



Università della Calabria

Dipartimento di Farmacia e Scienze della salute e della nutrizione

Dottorato di ricerca
“Medicina traslazionale”
XXX ciclo

Estratti naturali ad azione polivalente sui pathway di alterazioni metaboliche

Settore scientifico disciplinare Bio15 – Biologia farmaceutica

Coordinatore

Ch.mo Prof. Sebastiano Andò

Supervisore

Ch.mo Prof. Giancarlo Statti

Dottoranda

dr. Teresa Casacchia

2014 -2017

ad Alessia e Francesco

Indice

Lista tabelle	i
Lista figure	iii
Introduzione	1
Capitolo 1 Sistematica, tassonomia e proprietà biologiche	3
1.1 Storia tassonomica <i>M. comosum</i>	3
1.1.1 Le specie del genere <i>Muscari</i>	6
1.1.2 <i>Muscari comosum</i> (L.) Mill. dalla botanica all'etnobotanica	7
1.1.3 Componente fitochimica nel <i>M. comosum</i>	10
1.1.4 Proprietà medicinali ed utilizzi terapeutici	16
1.1.4.1 Attività antiossidante e antiobesità <i>in vitro</i>	17
1.1.4.2 Attività antinfiammatoria	18
1.1.4.3 Attività antimutagena, anticancerogena e citotossica	19
1.1.4.4 Attività antibatterica e antivirale	19
1.1.4.5 Attività neuroprotettiva	20
1.2 Storia tassonomica <i>Citrus</i> L.	21
1.2.1 Caratteristiche botaniche del genere <i>Citrus</i> L.	22
1.2.2 Componente fitochimica in <i>Citrus</i> L.	24
1.2.3 Proprietà medicinali ed utilizzi terapeutici	26
1.2.3.1 Attività antiossidante e antiobesità	27
1.2.3.2 Attività antiperlipidemia	28
1.2.3.3 Attività antipertensiva	29
1.2.3.4 Attività antiperglicemica	30
1.2.3.5 Proprietà antitumorali	31
1.2.3.6 Attività antimicrobica	32
1.3 Storia tassonomica <i>Citrullus lanatus</i> (Thunb.) Matsum. & Nakai	33
1.3.1 Caratteristiche botaniche <i>Citrullus lanatus</i>	33
1.3.2 Caratteristiche fitochimiche <i>Citrullus lanatus</i>	34
1.3.3 Proprietà medicinali ed utilizzi terapeutici	38
1.3.3.1 Attività antiperglicemica	39
1.3.3.2 Attività antiperlipidemia	40
1.3.3.3 Attività antipertensiva	40
1.3.3.4 Attività antibatterica	41
1.3.3.5 Attività anticarcinogenica	42
1.3.3.6 Attività controllo disfunzione erettile	42
1.3.3.7 Attività lassativa	43
Capitolo 2 Sindrome metabolica e fattori di rischio	44
2.1 Criteri di definizione della Sindrome metabolica	46
2.2 Fattori di rischio	46
2.2.1 Obesità	46
2.2.2 Insulino-resistenza	47
2.2.3 Dislipidemia	48
2.2.4 Ipertensione	49
Capitolo 3 Materiali e metodi	53
3.1 Materiali	54

3.1.1	Reagenti per saggi chimici	57
3.2	Metodi	58
3.2.1	Estrazione e preparazione dei campioni	58
3.2.2	Analisi chimica	62
3.2.2.1	Determinazione dei polifenoli totali metodo Folin-Ciocalteau	62
3.2.2.2	Determinazione dei flavonoidi totali	63
3.2.2.3	Dosaggio licopene	64
3.2.2.4	Determinazione della L- citrullina	65
3.2.2.5	Determinazione della Vit. C	66
3.2.2.6	HPLC – UV- DAD	66
3.2.2.7	GC-MS	66
3.2.2.8	HPLC	66
3.2.2.9	Attività antiossidante metodo DPPH	68
3.2.2.10	Attività antiossidante metodo β carotene <i>bleaching</i> test (BCB)	68
3.2.3	Saggi enzimatici <i>in vitro</i>	69
3.2.3.1	Determinazione dell'inibizione della lipasi pancreatica	69
3.2.3.2	Determinazione dell'inibizione dell'attività dell'enzima α -amilasi	70
3.2.3.3	Coltura cellulare saggio MTT (MCF-7)	70
3.2.4	Disegno di studio in vivo	71
3.2.4.1	Variabili antropometriche	72
3.2.4.2	Istologia del tessuto grasso	72
3.2.4.3	Misura biochimica del sangue	72
3.2.4.4	Homa Index	73
3.2.4.5	<i>Western Blot</i> : enzimi gluconeogenici/gluconeogenesi	73
3.2.4.6	Perfusione secondo metodica Langendorff	73
3.2.4.7	Statistica	76
Capitolo 4	Risultati e discussioni	77
4.1	Premessa	77
4.2	<i>Muscari comosum</i> (L.) Mill.	78
4.2.1	Analisi chimica	78
4.2.1.1	Polifenoli, flavonoidi totali, attività antiossidante	78
4.2.1.2	HPLC e GC-MS	83
4.2.2	Saggi enzimatici <i>in vitro</i>	86
4.2.2.1	Inibizione di lipasi e amilasi pancreatica di bulbi <i>M. comosum</i>	87
4.2.2.2	Attività antiproliferativa su cellule MCF-7 (MTT test) <i>M. comosum</i>	87
4.2.3	Saggi in vivo	88
4.2.3.1	Animali, parametri antropometrici e metabolici	88
4.2.3.2	Istologia dei tessuti adiposi	93
4.2.3.3	Cuore isolato e perfuso secondo Langendorff	96
4.3	<i>Citrus</i> L.	98
4.3.1	Analisi chimica	99
4.3.1.1	Polifenoli, flavonoidi totali, attività antiossidante	100
4.3.1.2	HPLC determinazione naringina, naringenina ed esperedina	109
4.3.2	Saggi enzimatici	110
4.3.2.1	Inibizione di lipasi e amilasi pancreatica	110
4.3.3	Animali, parametri antropometrici e metabolici	115

4.4 <i>Citrullus lanatus</i> (Thunb.) Matsum. & Nakai	120
4.4.1 Analisi chimica	121
4.4.1.1 Polifenoli, flavonoidi e attività antiossidante	121
4.4.1.2 Saggi enzimatici	125
Conclusioni	126
Bibliografia	131

Lista tabelle

- tab. 1 Classificazione *Cronquist* e *APGIII*
- tab. 2 Criteri diagnostici per sindrome metabolica
- tab. 3 Origine, periodo di raccolta e sigla di *M. comosum* (2014)
- tab. 4 Origine, periodo di raccolta e sigla *Citrus* 2014-2015)
- tab. 5 Origine, periodo di raccolta e sigla *Citrus* (2015- 2016)
- tab. 6 Origine, periodo di raccolta, sigla *Citrullus lanatus* (2015 – 2016)
- tab. 7 Resa di estrazione di bulbi *M. comosum* (2014)
- tab. 8 Resa di estrazione di bulbi, gambi e fiori *M. comosum* (Sila, 2015)
- tab. 9 Resa di estrazione di bulbi *M. comosum* crudi e cotti (Sila, 2015)
- tab. 10 Resa di estrazione di polpa *Citrus* (2014-2015)
- tab. 11 Resa di estrazione di buccia *Citrus* (2014-2015)
- tab. 12 Resa di estrazione di foglie *Citrus* (2014-2015)
- tab. 13 Resa di estrazione di bucce Clementina, Tarocco, Tacle® (2015 -2016)
- tab. 14 Resa di estrazione di polpa Clementina, Tarocco, Tacle® (2015 – 2016)
- tab. 15 Resa di estrazione di foglie Clementina, Tarocco, Tacle® (2015 – 2016)
- tab. 16 Resa di estrazione di buccia *Citrullus lanatus*
- tab. 17 Resa di estrazione di polpa *Citrullus lanatus*
- tab. 18 Gradiente di solventi
- tab. 19 Dosi estratto *M. comosum*
- tab. 20 Contenuto in polifenoli, flavonoidi totali e attività antiossidante (DPPH test) di bulbi *M. comosum* di diversa provenienza (anno 2014)
- tab. 21 Contenuto in polifenoli, flavonoidi totali e attività antiossidante (DPPH test) di bulbi, fiori e gambi *M. comosum* di origine calabrese (Sila, 2015)
- tab. 22 Contenuto in polifenoli e attività antiossidante (β -carotene bleaching test) di bulbi, fiori e gambi *M. comosum* di origine calabrese (Sila, 2015)
- tab.23 Contenuto in polifenoli e flavonoidi totali e attività antiossidante (DPPH test) in bulbi *M. comosum* crudi, bolliti e cotti a vapore
- tab. 24 Contenuto in polifenoli e flavonoidi totali e attività antiossidante (β -carotene bleaching test) in bulbi *M. comosum* crudi, bolliti e cotti a vapore
- tab. 25 Contenuto in polifenoli e flavonoidi totali e attività antiossidante (DPPH test) in bulbi *M. comosum* silani (2015, popolazione).
- tab. 26 Contenuto in polifenoli e flavonoidi totali e attività antiossidante (β -carotene bleaching test) in bulbi *M. comosum* silani (2015, popolazione).
- tab. 27 Inibizione di lipasi e amilasi pancreatica di estratti di bulbi crudi e cotti *M. comosum*
- tab. 28 Inibizione di lipasi e amilasi pancreatica di estratti di bulbi crudi *M. comosum* (Sila, 2015, popolazione).
- tab. 29 Variabili antropometriche nei ratti alimentati con SD (dieta standard) o HFD (dieta ad alta percentuale di grassi) o HFD + Lc (20 mg) o HFD + Lc (60 mg) per 12 settimane
- tab. 30 Variabili metaboliche in ratti alimentati con SD (dieta standard) o HFD (dieta ad alta percentuale di grassi) o HFD + Lc (20 mg) o HFD + Lc (60 mg) per 12 settimane
- tab. 31 Campioni e sigle *Citrus*
- tab. 32 Contenuto in polifenoli e flavonoidi totali in estratto di bucce *Citrus*
- tab. 33 Contenuto in polifenoli e flavonoidi totali in estratto di polpa *Citrus*
- tab. 34 Contenuto in polifenoli e flavonoidi totali in estratto di foglie *Citrus*
- tab. 35 Contenuto in polifenoli, flavonoidi totali ed attività antiossidante (DPPH) in estratto di bucce *Citrus*
- tab 36 Contenuto in flavonoidi totali ed attività antiossidante (β -carotene bleaching test) in estratto di bucce *Citrus*

