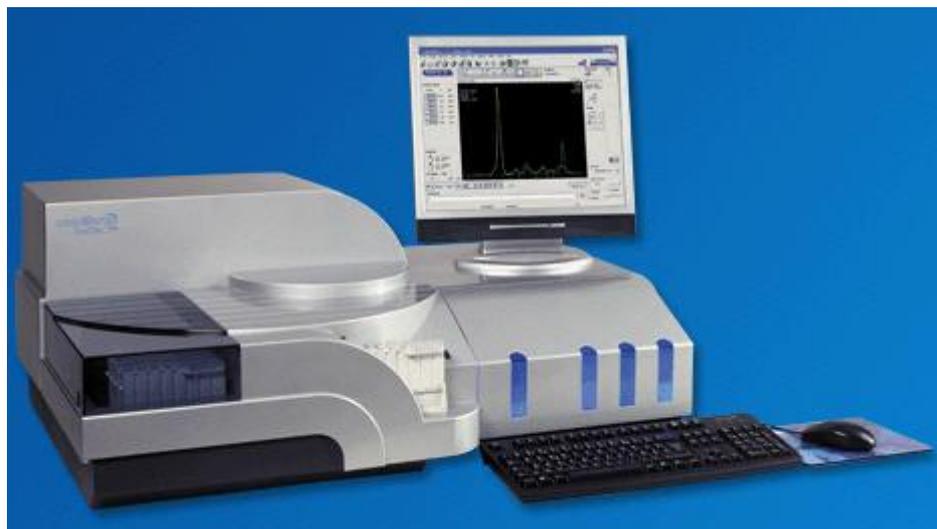


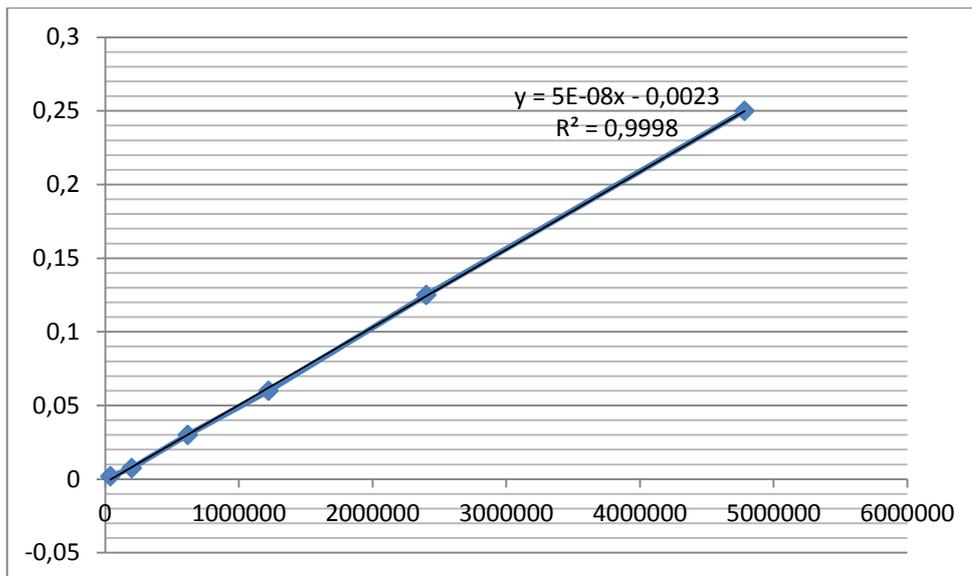
Figura 46 Strumento CAPILLARY 21

CONCLUSIONI

L'interesse verso il succo di bergamotto è scaturito dalla volontà di analizzare i componenti del fitocomplesso e successivamente testarli sull'uomo, per uno sfruttamento migliore ai fini nutraceutici e commerciali. L'analisi fitochimica è stata rivolta allo studio di eventuali differenze fra i costituenti del succo di ogni singola cultivar di bergamotto (fantastico, femminello, castagnaro) e il succo preparato tramite mezzi industriali.

La caratterizzazione del complesso flavonoidico tramite cromatografia liquida ad alta pressione accoppiata alla spettrometria di massa (LC-PDA-MS), ci ha permesso di identificare i seguenti composti: **acido chinico**; cinque C-glucosilflavoni, **vicenina-2**, **lucenina-2,4'-metiletere**, **scoparina** o **orientina-4'-metiletere**, **chrisoeriolo-7-O-neoesperidoside** e **diosmetina-7-O-neoesperidoside**; quattro flavanoni glicosidi, ovvero **eriocitrina** associata alla **neeriocitrina**, **naringina**, **neoesperidina**; tre flavanoni glicosidi coniugati all'acido 3-idrossi-3-metilglutarico, ovvero **3-idrossi-3-metilglutarilneeriocitrina**, **melitidina** e **brutieridina**. Ad eccezione della vicenina-2 e della naringina, i quali sono stati identificati tramite il confronto con composti standard puri, i rimanenti composti sono stati identificati mediante i dati riportati in letteratura.