- tab. 37 Contenuto in polifenoli, flavonoidi totali ed attività antiossidante (DPPH test) in estratto di polpa *Citrus*
- tab. 38 Contenuto in flavonoidi totali ed attività antiossidante (β -carotene bleaching test) in estratto di polpa *Citrus*
- tab.39 Contenuto in polifenoli, flavonoidi totali ed attività antiossidante (DPPH test) in estratto di foglie *Citrus*
- tab.40 Contenuto in flavonoidi totali ed attività antiossidante (β -carotene bleaching test) in estratto di foglie *Citrus*
- tab. 41 Contenuto in polifenoli, flavonoidi totali ed attività antiossidante (DPPH test) in estratto di buccia Clementina, Tarocco, Tacle®
- tab.42 Contenuto in polifenoli, flavonoidi totali ed attività antiossidante (DPPH test) in estratto di polpa Clementina, Tarocco, Tacle® (2015)
- tab. 43 Contenuto in polifenoli, flavonoidi totali ed attività antiossidante (DPPH test) in estratto di foglie Clementina, Tarocco, Tacle®
- tab. 44 Contenuto in polifenoli, flavonoidi totali ed attività antiossidante (DPPH test) in buccia Tacle® (*storage*)
- tab. 45 Contenuto in polifenoli, flavonoidi totali ed attività antiossidante (DPPH test) in polpa Tacle® (*storage*)
- tab. 46 Contenuto in esperedina, naringenina, naringina in buccia Tacle® (1 °C e 90 - 95% RH)
- tab. 47 Contenuto in esperedina, naringenina, naringina in polpa Tacle® (1 °C e 90 - 95% RH)
- tab. 48 Inibizione di amilasi e lipasi pancreatici in bucce *Citrus*
- tab. 49 Inibizione di amilasi e lipasi pancreatici in polpa *Citrus*.
- tab. 50 Inibizione di lipasi e amilasi pancreatici in foglie *Citrus*
- tab. 51 Inibizione di lipasi e amilasi pancreatici in buccia Clementina, Tarocco, Tacle®
- tab. 52 Inibizione di lipasi e amilasi pancreatici in polpa Clementina, Tarocco, Tacle®
- tab. 53 Inibizione di lipasi e amilasi pancreatici in estratto di foglie Clementina, Tarocco, Tacle®
- tab. 54 Inibizione di lipasi e amilasi pancreatici in estratto buccia Tacle® (*storage*)
- tab. 55 Inibizione di lipasi e amilasi pancreatici in estratto polpa Tacle® durante (*storage*)
- tab. 56 Contenuto in polifenoli, flavonoidi totali e licopene in polpa *Citrullus lanatus*
- tab. 57 Attività antiossidante in relazione al contenuto in polifenoli e licopene in polpa di *Citrullus lanatus*
- tab. 58 Contenuto in flavonoidi totali ed attività antiossidante (β -carotene bleaching test) in estratto di polpa *Citrullus lanatus*
- tab. 59 Contenuto di citrullina in buccia e polpa *Citrullus lanatus*
- tab. 60 Inibizione di lipasi e amilasi in estratto di polpa *Citrullus lanatus*

Lista figure

- Fig. 1a) bulbi; 1 b) fiori *M. comosum*
- Fig. 2 Struttura licopene e diversi isomeri
- Fig. 3 Digestione e assorbimento di licopene nel piccolo intestino. Fonte Story et al, 2010
- Fig. 4 Enzimi che catalizzano le reazioni indicate: 1, glutammina fosfato-dipendente; 2 e 3, P5C sintetasi; 5, ornitina aminotransferasi (OAT); 6, ornithine carbamoyltransferase (OCT); 7, argininosuccinato sintetasi; 8, argininosuccinato liasi; 9, N-acetilglutammina sintetasi; 10, carbamoyl-fosfato sintetasi I (CPS I); 11, prolina-ossidasi; 12, aspartato aminotransferasi. Il passaggio 4 è spontaneo reazione non enzimatica. Fonte Wu and Morris, 1998
- Fig. 5 Interazione di adipochine, citochine e marcatori infiammatori che contribuiscono allo sviluppo della MetS e delle sue complicanze. HTN-Ipertensione, NAFLD/NASH- steatosi epatica. Fonte Srikanthan et al, 2016
- Fig. 6 Fisiopatologia della sindrome metabolica. Fonte Wu and Morris, 2008
- Fig. 7 Ipotetici meccanismi secondo i quali la sindrome metabolica determina un aumento della pressione arteriosa. Fonte Mulè et al, 2014
- Fig. 8 Retta di taratura acido clorogenico (CAE)
- Fig. 9 Retta di taratura quercetina (QE)
- Fig. 10 Retta di taratura licopene
- Fig. 11 Retta di taratura L-citrullina
- Fig. 12 Rappresentazione grafica dei parametri emodinamici valutabili mediante il sistema di acquisizione dati PowerLab nella metodica Langendorff
- Fig. 13 Struttura base di *homoisoflavonoids* a) 3-benzil-4-cromone b) scillascillina precedentemente identificati in bulbi di *M. comosum*. R1- R6= H-, OH-, oppure CH₃O. Fonte Mulholland D.A. et al, 2013 per dettagli
- Fig. 14 HPLC-UV-DAD profilo cromatografico di estratto idroalcolico di bulbi di *M. comosum* (osservazione a $\lambda=290$ nm)
- Fig. 15 Analisi GC-MS di estratto idroalcolico di bulbi di *M. comosum* (a) profilo cromatografico (total ion current, TIC), (b) frammentogramma relative ai due picchi generate dagli *homoisoflavonoids* 1 (upper panel) and 2 (lower panel) presenti in bulbi (c)
- Fig. 15c molecole *homoisoflavonoids* identificate
- Fig. 16 La vitalità cellulare delle cellule tumorali MCF-7 trattate con estratti di bulbi crudi e cotti (bolliti) di *M. comosum*. Gli asterischi indicano una differenza significativa a $p < 0,05$, rispetto al controllo (veicolo)
- Fig. 17 a) peso corporeo dei ratti con SD (dieta standard), HFD (dieta alto contenuto grassi), o HFD+Lc (20 mg), or HFD+Lc (60 mg) (dieta ad alto contenuto di grassi + estratti a due dosi) alla fine del trattamento. n=5 per ogni gruppo, differenza è significativa per: *= $p < 0,05$, **= $p < 0,005$, ***= $p < 0,001$ b) circonferenza vita dei ratti con SD, HFD, o HFD+Lc (20 mg), or HFD+Lc (60 mg) alla fine del trattamento. n=5 per ogni gruppo, differenza è significativa per: * *= $p < 0,05$, **= $p < 0,005$
- Fig. 18 a) addominale, b) perirenale, c) epididimale, d) retroperirenale in ratti con SD, HFD o HFD+Lc (20 mg) or HFD+Lc (60 mg) per 12 settimane. n= 5 per ogni gruppo, la differenza è significativa: *= $p < 0,05$, **= $p < 0,005$, ***= $p < 0,001$
- Fig. 19 a) Peso cuore b) peso fegato c) Cardiac Somatic Index (CSI) in ratti con SD, HFD o HFD+Lc (20 mg) o HFD+Lc (60 mg) per 12 settimane, la differenza è significativa: *= $p < 0,05$, **= $p < 0,005$, ***= $p < 0,001$
- Fig. 20 Determinazione plasmatica di: a) colesterolo totale, b) colesterolo HDL c) Colesterolo LDL, d) colesterolo LDL -ox e) trigliceridi, f) ROS in ratti con SD, HFD o HFD+Lc (20 mg) o HFD+Lc (60 mg) per 12 settimane, la differenza è significativa: *= $p < 0,05$, **= $p < 0,005$, ***= $p < 0,001$
- Fig. 21 Caratteristiche istologiche di base di grasso addominale di ratto alimentato con SD o HFD, o HFD + Lc (20 mg), o HFD + Lc (60 mg) colorato con ematosilina-eosina. Nel grafico sono state mostrate le differenze statisticamente significative tra le diete, (n= 5 per ogni gruppo)

- Fig. 22 a) Illustrazione di steatosi nel fegato di ratti alimentati con SD o HFD, o HFD + Lc (20 mg) o HFD + Lc (60 mg) (n = 3 per ciascun gruppo). b) Determinazione epatica dei trigliceridi nei ratti alimentati con gruppi SD, o HFD o HFD + Lc (20 mg) o HFD + Lc (60 mg); differenza significativa: * = p < 0,05, ** = p < 0,005, *** = p < 0,001.
- Fig. 23 Western Blots e analisi densitometrica relativa espressa per rapporto di PEPCK / p-actina e G6Pase-691 α / p-actina su estratti epatici di SD, o HFD, o HFD + Lc (20 mg), o HFD + Lc (60 mg). Le modifiche sono state valutate come media \pm SE (n = 3). Differenza significativa dai valori di controllo (ANOVA unidirezionale, test Newman-Keuls): * = p < 0,05
- Fig. 24 Risposta curva dose – dipendente di estratto di bulbi di *M. comosum* (10^{-12} M – 10^{-6} M) (Lamp) su LVP, HR, (LVdP/dT) max, (LVdP/dT) min, e CP, su cuore di ratto perfuso. Le variazioni percentuali sono state valutate come medie \pm SEM di 6 esperimenti. La differenza è significativa (ANOVA) *p < 0,05
- Fig. 25 Effetti dell'ISO prima e dopo il trattamento con Lamp (10^{-6} M) su LVP (pressione ventricolare sinistra) e HR (Frequenza cardiaca) sul cuore isolato e perfuso di ratto con metodo Langendorff. Le variazioni percentuali sono state valutate come medie \pm SEM di 5 esperimenti per ciascun gruppo. La differenza è significativa per dai valori di controllo; * = p < 0,05
- Fig. 26 Peso corporeo e BMI dei ratti alimentati con SD, o HFD o HFD + *Citrus* alla fine del trattamento. n = 5 per ogni gruppo; differenza significativa: * = p < 0,05, ** = p < 0,005, *** = p < 0,001
- Fig. 27 Circonferenza vita di ratti alimentati con SD, o HFD o HFD + *Citrus* alla fine del trattamento. n = 5 per ogni gruppo; differenza significativa: * = p < 0,05, ** = p < 0,005
- Fig. 28 a) Grasso addominale in ratti alimentati con SD, HDF, HDF + *Citrus* (20mg). b) Grasso perirenale in ratti alimentati con SD, HDF, HDF + *Citrus* (20mg). c) Grasso retroperirenale ratti alimentati con SD, HDF, HDF + *Citrus* (20mg). d) Grasso epididimale in ratti alimentati con SD, HDF, HDF + *Citrus* (20mg). La differenza è significativa per * = p < 0,05, ** = p < 0,005, *** = p < 0,001
- Fig. 29 a) Peso cuore di ratti alimentati con SD, HDF, HDF + *Citrus* (20mg); b) Peso fegato di ratti alimentati con SD, HDF, HDF + *Citrus* (20mg); c) Cardiac Homa Index ratti alimentati con alimentati con SD, HDF, HDF + *Citrus* (20mg). La differenza significativa: * = p < 0,05, ** = p < 0,005, *** = p < 0,001
- Fig. 30 a) Homa Index ratti alimentati con SD, HDF, HDF + *Citrus* (20mg); b) Livelli di Insulina plasmatica alla fine del trattamento in ratti alimentati con SD, HDF, HDF + *Citrus* (20mg). c) Glicemia plasmatica alla fine del trattamento in ratti alimentati con SD, HDF, HDF + *Citrus* (20mg). La differenza è significativa per * = p < 0,05; ** = p < 0,005; *** = p < 0,001
- Fig. 31 a) Colesterolo totale plasmatico alla fine del trattamento in ratti alimentati con SD, HDF, HDF + *Citrus* (20mg); b) Colesterolo HDL plasmatico alla fine del trattamento in ratti alimentati con SD, HDF, HDF + *Citrus* (20mg). c) Colesterolo LDL plasmatico alla fine del trattamento in ratti alimentati con SD, HDF, HDF + *Citrus* (20mg). d) Colesterolo LDL - ox plasmatico alla fine del trattamento in ratti alimentati con SD, HDF, HDF + *Citrus* (20mg). La differenza è significativa per * = p < 0,05; ** = p < 0,005; *** = p < 0,001.
- Fig. 32 Pruduzione ROS alla fine del trattamento in ratti alimentati con SD, HDF, HDF + *Citrus* (20mg). La differenza è significativa per * = p < 0,05; ** = p < 0,005; *** = p < 0,001

Introduzione

Sempre più studi dimostrano che esiste una stretta relazione tra stress ossidativo e aumentato rischio di insorgenza di patologie cronico degenerative.

L'ampia letteratura ha permesso di chiarire i molteplici meccanismi di azione genetici e molecolari alla base delle più comuni malattie metaboliche. Nello specifico, è l'obesità una delle principali cause di morbilità e mortalità, l'evidenza scientifica crescente ci consente di comprendere, finalmente, il ruolo fondamentale del tessuto adiposo nel controllo dei meccanismi fisiopatologici legati all'aumento di peso e alle relative comorbidità.

Da qualche anno, è proprio sul tessuto adiposo, specialmente quello localizzato a livello del compartimento viscerale, che si sono concentrati molti studi ritenendolo non più come un mero tessuto di deposito energetico, ma un interessante organo endocrino attivo che rilascia svariate molecole biologicamente attive note come adipochine. Sulla base della complessa interazione tra queste molecole, l'obesità viene contraddistinta da un'inflammatione cronica di basso grado con stress ossidativo permanente. Da qui, è facile intuire come, la sovraespressione dello stress ossidativo sia in grado di danneggiare le strutture cellulari e influire sulla produzione e attività dei meccanismi antiossidanti endogeni, portando allo sviluppo di complicanze come cancro, diabete mellito di tipo 2 e disordini cardiovascolari (aterosclerosi, cardiopatie ischemiche, ipertensione).

Evidenze scientifiche sostengono che lo stato infiammatorio cronico sia responsabile dell'induzione di specie reattive dell'ossigeno e dell'ossido nitrico sintasi con rilascio di alti livelli di ossido nitrico e specie reattive dell'azoto, che sembrano essere alla base di modificazioni post-traduzionali nelle proteine di segnalazione. Una difettosa trasduzione del segnale a carico delle proteine di segnalazione dell'insulina porta ad una alterata omeostasi del glucosio da cui origina una diminuzione dell'assorbimento di questo da parte del muscolo, con conseguente alterazione della lipogenesi e della neoglucogenesi da cui origina l'iperglicemia.

Obesità viscerale e iperglicemia, associate a dislipidemie, ipertensione e fattori di rischio trombotico, rappresentano la base fisiopatologica della Sindrome metabolica (MetS) per la quale la letteratura ha espresso ampiamente i diversi criteri diagnostici.

Per la gestione dell'obesità, si ricorre al trattamento farmacologico quando quello dietetico non ha apportato sufficienti risultati necessari a ridurre i rischi obesità – associati. L'orlistat, rappresenta oggi, l'unico prodotto farmacologico approvato e disponibile per la terapia all'obesità. Tale farmaco contribuisce ad una perdita di peso per il 5-10% in seguito a riduzione dell'assorbimento di acidi grassi (fino al 30%) e ad un miglioramento del profilo lipidico, per inibizione delle lipasi pancreatiche. Ciò nonostante è riconosciuto possedere effetti avversi, quali steatorrea, gonfiore, urgenza e incontinenza fecale e per tale ragione, la terapia non è accettata di buon grado dai pazienti obesi in virtù del fatto che l'incontinenza fecale rappresenti un fattore di stress psicologico rilevante e induca il paziente obeso più facilmente al trattamento bariatrico.

Stessi effetti collaterali (flatulenza, diarrea e crampi addominali) sono stati segnalati per l'acarbiosio, uno dei farmaci di prima linea utilizzati per la gestione del diabete mellito di tipo 2 o per intolleranza glucidica. Tale farmaco ritarda l'assorbimento dei carboidrati inibendo gli enzimi α -glicosidasi e α -amilasi sulla superficie delle cellule epiteliali intestinali per ridurre efficacemente l'iperglicemia post-prandiale.

Gli effetti collaterali delle terapie farmacologiche citate spingono, il paziente sempre più attento e informato, alle terapie alternative, e all'utilizzo di prodotti dimagranti, antidislipidemici

e antiperglicemici di origine vegetale. Poiché sempre più attenzione è riservata da parte della comunità scientifica allo studio delle attività biologiche di piante spontanee e coltivate, moltissimi ad oggi, sono metaboliti secondari dal potenziale impiego medico-farmaceutico ed erboristico potenzialmente utilizzabili per la prevenzione e gestione di patologie metaboliche. Da qui è prevedibile intuire che il futuro della medicina e della terapia sarà sempre più spostato verso l'impiego dei fitoterapici.

In questo ampio scenario che la ricerca nell'ambito della fitochimica e metabolomica offre, obiettivo principale del seguente progetto è stato quello di realizzare un mix funzionale che avesse le potenzialità per affrontare contemporaneamente stress ossidativo e principali fattori di rischio della MetS sfruttando l'attività biologica dei principi attivi determinati nei singoli estratti e le sinergie tra i componenti di estratti diversi.

I risultati di questo progetto, che tiene conto di moltissime variabili (cultivar, specie, condizioni climatiche e pedologiche), consente di ottenere risultati immediatamente spendibili in ambito salutistico e per questo configurabile come trasferimento tecnologico della ricerca avanzata all'applicazione nutraceutica secondo la filosofia *benchside, bedside and community* della medicina traslazionale.

Per raggiungere tale scopo, il nostro studio ha mirato alla determinazione quali-quantitativa dei markers fitochimici estratti da specie vegetali appartenenti alle *Hyacinthaceae*, *Cucurbitaceae* e *Rutaceae*.

Le specie sono state selezionate sulla base di una importante ricerca bibliografica inerente la flora spontanea o coltivata calabrese i cui dati di letteratura dimostravano comprovata attività biologica verso i fattori di rischio implicati nella MetS.

All'interno delle famiglie citate sopra sono state scelte specie e/o varietà e/o cultivar su cui il lavoro compiuto ha inteso colmare evidenti vuoti di letteratura riguardo sia la composizione fitochimica del fitocomplesso, sia le specifiche attività biologiche ascrivibili ai componenti dell'estratto. Per cui, abbiamo selezionato come specie oggetto di studio *M. comosum* Mill. (*Hyacinthaceae*), *Citrus* L. (*Rutaceae*) e *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai (*Cucurbitaceae*), per le quali abbiamo valutato habitat vegetativi specifici ed eventuali condizioni di coltivazione al fine di selezionare popolazioni che garantissero la maggiore presenza quali e quantitativa dei principi attivi a cui ascrivere l'attività biologica cercata.

Capitolo 1

Sistematica, tassonomia e proprietà biologiche

1.1 Storia tassonomica *M. comosum*.

M. comosum (L.) Miller (Gard. Dict. Ed. 8:2, 1768) è una pianta erbacea perenne, conosciuta anche come *Leopoldia comosa* (L.) Parl., il cui nome è stato accettato da Komarov (1935), Hansen & Sunding (1985); Cezerepanov (1995), Danin (2004) e Boulos, (2005); è conosciuto anche come *Hyacinthus comosum* L., Sp. PI. 318 (1768), *Eubotrys comosa* (L.) Raf., Autik. Bot. 124, 1840, e *Bellavalia comosa* (L.) Kunth, Enum. PI. 4:306, 1843

M. comosum è una tipica geofita decidua bulbosa appartenente alla flora spontanea e alimurgica del Sud Italia e di molte aree geografiche afferenti al Bacino del Mediterraneo (Pieroni et al, 2002; Borgonovo et al, 2008; Renna et al, 2015).