I risultati ottenuti hanno mostrato un'eguaglianza da un punto di vista qualitativo tra le tre cultivar e una differenza rispetto al fitocomplesso del succo industriale, che differisce dagli altri per la presenza di **chrisoeriolo-7-O-neoesperidoside** e **diosmetina-7-O-neoesperidoside**. A differenza dei dati riportati in letteratura, abbiamo riscontrato nel succo industriale la presenza in tracce di furanocumarine, tipiche del flavedo degli agrumi. Inoltre, è stato riscontrato un picco corrispondente ad un derivato della neeriocitrina, che è stato tentativamente identificato come 3-idrossi-3-metilglutarilneeriocitrina, la cui completa caratterizzazione si rende auspicabile in futuro mediante isolamento del composto puro. Sarebbe interessante poter continuare l'analisi fitochimica rivolgendo l'attenzione alla differenza quantitativa del contenuto dei flavonoidi tra le quattro specie di succo investigate. Si riporta in figura la retta di taratura, effettuata durante la tesi, dello standard naringenina da cui si potrebbe procedere per l'analisi quantitativa dei flavanoni-O-glicosilati



L'analisi clinica, invece, ha visto la valutazione dell'effetto terapeutico del succo di bergamotto monitorando i parametri emocoagulativi in soggetti sani, o comunque non sottoposti a terapie antiaggreganti o anticoagulanti, così come a terapie ipolipidemizzanti o supplementazioni vitaminiche. Confrontando i nostri dati con quelli riportati in letteratura (Gliozzi *et al.*, 2013; Mollace *et al.*, 2011; Miceli *et al.*, 2007), possiamo affermare che, dopo il periodo di assunzione del succo di bergamotto è stata riscontrata una riduzione dei livelli di colesterolo totale (nel 90% dei pazienti), LDL (73%) e trigliceridi (63%) in più della metà dei soggetti studiati, così come si è avuto un aumento del colesterolo HDL (80% dei pazienti). Inoltre gli indici infiammatori quali VES e PCR sono aumentati, mentre il Fibrinogeno (nel 63% dei pazienti) e il Fattore VIII (nel 63% dei pazienti) si sono ridotti. I parametri che si riferiscono all'elettroforesi proteica si sono ridotti anche se in maniera meno evidente rispetto agli altri, tranne che nel caso dell'alfa-2-globulina.

Purtroppo la bassa potenza dello studio e l'alta variabilità dei risultati non hanno reso significativa l'indagine statistica. Studi su un campione più numeroso di volontari, randomizzati e con un più ampio periodo di assunzione, in corrispondenza del totale periodo di maturazione del frutto (da novembre a marzo), sono necessari per valutare se il trend riscontrato nei parametri valutati può risultare significativo.

BIBLIOGRAFIA

- Capasso F., Grandolini G., Izzo A.A., 2006 – *Fitoterapia: impiego razionale delle droghe vegetali* - Springer, Italia, p. 238- 243.
- Cautela D., Laratta B., Santelli F., Trifirò A., Servillo L., Castaldo D., 2008– *Estimating Bergamot Juice adulteration of lemon juice by high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of flavanone glycosides* – Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56, 5407-5414.
- Chiereghin P., 2005- *Fitoterapia per il farmacista* – Tecniche Nuove
- Gardana C., Nalin F., Simonetti P., 2008– *Evaluation of flavonoids and furanocoumarins from Citrus bergamia (Bergamot) juice and identification of new compounds* – Molecules, 13, 2220-2228.
- Gattuso G., Barreca D., Caristi C., Gargiulli C., Leuzzi U., 2007 – *Distribution of flavonoids and furocoumarins in juices from cultivars of Citrus bergamia Risso* – Journal Food Chemistry, 55, 9921-9927.
- Gattuso G., Caristi C., Gargiulli C., Bellocco E., Toscano G., Leuzzi U., 2006 – *Flavonoid Glycosides in Bergamot Juice (Citrus bergamia Risso)*- Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 3929-3935.
- Giorgi M., Amatori F.M., Meucci V., Giusiani M., Soldani G., Corazza M., 2004 – *Effect of grapefruit juice on the pharmacokinetics of cyclosporine in dogs* - The Veterinary Record, 154, 180-181
- Giorgi M., Meucci V., Vaccaro E., Mengozzi G., Giusiani M., Soldani G., 2003 - *Effects of liquid and freeze-dried grapefruit juice on the pharmacokinetics of praziquantel and its metabolite 4'-hydroxy praziquantel in beagle dogs* – Pharmacological Research, 47, 87-92.
- Gliozzi M, Walker R, Muscoli S, Vitale C, Gratteri S, Carresi C, Musolino V, Russo V, Janda E, Ragusa S, Aloe A, Palma E, Muscoli C, Romeo F, Mollace V., 2013 - *Bergamot polyphenolic fraction enhances rosuvastatin-induced effect on LDL-cholesterol, LOX-1 expression and protein kinase B phosphorylation in patients with hyperlipidemia* – International Journal of Cardiology, 170, 140- 145.
- Kamphuisen P.W., Eikenboom J.C.J., Vos H.L., Pablo R., Sturk A., Bertina R.M., Rosendaal F.R., 1999- *Increased levels of factor VIII and fibrinogen in patients with venous thrombosis are not caused by acute phase reactions*. Thrombosis and Haemostasis, 81, 680–683.