L'utilizzo dei due sinonimi, *Leopoldia comosa* (L.) Parl. e *M. comosum* (L.) Mill., nasce da una controversa delimitazione tassonomica, presente già ai tempi di Linnaeus a causa dell'assenza di caratteri discriminanti affidabili (Dimopoulos et al, 2013; Sayantani et al, 2014; Jafari, 2015).

Attualmente, tra le diverse classificazioni, quella più ampiamente accettata secondo la lista di controllo di *Kew World* (Govaerts, 2016) divide il genere *Muscari sensu lato* (s.l.) in tre generi: *Muscari sensu strictu* (s.s.), *Leopoldia* e *Pseudomuscari* Garbari & Greuter, anche se la base per questa classificazione non è ancora chiara, giacché si conoscesse un altro raggruppamento tradizionalmente riconosciuto, che vedeva il genere *Muscari* suddiviso in quattro ulteriori generi: *Muscari* Mill. (s.s.), *Leopoldia* Parl., *Muscarimia* Kostel ex Los. e *Pseudomuscari* Garbari & Greuter (Garbari & Greuter, 1970; Davis and Stuart 1980; Speta 1998; Jafari and Maassoumi 2011).

Pseudomuscari, tra l'altro, è stato descritto e ulteriormente investigato e riconosciuto come un nuovo genere in base a prove cariologiche (Demirci and Özhatay, 2017) che sorpassano le precedenti affermazioni che si basavano soprattutto su caratteristiche di tipo morfologico; anche per il sottogenere *Leopoldia* (diploidi, sebbene siano stati citati pochi citotipi triploidi e tetraploidi) (Ruiz Rejón et al, 1985), studi ne hanno individuato nuove specie: in Iran, *Leopoldia ghouschtchiensis* Jafari & Maassoumi, 2011, *Leopoldia tabriziana* Jafari, 2012 e *Leopoldia tijtjensis* Jafari, 2012 (Jafari e Maassoumi 2011, Jafari 2012a, 2012b) e in Turchia (identificata come nuova specie endemica) a cui è stato attribuito il nome di *Muscari erdalii* N. Özhatay e S. Demirci, 2013 (Demirci et al., 2013).

Per quanto riguarda il *Muscari*, Garbari & Greuter (1970), oltre a riconoscere il genere *Muscari* s.s., avevano sollevato *M. subg. Leopoldia* (Parl.) Peterm. e *M. subg. Muscarimia* Kostel. ex Los. al rango generico e descritto *Pseudomuscari* come un nuovo genere, sebbene questa suddivisione includesse solo una manciata di specie. Inoltre, per separare la *Leopoldia* dagli altri generi (Garbari & Greuter 1970) sono stati utilizzati caratteri morfologici come i prominenti fiori sterili bluastri e violacei e i fiori fertili più o meno zigomorfi posizionati appena sotto la parte apicale (destinata al ciuffo sterile) (Böhnert and Lobin, 2017).

In disaccordo con queste affermazioni, Speta (Speta, 1982; Speta, 1989; Speta, 1998) e altri autori (Davis and Stuart, 1980; Davis and Stuart, 1984) sostenevano che fosse più utile trattare il genere *Muscari* come un singolo genere (*Muscari* s.l.), accettando al suo interno, quattro

sottogeneri: *M. subg. Muscari*, *M. subg. Leopoldia*, *M. subg. Moscharia* (Baker) Chouard (*M. subg. Muscarimia*) e *M. subg. Pseudomuscari* (Losinsk.) D. C. Stuart.

Speta (1982, 1989) sosteneva fortemente il concetto di “un genere”, considerando la varietà di caratteristiche morfologiche condivise tra le specie, come ad esempio il grado di fusione dei tepali, la disposizione alternata delle antere, una placentazione uniforme, nonché il verificarsi di fiori sterili.

Nello stesso periodo, Karlén (Karlén, 1984) presentava uno studio totalmente in contrapposizione con quanto riferito da Garbari & Greuter (1970), sostenendo l’esistenza di risultati conflittuali nel suo lavoro sui cariotipi di diverse specie di *Muscari* dalla Grecia, e rafforzando le affermazioni di Speta (1989) e sul suo concetto di genere.

A livello superiore il genere *Muscari* Mill. è stato per diverse decine di anni, classificato secondo il sistema di Cronquist (*An Integrated System of Classification of Flowering Plants* (1981) e *The Evolution and Classification of Flowering Plants* (1968, 2e: 1988) usato per raggruppare le Angiosperme, come appartenente alla famiglia delle *Liliaceae* (tab. 1).

tab. 1 Classificazione Cronquist e APGIII

Bulbi	Cronquist	AGPIII
Ordine	<i>Liliales</i>	<i>Asparagales</i>
Famiglia	<i>Liliaceae</i>	<i>Asparagaceae</i>
Sottofamiglia	<i>Muscari</i>	<i>Scilloideae</i>
Tribù	-	<i>Hyacintheae</i>
Genus	-	<i>Leopoldia</i>
Species	<i>M. comosum</i>	<i>L. comosa</i>

Nello specifico, dagli studi citotassonomici condotti da Garbari (1966), *M. comosum* fu indicato come *Leopoldia comosum* Parl., e il nome del genere *Leopoldia*, fu dedicato al granduca di Toscana Leopoldo II (1797-1870), protettore delle Scienze e fondatore dell’*Herbarium Centrale Italicum*.

Nel 2005, Conti et al (2005), proposero l’utilizzo della nomenclatura *M. comosum* come la più corretta, che successivamente, dal 2009, secondo il sistema APG III - *The Angiosperm Phylogeny Group, An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II*, in *Botanical Journal of the Linnean Society* 2003; 141: 399–436, viene ufficialmente inserito nella famiglia delle *Asparagaceae* e, in cui, *M. comosum* (L.) Mill. entra a far parte del subgenere *Leopoldia* Parl.

Secondo la nuova classificazione, nelle *Asparagaceae* sono state incluse le *Scilloideae*, che, come la maggior parte delle piante monocotiledoni, erano collocate nell’ampissima famiglia delle *Liliaceae* e oggi, trattata come una famiglia separata e con il nome di *Hyacinthaceae*. Chiaramente, si evince come la determinazione dei confini tra i diversi generi delle *Scilloideae* sia un’area di ricerca tuttora da indagare.

Secondo Govaerts (2016), quattordici sono le specie di *Leopoldia* accettate, anche se almeno altre sette attualmente trattate in *Muscari* dovrebbero essere considerate appartenenti a *Leopoldia* (Böhnert unpubl.) (Böhnert and Lobin, 2017).

Fino alla presentazione di una revisione tassonomica e sistematica completa (lavoro in corso), si applica la classificazione per le *Asparagaceae* secondo Govaerts (2016) e il nome *Leopoldia comosa* Parl., secondo il *WCSP (2011), World Checklist of Selected Plant Families, The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew, retrieved 2011-11-14*. Considerata, data l'innunerevole letteratura dedicata al *M. comosum*, in questo lavoro si è deciso di utilizzare il termine *Muscari* a quello di *Leopoldia* Parl., fermo restando le nuove indicazioni indicate dai sistemi di classificazione più recenti.

Le *Hyacinthaceae* appartengono alla famiglia della *Asparagaceae* e vengono alternativamente trattate come sottofamiglia delle *Scilloideae* Burnett 1835 (Burnett, 1835; Jafari, 2012) e presentano, approssimativamente, 900 specie e circa 70 generi (Speta, 1998; Martinez-Azor et al, 2011, Ali Syed et al, 2012).

La valutazione chemotassonomica, basata su diversi studi filogenetici molecolari (Pfosser and Speta, 1999; Chase et al, 2009) ha ulteriormente portato a suddividere le *Hyacinthaceae*, in virtù delle diverse caratteristiche morfologiche e molecolari, ad essere ulteriormente suddivise in quattro tribù: *Hyacintheae*, *Ornithogaleae*, *Oziroeeae* e *Urgineae* (Speta, 1998; Pfosser and Speta, 1999; Chase et al, 2009). Ciononostante, una delimitazione soddisfacente dei generi all'interno di questo gruppo rimane ancora dubbia (Pfosser and Speta, 1999; Stedje 2003; Manning et al, 2003; Chase et al, 2009;) e solo lo studio del genoma (DNA *c-value*, ad esempio) che rimane un carattere chiave nella biologia e nella biodiversità, sicuramente, nel prossimo futuro, date anche le innumerevoli ricerche avviate, riuscirà a fornire spiegazioni più precise sull'appartenenza del genere *Leopoldia*.

Lo studio del *c-value* (Bennett and Leitch, 2005), ovvero la quantità di DNA nel nucleo gametico non replicato (Swift, 1950) all'interno di uno studio filogenetico e i relativi dati inerenti la dimensione del genoma in combinazione con altri caratteri, può contribuire alla classificazione intergenerica, alla delimitazione dei taxa o all'identificazione ibrida di specie vegetali (Zonneveld, 2001; Bures et al, 2004; Morgan-Richards et al, 2004) per le quali si necessitano ancora chiarimenti e completamenti. Per quanto riguarda la dimensione del genoma (*genome size*), diversi studi hanno indicato che esso può evolversi in modo neutrale, con aumenti e diminuzioni principalmente attribuiti ad errori in porzioni geniche per processi di inserzione e delezione o di ricombinazione (Oliver et al, 2007; Nam and Ellegren, 2012; Ågren et al, 2015) e che, l'evoluzione della dimensione del genoma può essere modellata come un tratto su un albero filogenetico, che consente di verificare la correlazione tra i tassi di diversificazione e l'evoluzione della dimensione del genoma (Soltis et al, 2003; Burleigh et al, 2012). Questa, tra l'altro, che si correla a tratti fenotipici ecologicamente o citologicamente rilevanti, tra cui latitudine, altitudine, temperatura, condizioni metereologiche e pedologiche, dimensione del cromosoma, tempo di fioritura, dimensione del fiore, dimensione delle foglie e tassi fotosintetici (Beaulieu et al, 2007; Beaulieu et al, 2008; Weng et al, 2012; Díez et al, 2013; Kang et al, 2014; Jordan et al, 2015) può essere considerato come un parametro importante per aiutare la delimitazione intergenerica e intragenerica della famiglia *Hyacinthaceae*. Nello specifico, per i bulbi delle *Hyacinthaceae* che sono caratterizzati, nelle loro cellule, dalla presenza di una vasta mucillagine che interferisce in gran parte con l'isolamento del nucleo (Sayantani et al, 2014) questo tipo di indagine può risultare particolarmente complesso.

Le mucillagini, infatti, che sono di natura polisaccaridica (ramnogalatturonano e arabinogalattano) e costituiti principalmente da acido glucuronico, acido galatturonico, ramnosio, arabinosio e galattosio in proporzioni variabili insieme ad alcune proteine e minerali (Ovodov, 1998), conferiscono una consistenza viscosa responsabile dell'aggregazione dei nuclei rendendo, così, i campioni inadatti per l'analisi e soprattutto per quelle più all'avanguardia, come quella citometrica a flusso (Sayantani et al, 2014). La viscosità che caratterizza le mucillagini, dovuta a *cross-link* tra le catene polimeriche intricate e alla contemporanea interazione con le proteine, può essere modulata/modificata, secondo alcuni studi, attraverso l'azione di specifici tamponi (Galbraith ad esempio) in grado di ridurre la viscosità dei polisaccaridi che, chiaramente, rappresentano il principale ostacolo nella preparazione del campione (Sayantani et al, 2014). Woolfe et al (1977), hanno dimostrato che, la presenza di un tampone a base di cationi bivalenti, come Mg^{2+} e Ca^{2+} , è in grado di diminuire la viscosità delle mucillagini di Okra e Baobab perché in grado di interagire con le catene polimeriche adiacenti e di evitare la reticolazione responsabile dell'alta viscosità (Wing 1996; Gaffar, 2002). Tali studi e metodiche potrebbero essere applicati per studiare ulteriormente i bulbi di *Hyacinthaceae* al fine di chiarire l'appartenenza delle varie specie e, nello specifico, approfondire gli studi su bulbi di *M. comosum*.

1.1.1 Le specie del genere *Muscari*

Il nome del genere *Muscari* deriva dalla parola araba *muscarimi*, che a sua volta deriva dal greco $\mu\acute{o}\sigma\chi\omicron\varsigma$, *moschos*= muschio, facendo riferimento alla fragranza emessa da alcune specie (Candido et al, EUROGARD VI) o dal greco moderno *moschàri* = giacinto a grappolo mentre, la parola *comosum* si riferisce, invece, al ciuffo apicale di fiori sterili.

Il genere *Muscari* Mill. (*Hyacinthaceae*) è nativo dell'area Mediterranea e negli ultimi decenni ne sono state descritte diverse specie in tutto il mondo, nello specifico in Iran e Turchia (Ruiz Rejón et al, 1985; Eker and Koyuncu, 2008; Jafari and Maassoumi, 2011; Jafari, 2012; Jafari, 2015; Yildirim, 2016) anche perché il *Muscari* e generi affini sono conosciuti come piante ornamentali da giardino (Miadokova et al, 2002). Il centro della biodiversità sembra essere situato in Turchia in cui sono state riconosciute trentasei specie documentate di *Muscari* s.l. (Eker and Koyuncu, 2008; Doğu and Bağcı, 2009; Yildirim, 2016) e ulteriori specie di *Muscari* s.s., mentre sei *Leopoldia* Parl. sono state riconosciute in Grecia (Dimopoulos et al, 2013; Böhnert and Lobin, 2013).

Le prime significative esplorazioni floristiche della Calabria risalgono agli inizi del XIX secolo ad opera di diversi botanici di alto spessore scientifico, tra cui, Tenore (1811-1838) e Gussone (1826) anche se un determinante contributo sulla conoscenza floristica è stata poi data da Terracciano (1891, 1900) che ha studiato le specie dell'area nord Calabria e da Macchiati (1884) che ne ha studiato quelli dell'area Sud (provincia di Reggio Calabria). Secondo quanto si evince da un lavoro di Bernardo et al. (2011) diverse sono le specie di *Muscari* segnalate in Calabria (di seguito, elenco), i cui campioni sono depositati nell'Orto botanico dell'Università della Calabria (CLU) e in quello del Museo Civico di Storia Naturale di Verona (VER).

Muscari Mill. Gard. Dicc. Abridg., ed. 4 (1754) Asparagaceae. F. Garbari catalogate da Bernardo et al, 2011:

M. comosum (L.) Mill. Gard. Dict., ed.8:2 (1768); *Bellevalia comosa* (L.) Kunth; *M. comosum* L. var. *horizontale* N. Terracc.; *M. comosum* (L.) var. *castrovillarese* N. Terracc.; Pollino [CLU, VER] Alto Tirreno [CLU] Montea-Caramolo, Valle Crati [CLU], Catena costiera

[CLU] Medio Tirreno [CLU] Sila [CLU, VER] Marchesato [CLU] Valle Corace [CLU] Serre Calabre [CLU] Basso Ionio [CLU] Aspromonte, Reggino, Calabria.

Muscari botryoides (L.) Mill. Gard. Dier., ed. 8:1 (1768) subsp. *Botryoides*. Pollino [CLU], Montea-Caramolo, Valle Crati, Sila, Marchesato.

Muscari commutatum Guss. PI. Rar.: 145 (1826); *Hyacinthus commutatus* (Guss.) Ten., Pollino [VER] Alto Tirreno, Montea-Caramolo [PI] Valle Crati, Sila [PI] Marchesato Basso Ionio [CLU] Aspromonte [CLU] Reggino [CLU].

Muscari atlanticum Boiss. et Reuter subsp. *Alpinum* (Fiori) Garbari; *Muscari atlanticum*; *Muscari racemosum* (L.) Mill.; *Muscari atlanticum* Boiss. & Reut. 2n=36, Pollino [CLU] Alto Ionio [CLU] Alto Ionio [CLU] Alto Tirreno [CLU] Montea-Caramolo [CLU] Valle Crati [CLU] Marchesato [CLU] Valle Corace Aspromonte, Reggino.

Muscari parviflorum Desf. Fl. Atlant. 1:309(1798) Montea-Caramolo, Sila, Valle Corace. L'attuale distribuzione di questa specie in Calabria deve essere ancora chiarita.

Muscari gussonei (Parl.) Tod. Ind. Sem. Horti Panorm.:58(1872).

Muscari maritimum Desf. Var. *gussonei* (Parl.) Fiori, Reggino. Specie endemica della Sicilia meridionale, quasi certamente segnalata per errore.

Altre specie di *Muscari* ampiamente riconosciute in letteratura sono:

Muscari neglectum Guss. Fl. Sic. Syn. 1:441 (1842) (Mahboubi and Taghizadeh, 2016), una specie che cresce benissimo in terreni a pH molto vicino al neutro, sabbiosi e ben drenati.

Muscari racemosum e *Muscari armeniacum* (Mulholland et al, 2013), i cui bulbi contengono *homioisoflavonoids* quali 3-benzilidene-4-cromanone (Masterova et al, 1991) ampiamente studiati per il loro effetto di perossidazione lipidica *in vitro*, forte attività antiossidante (IC₅₀ = 0,94 -7,98 mM) e azione antimutagena/anticarcinogenica.

Muscari Racemosum Mill. sinonimo *Muscari moschatum* Willd (volg. Bulbo vomitorio), *Muscari Heldreichii* Boiss. della Grecia.

Muscari Szovitsianum baker della Persia e del Caucaso,

Muscari vuralii Y. Bağcı & Doğu (2009).

Muscari botryoides Mill. (vol. Muschino selvatico, Pentolino).

1.1.2 *M. comosum* (L.) Mill. dalla botanica all'etnobotanica

M. comosum viene identificato con differenti nomi nelle varie regioni d'Italia: lampagione, lampascione, lambascione, civuddine, cipollaccio, muscaro, muscarino, vampasciuolo, cipollaccio col fiocco, giacinto dal pennacchio, giacinto delle vigne, cipolla canina, cipolla selvatica, cipolla di serpe, porrettaccio, cipollone, cipudduzzu o cipuddazzu zizzeruto, alideddu, cibudda de colorus, lampajoni (Morricone e Pedicino, 1986) ed è ampiamente utilizzato nella cucina tradizionale del Sud Italia (Pieroni et al, 2002; Borgonovo et al, 2008, Renna et al, 2015).

Secondo il glottologo Vincenzo Valente (Luigi Sada, 1991), il termine più corretto è lambascione, dal latino medioevale *lampadionis*. L'etimo è tradotto dal greco e si ritrova in un trattato popolare (Prontuario) scritto da Oribàsio¹, medico e botanico bizantino (Pergamo, 325 -

¹ Oribàsio (-/-) (gr. Ὀρειβάσιος e Ὀριβάσιος). - Medico greco (Pergamo 325 - Bisanzio403) dell'imperatore Giuliano. La sua opera principale (Συναγωγὰ ἰατρικὰ, *Collectiones medicae*) è una buona compilazione degli antichi medici greci; constava di 70 libri, di cui ci è giunta solo una parte; l'autore stesso ne fece anche un riassunto in 9 libri (Σύνοψις) e compose per i profani un trattato in 4 libri (Εὐπόριστα πρὸς Εὐνάπιον) su igiene, dietetica e terapia. Tali opere sono giunte a noi con la traduzione latina del sec. 5° o 6°. - Enciclopedia Treccani

Bisanzio, 403), che esercitò la medicina ad Atene; la traduzione latina dice: "*lampadiones nutriveles sunt ... bulbis lampagionis inflactiones faciunt...*". Inoltre, secondo Imperio (1990), dal basso latino *lampadionem*, si è giunti a lambascione.

La specie cresce dal livello del mare fino ad un'altitudine di 2000 m, è una pianta diffusa, caratterizzata dal corotipo Eurimediterraneo, ma la sua superficie di distribuzione si estende dall'Europa centrale sud-occidentale e dall'Africa settentrionale fino alla Russia meridionale e ad est verso l'Iran e l'Arabia (Tutin et al, 1964-1980; Candido et al, 2017).