- Kawaii S., Tomono, Katase Y., Ogawa E., Yano M.- 1999- *HL-60 differentiating activity and flavonoid content of the readily extractable fraction prepared from Citrus juices* - Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 128–135
- Kraaijenhagen R.A., Anker P.S., Koopman M.W., Reitsma P.H., Prins M.H., 2000- *Ende van den A, Buller HR. High plasma concentration of factor VIIIc is a major risk factor for venous thromboembolism*- Thrombosis and Haemostasis, 83, 5–9.
- Leopoldini M., Malaj N., Toscano M., Sindona G., Russo N., 2010 – *On the inhibitor effects of bergamot juice flavonoids binding to the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGR) enzyme* - Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58, 10768-10773.
- Lombardo G., Malara D., Mollace V., 2010 – *Phytocomplex from bergamot fruit, process of manufacture and use as dietary supplement and in the pharmaceutical field – International application published under the patent cooperation treaty – International Publication Number WO 2010/055490 A2.*
- Mangiola C., Polimeni G., 1997 – *Un agrume molto colto. Il bergamotto, mito e storia*- Editrice Culture.
- Maugini E., Maleci Bini L., Mariotti Lippi M., 2006 – *Manuale di botanica farmaceutica* – Piccin- Nuova Libreria.
- Mencherini T., Campone L., Piccinelli A. L., Mesa M. G., Armenteros D. M., Aquino R., Rastrelli L., 2012 - *HPLC-PDA-MS and NMR Characterization of a Hydroalcoholic Extract of Citrus aurantium L. var.amara Peel with Antiedematogenic Activity* -Journal of Agricultural and Food Chemistry 61, 1686–1693.
- Miceli N., Mondello M. R., Monforte M. T., Sdrafkakis V., Dugo P., Crupi M. L., Taviano M. F., De Pasquale R., Trovato A., 2007 – *Hypolipidemic effects of Citrus bergamia Risso et Poiteau juice in rats fed a hypercholesterolemic diet* - Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55 10671-10677.
- Mollace V., Sacco I., Janda E., Malara C., Ventrice D., Colica C., Visalli V., Muscoli S., Ragusa S., Muscoli C., Rotiroti D., Romeo F., 2011 – *Hypolipemic and hypoglycaemic activity of bergamot polyphenols: from animal models to human studies* – Fitoterapia, 82, 309- 316
- Morelli I., Flamini G., Pistelli L., 2005 – *Manuale dell'erborista. Biosintesi, estrazione e identificazione delle sostanze di origine vegetale* – Tecniche Nuove
- Moufida S., Marzouk B. – *Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange.*, 2003 – Phytochemistry 62, 1283-1289

- Paine M.F., Criss A. B., Watkins P. B., 2004 - *Two major grapefruit juice components differ in intestinal CYP3A4 inhibition kinetic and binding properties* – Drug metabolism and Disposition, 32, 547/1175655
- Pernice R., Borriello G., Ferracane R., Borrelli R. C., Cennamo F., Ritieni A., 2009 – *Bergamot: a source of natural antioxidants for functionalized fruit juices* – Food Chemistry, 112, 545-550
- Sindona G., Di Donna L., Dolce V., 2010 – *Natural molecole extracted from bergamot tissues, extraction process and pharmaceutical use - International application published under the patent cooperation treaty* – International Publication Number WO 2010/041290 A1
- Sommella E., Pepe G., Pagano F., Ternore G. C., Dugo P., Manfra M., Campiglia P., 2013 – *Ultra high performance liquid chromatography with ion-trap TOF-MS for the fast characterization of flavonoids in Citrus bergamia juice* –Journal of Separation Science, 36, 3351-3355
- Sottilotta G., Siboni S.M., Cuzzola F., Oriana V., Piromalli A., Visalli A., Latella C., Trapani Lombardo V., 2008 – *Favourable influence of bergamot juice dietary intake on lipidic and haemostatic markers* – Haematologica the hematology journal – XX Congresso della Società italiana per lo studio dell' emostasi e della trombosi (SISSET) - Settembre 2008, P049.
- Testai L., Martelli A., Marino A., D'Antongiovanni V., Ciregia F., Giusti L., Lucacchini A., Chericoni S., Breschi M. C., Calderone V., 2013 - *The activation of mitochondrial BK potassium channels contributes to the protective effects of naringenin against myocardial ischemia/reperfusion injury* - Biochemical Pharmacology, 85, 1634–1643
- Wiejak J., Dunlop J., Mackay S. P. and Yarwood S. J., 2013 - *Flavanoids induce expression of the suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3) gene and suppress IL-6-activated signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activation in vascular endothelial cells* - Biochemical Journal, 454, 283–293

SITI WEB

ISMEA,Nocella, Report Bergamotto 10/5/2012

www.ismeaservizi.it/flex/cm/pages/...php/L/.../BLOB%3AID%3D577