La porzione edule della pianta è costituita dal bulbo, anche se, da informazioni che pervengono dagli abitanti locali, e dopo diverse interviste ad agricoltori ed anziani, e nel rispetto delle conoscenze etnobotaniche, nelle aree nord della Calabria, in cui vivono diverse comunità Arbëreshë (IPA: [ar'børɛʃ], arbëreshët e Italisë in albanese) e limitrofi, vengono consumati anche i gambi e le foglie.

Secondo quanto emerge da riferimenti botanici (Candido, Relazione misura PSR 2.1.4 30.11.2014), il bulbo, la cui forma varia da sferica a subsferica (Fig. 1a), ovata a piriforme presenta tuniche esterne (catafilli) di colore rosso mattone che diventano più chiare man mano ci si spinge negli stati più interni. Il diametro è, in genere, di 2-4 cm e il bulbo può arrivare a pesare fino a 40-42g. I catafilli sono monofilli metamorfosati, cioè, sono carnosi in seguito all'accumulo di sostanze di riserva nel loro parenchima: sostanze che verranno utilizzate dal germoglio per svilupparsi, fino a quando i monofilli non saranno in grado di fotosintetizzare. I catafilli circondano il germoglio e sono a larga inserzione sul disco; risultano molto compatti in modo da proteggere la parte centrale del bulbo, e sono coperti da tuniche protettive esterne. Tra i catafilli è presente una abbondante formazione mucillagginosa. I bulbi occupano lo spazio di cui necessitano attraverso la pressione che le cellule turgescenti delle tuniche, in via di sviluppo esercitano contro il terreno. In questo modo il terreno aderisce alle tuniche esterne, formando una vera e propria camera di protezione per il bulbo, che permette ad esso di non cedere acqua nei periodi di siccità, e quindi di sopravvivere nel terreno. La parte basale contiene un asse molto corto, il disco o girello o 'leco', che dà origine alle foglie e allo scapo fiorale; inferiormente, il girello è provvisto di radici fascicolate carnose lunghe circa 7-8 cm.

Le foglie che nascono dal bulbo, sono lineari e carnose, lunghe 20-60 cm e larghe 1-1,5cm, eretto-patenti, tendenti all'afflosciamento, di forma cilindrica scanalate nella parte inferiore, tendono a restringersi superiormente fino a raggiungere una forma appuntita.

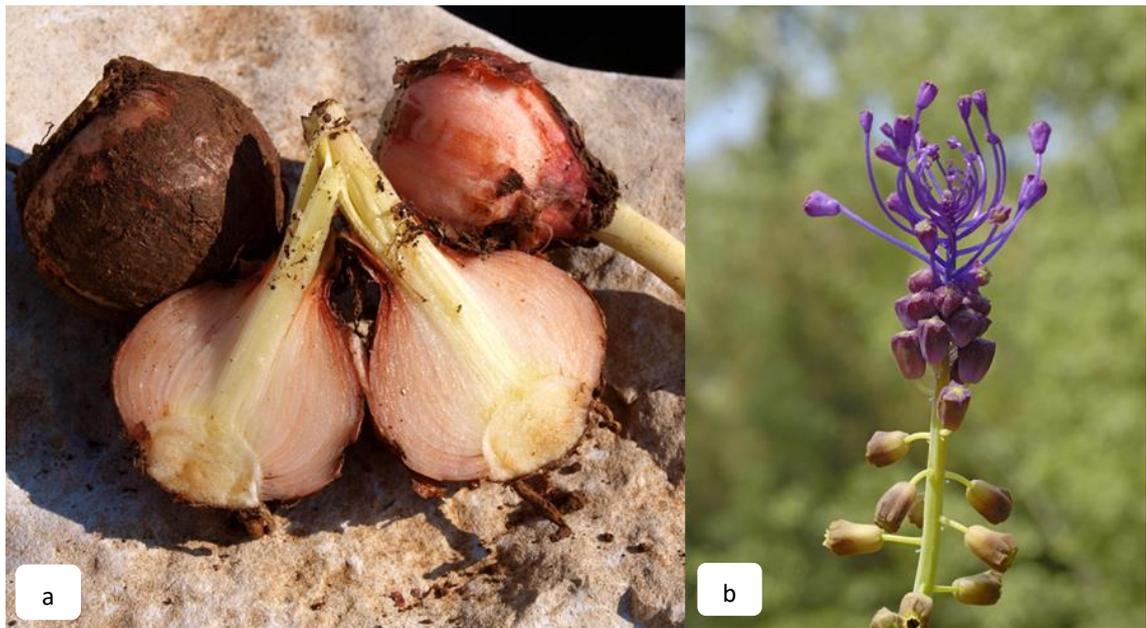


Fig. 1 a) bulbi; 1 b) fiori M. comosum

I fiori sono inodori, raggruppati in un racemo terminale (Fig. 1b) generalmente lungo 20 cm con fiori fertili inferiormente e sterili (il fiocco) all'apice. I fiori fertili sono globo-urceolati di colore azzurro e iniziano a metà altezza dello scapo e sono inseriti all'ascella di piccole brattee, con peduncoli dapprima eretti, poi orizzontali e rivolti verso il basso alla fruttificazione, hanno il perigonio sintepalo, cilindrico-urceolato, azzurro-violaceo o giallo fosco, con 6 tepali e sei piccoli denti triangolari giallastri, sei stami con antere rossicce, stilo e stimma bianchi, ovario supero tricarpellare. I fiori sterili, più piccoli e di un bel colore azzurro-violaceo, densamente riuniti all'apice hanno i peduncoli più lunghi e rivolti verso l'alto; il ciuffo svolgerebbe una funzione di richiamo per gli impollinatori.

Notevole interesse, negli ultimi anni, è rivolto allo studio dell'etnobotanica, che mette insieme i concetti di botanica a quelli antropologici e culturali, tanto da spingerci a ricercare informazioni tra scritti e racconti sul consumo e gli usi medicamentosi di bulbi e parti della pianta.

Diverse informazioni sul *M. comosum* e sul relativo utilizzo, sono state raccolte dai testi storici che vanno da *De medicinali materia, II, CLXI* di Dioscoride Pedanio (medico greco del I secolo d. C.) a Publio Ovidio Nasone (I secolo a.C. – I secolo d.c.) *Remedia amoris, 795-800* a C. Plinio Secondo (I secolo c. C.) nel suo *Naturalis Historia XIX, 30*, afferma “sono apprezzati soprattutto quelli – riferendosi ai bulbi – nati in Africa, poi quelli dell'Apulia” XX, 105 sostenendo quanto Ovidio avesse già citato sui bulbi di Megara². Senza tralasciare che i bulbi sono stati persino citati tra gli editti nella sezione *de oleribus et pomis* dell'imperatore Diocleziano.

Ulteriori informazioni si hanno per *M. racemosum*, sia i germogli di fiori, che i bulbi e le foglie (Lim, 2014), i frutti (Tuzlaci and Erol, 1999; Ugurlu and Secmen O., 2008) sono

² Megara si riferisce al nome di una città in Grecia e di una in Sicilia, nonostante, sembri dai testi, che l'autore si riferisca a quella italiana.

ampiamente utilizzati nelle tradizioni culinarie, crudi, bolliti, grigliati o sott'olio, in diversi Paesi. La decozione dei frutti di *M. neglectum*, per esempio, viene utilizzata internamente per il trattamento di forme reumatiche in Turchia (Tuzlaci and Erol, 1999; Ugurlu and Secmen, 2008], mentre, le foglie hanno effetti effetti antinfiammatori, antiallergici e addirittura afrodisiaci (Usher, 1974). I fiori *M. neglectum* vengono utilizzati in forma grezzo come snack (Tardio et al, 2006).

Ai giorni nostri, ricercatori e appassionati hanno raccolto le storie degli abitanti delle aree rurali agricole e consultato pagine di ricettari che si sono tramandati da madre in figlia, a volte, anche ben raccolte e conservate come quelle presenti nel *Li Pampsciuni, Ricettario e notizie* a cura dell'A.S.S.A. e del Comune di Vernole nel Salento che rappresentano un grande patrimonio culturale culinario Regionale. Tuttavia, nessuna significativa informazione è stata reperita per la Regione Calabria, nonostante siano stati consultati alcuni testi rari e periodici conservati presso la Biblioteca di Santa Sofia d'Epiro che raccoglie più di 10 mila volumi sulle comunità albanofone, sui riti e sulle tradizioni di questo popolo che ha raccontato la storia della Calabria e delle innumerevoli tradizioni ad essa attribuite.

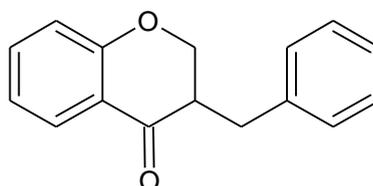
1.1.3 Componente fitochimica nel *M. comosum*

Un certo numero di composti fenolici (*homioisoflavonoids*) contenenti uno scheletro base di 3-benzilcroman-4-one sono stati isolati da vari generi della famiglia *Hyacinthaceae* (Sidwell and Tamm, 1970; Bangani et al., 1999). Gli *homioisoflavonoids* rappresentano solo una modifica dello scheletro del tipo flavonoide, infatti, la biosintesi dei 3-benzilcroman-4-one è una modifica del passaggio della struttura C6-C3-C6 dei calconi mediante l'inserimento di un atomo di carbonio supplementare (Dewick, 1975).

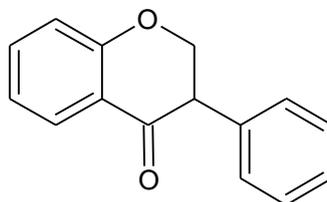
Tre piccoli gruppi di *homioisoflavonoids* sono generalmente distinti nella famiglia *Hyacinthaceae*: 3-benzil-4-cromanoni, 3-benzilidene-4-cromanoni e gli *homioisoflavone* scillascillinoidi.

I rappresentanti dei 3-benzilidene-4-cromanoni sono stati finora isolati dai bulbi del genere *Eucomis*, *Bellevalia*, *Chionodoxa* e *Muscari* (Tamm, 1972; Adinolfi et al., 1989; Masterova et al., 1991). Altri costituenti chimici delle piante del genere *Muscari* sono i polisaccaridi idrosolubili (Rakhimov et al., 1980), poli-idrossipirrolizidine e le hyacintacine (Asano et al., 2000), triterpeni di scheletro norlanostano con un anello di tetraidrofurano spirofuso e loro glicosidi (Adinolfi et al., 1984).

Gli *homioisoflavonoids*, quindi, sono un gruppo di composti fenolici (Namdar and Nafisi, 2013) costituiti da due anelli benzenici ed un anello eterociclico:

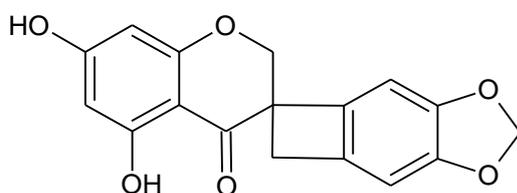


In questi composti, il carbonio 16 è un cromanone a cui è legato un gruppo benzildiene o benzilico in posizione 3 (Adinolfi et al, 1986) e differiscono dagli isoflavonoidi perché questi ultimi hanno un carbonio in meno (posizione 15-C).

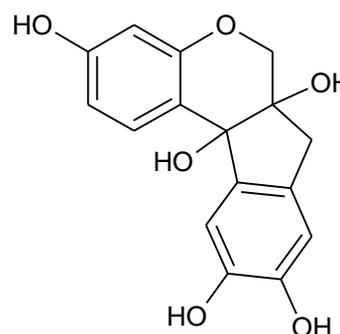


Gli *homoisoflavonoids* variano l'uno dall'altro dai modelli di sostituzione presenti negli anelli A e B. Sostituenti comuni sono gruppi idrossi, metossi o acetossi, ma talvolta possono verificarsi anche gruppi metilici o aldeidici.

Altri, *homoisoflavonoids* come brazillin, scillascillin e dracaenone contengono un quarto anello.



Scillascillina

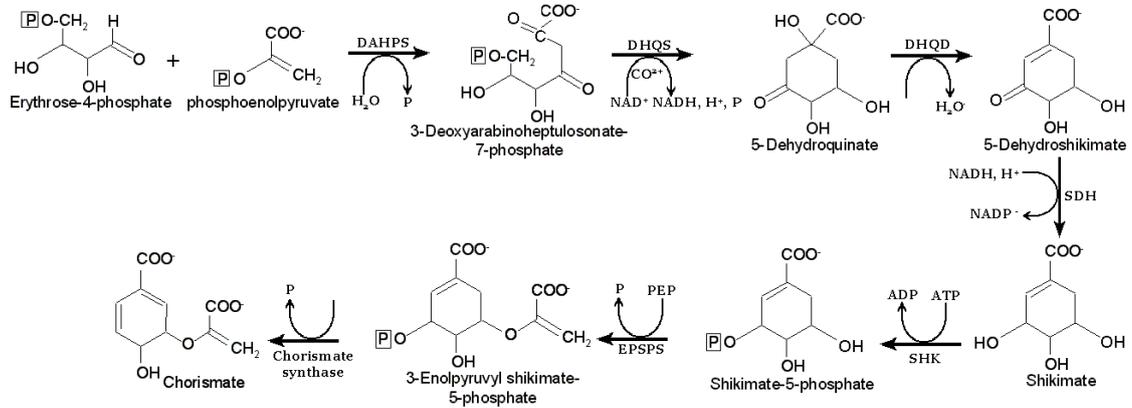


Brazillina

La biosintesi degli *homoisoflavonoids*, ha origine dalla via dello Shikimato per la formazione dell'anello A e catena C3 e si conclude seguendo il percorso dei polichetidi attraverso l'acetil e malonil coenzima A (Mann et al, 1994), aggiungendo l'anello B.

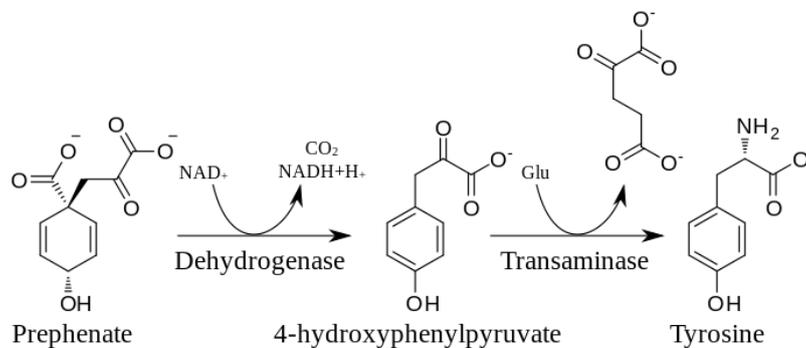
Nella prima parte, composti come il fosfoenolpiruvato e l'eritrosio 4-fosfato reagiscono formando, in una reazione catalizzata dall'enzima DAHP sintasi, il 3-deossi-arabinoeptulsonato-7-fosfato (DAHP). Questo composto, viene convertito, ad opera di una DHQ sintasi, in 3-deidrochinato (DHQ) che richiede come cofattore NAD. La sottrazione di una molecola di acqua al 3-deidrochinato ad opera dell'enzima deidrochinasi, porta alla formazione del 3-deidrosikimato, e successivamente del deidrosikimato. Per azione dell'enzima shikimato deidrogenasi, questo composto viene ridotto ad acido shikimico, che utilizza NADPH quale cofattore. Da cui, shikimato → shikimato-3-fosfato → 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato.

In sintesi, 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato viene convertito in corismato ad opera della corismato sintasi.



Tale composto rappresenta l'intermedio fondamentale per la produzione degli amminoacidi aromatici quali: fenilalanina, triptofano e tirosina.

Piante e microrganismi generalmente sintetizzano fenilalanina e tirosina tramite il prefenato che è biosintetizzato mediante una trasposizione di Claisen del corismato (Goerisch, 1978; Kast et al, 1997). La reazione è catalizzata dall'enzima corismato mutasi.



Il prefenato è sottoposto a decarbossilazione ossidativa NAD-dipendente con ritenzione dell'idrossile, dando luogo al p -idrossifenilpiruvato, successivamente sottoposto ad una reazione di transaminazione dove il glutammato è il donatore del gruppo amminico.

Il prefenato è decarbossilato con perdita dell'ossidrile per formare fenilpiruvato. Questo subisce transaminazione a fenilalanina, con il glutammato come donatore del gruppo amminico. L'azione dell'enzima fenilalanina ammoniaca liasi (PAP) forma la molecola di acido cinnamico. La presenza della fenilalanina come precursore indica che la relativa via metabolica di biosintesi è la via dello shikimato.

La L-fenilalanina e la L-tirosina vengono considerati come mattoni biosintetici C₆C₃ e sono i precursori di una vasta gamma di sostanze naturali.

Nelle piante il primo stadio che si osserva è l'eliminazione di ammoniacca dalla catena laterale per formare il rispettivo acido trans (E) cinnamico.

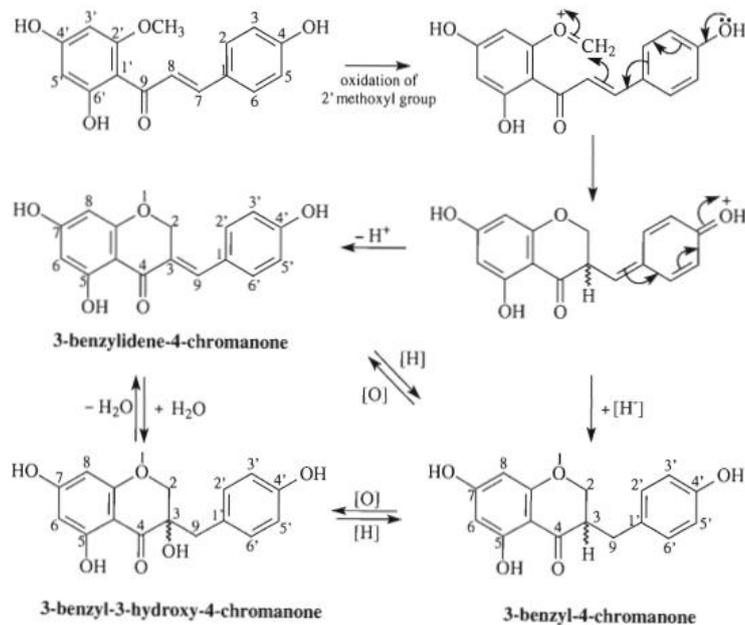
L'acido cinnamico viene quindi ossidato in posizione para per dare acido 4-cumarico. Il protone nella posizione 4 è ossidato ad un gruppo idrossido, essendo spostato nella posizione 3.

Da qui l'acido 4-cumarico viene convertito in CoA 4-coumarile dall'enzima 4-coumarato: CoA ligasi.

La molecola CoA del 4-coumarile quindi si combina con 3 unità di Malonil CoA per dare l'estere polichetide. Ad opera dell'enzima calcone sintasi si origina per una condensazione della reazione di Claisen un tetraidrossicalcone.

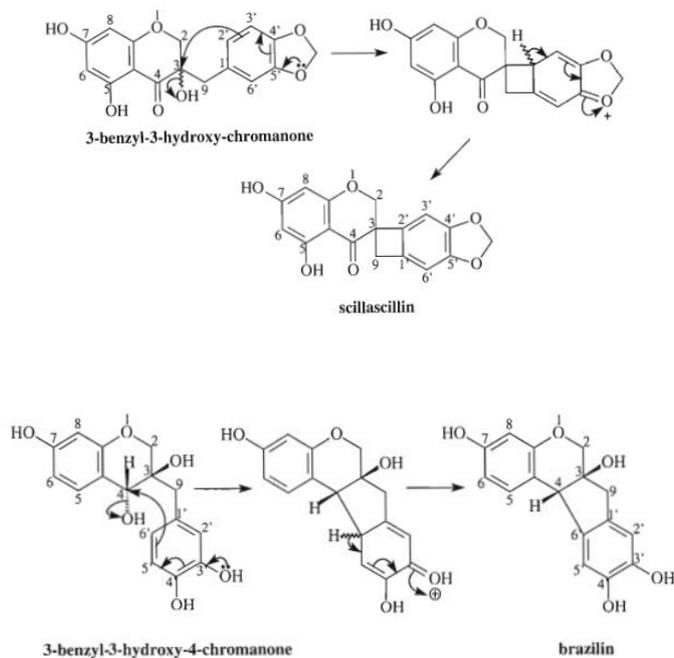
La metilazione con il gruppo S-adenosil-metionina, fonte di un ulteriore carbonio, porta alla formazione del tetraidrocalcone che viene convertito in 2'-metossi-4, 6',4-triidrossicalcone. Uno schema per la conversione di calconi in *homoisoflavonoids* è stato proposto da Dewick (Dewick, 1975) per il quale si pensa che il gruppo metossi sia ossidato e la successiva ciclizzazione produca i tre tipi di base di *homoisoflavonoids*.

L'aggiunta di uno ione idruro produce i tipi di 3-benzil-4-cromanone, mentre la perdita di un protone porta alla formazione dei 3-benzilidene-4-cromanone. Una successiva reazione di idratazione o ossidazione nella posizione C-3 di un 3-benzil-4-cromanone porta ad un 3-benzil-3-idrossi-4-cromanone (schema 1.1).



Schema 1.1 Formazione 3-benzil – 3-idrossi – 4-cromanone; 3 – benzil -4-cromanone

La scillascillina possiede un ulteriore anello e forma il 3- spirociclobutenil mentre, brazilina un ciclopentenil e i composti dracaenone, portano un ulteriore anello cicloesene e sono tutti derivati da complessi meccanismi.

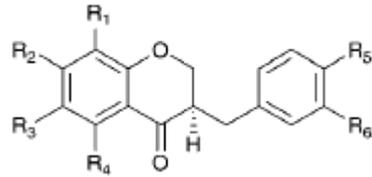


Riassumendo, gli *homioisoflavonoids* sono biosintetizzati dalla modificazione dello scheletro C6 C3 C6. La metilazione dovuta all'aggiunta del S-adenosilmetionina apporta un carbonio extra che diventa C-2 dell'anello eterociclico.

La via dello shikimato, comincia dalla fenilalanina con la formazione di uno scheletro C-4, C-3, C-9 ed un anello B aromatico, mentre l'anello A deriva dall'acetato/mevalonato.

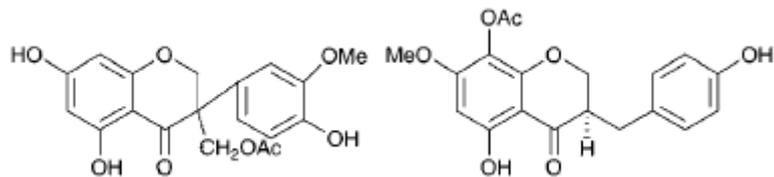
Diversi studi (Lin et al, 2014; Adinolfi, 1984; Adinolfi et al, 1985) condotti su *M. comosum*, hanno portato all'isolamento di circa 19 nortriterpenoidi e alcuni *homioisoflavonoids* (Mulholland et al., 2013).

Tra gli *homoisoflavonoids*, per il 3-benzil-4-cromanone, di seguito sono riportati i sostituenti ad oggi conosciuti (Barone et al, 1983; Adinolfi et al., 1984):

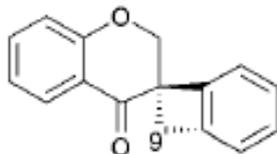


$R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = H, R_4 = OH, R_5 = OH$
 $R_1 = OH, R_2 = OMe, R_3 = H, R_4 = OH, R_5 = OH, R_6 = H$
 $R_1 = OMe, R_2 = OMe, R_3 = H, R_4 = OH, R_5 = OH, R_6 = H$
 $R_1 = OMe, R_2 = OH, R_3 = H, R_4 = OH, R_5 = OH, R_6 = H$
 $R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = OMe, R_4 = OH, R_5 = OH, R_6 = H$
 $R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = H, R_4 = OH, R_5 = OMe, R_6 = OH$
 $R_1 = OH, R_2 = OMe, R_3 = OMe, R_4 = OH, R_5 = OH, R_6 = H$

Altri sostituenti più complessi sono riportati dei composti sotto raffigurati:



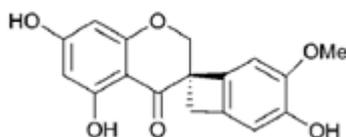
Per gli *homoisoflavonoids* scillascillina (Adinolfi et al, 1990):



I sostituenti conosciuti:

$R_1 = OH, R_2 = H, R_3-R_4 = O-CH_2-O$
 $R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = OH, R_4 = OMe$
 $R_1 = OMe, R_2 = H, R_3 = OH, R_4 = OH$
 $R_1 = OMe, R_2 = H, R_3 = OMe, R_4 = OH$
 $R_1 = OMe, R_2 = OH, R_3 = OMe, R_4 = H$

E sostituenti più complessi:



1.1.4 Proprietà medicinali ed utilizzi terapeutici

Agli *homoisoflavonoids* è riconosciuta un'ampia gamma di attività biologiche singolari, inclusi effetti antimicrobici, antimutageni, antiossidanti, immunomodulatori, antidiabetici, citotossici, antiangiogenici, vasorilassanti e antiinfiammatori (Xie et al, 2000; Hu et al, 2003; Sasaki et al, 2007; Hu et al, 2009; Lin et al, 2014; Nirmal et al, 2015). Sebbene, questi composti, siano considerati come una sottoclasse di flavonoidi ben descritti e studiati, alcuni passaggi nei loro percorsi biosintetici rimangono ancora sconosciuti e pertanto, ancora, oggetto di ulteriori ricerche (Castelli and López, 2017). Nello specifico, per quanto riguarda i *Muscari spp.*, gli *homoisoflavonoids*, sono noti per essere concentrati negli strati cerati dei bulbi e di possedere proprietà antinfiammatorie, antimutagene, antibatteriche e analgesiche e questo è strettamente correlato all'uso etnobotanico da parte dei tradizionali guaritori (Hutchings et al, 1996).

Il consumo dei lampascioni ha una lunga tradizione nell'Italia meridionale, nella Grecia, nel Medio Oriente e nel Mediterraneo orientale. Teofrasto³ (IV sec. AC) si riferisce numerose volte a *M. comosum* (*Historia Plantarum e De Causis Plantarum*), noto come "bulbi", che è ancora oggi l'attuale nome vernacolare della pianta in Grecia ed è considerato una fonte di cibo importante (Doussi and Thanos, 2002).

³ [Theophrastus: De Causis Plantarum. Volumes I–III. Einarson B, Link GKK (translators, 1976 and 1990). London and Cambridge, Mass.: William Heinemann and Harvard University Press. 6. Theophrastus: Historia Plantarum (Enquiry into plants). Vols I and II. Hort AF (translator, 1916 and 1926). Cambridge, Mass. and London: Harvard University Press and William Heinemann Ltd]

Nel sud dell'Italia la tradizione del suo uso specifico come cibo è stata registrata in numerose indagini etnobotaniche; in particolare in Sardegna (Satta, 2007), Sicilia (Lentini and Venza, 2007), Basilicata (Caneva et al, 1997; Pieroni A et al, 2005) e Puglia (Bianco et al, 2009), mentre, nessuna informazione è stata reperita per la Calabria nonostante il bulbo sia ampiamente consumato nei popoli della cultura Arbëreshë.

I bulbi, vengono raccolti prima della formazione dello stelo fiorito. La conoscenza relativa all'uso di *M. comosum* come pianta medicinale è presente nelle comunità albanesi nella Regione Basilicata (Guarrera et al, 2005; Pieroni et al, 2002) ed è stata ampiamente studiata per le sue peculiarità organolettiche, economiche e per le sue proprietà antiossidanti, ma, poco si conosce sulle proprietà farmaceutiche (Pieroni et al, 2002; Borgonovo et al, 2008).

Diversi studi hanno esplorato gli effetti terapeutici di *M. comosum* che vanno dal trattamento dei postumi della sbornia, alla febbre reumatica, alle distorsioni, alla sifilide e addirittura al cancro (Pohl et al, 2002; Doğu and Dinç, 2013).

1.1.4.1 Attività antiossidante e antiobesità *in vitro*

Gli *homoisoflavonoids* presenti nei bulbi di *M. comosum*, come confermato per altri *homoisoflavonoids* da diversi autori (Batubara et al, 2009; Sasaki et al, 2007) e posseggono attività antiossidante, agendo come *scavenger* dei radicali liberi e bloccando la perossidazione lipidica (Juraneck et al, 1993; Pieroni et al, 2002). Negli ultimi anni, altri autori, hanno indagato le peculiarità antiossidanti di estratti totali di bulbi di lampascioni crudi, coltivati o spontanei (Loizzo et al, 2010; Marrelli et al, 2017), nonché del contenuto in polifenoli e flavonoidi totali. Dai dati di letteratura si evince che, bulbi di *M. comosum* contengono una quantità totale di fenoli con *range* di valori abbastanza ampi, che vanno da 56,6 mg equivalente di acido clorogenico (CAE) per grammo di estratto (Loizzo et al, 2010) a 264,33 mgCAE/g nei bulbi spontanei, e di circa 42 mgCAE/g nei bulbi coltivati (Marrelli et al, 2017).

Il contenuto in flavonoidi, è invece stato stimato in un *range* che va da 10,40 mg di quercetina equivalente (QUE) per grammo di estratto a 23,4 mgQUE/g nei bulbi spontanei e di 5,74 mgQUE/g nei bulbi coltivati (Marrelli et al, 2017).

I bulbi selvatici spontanei, mostrano elevati livelli di attività *radical scavenging* testato attraverso il 1,1-difenil-2-picrylidrazil (DPPH) test con valori, anche in questo caso, molto variabili, di IC₅₀ compresi tra 40,9 µg/ml fino a 152,90 ± 7,81 µg/ml (Loizzo et al, 2010; Marrelli et al, 2017); mentre, la capacità riducente degli antiossidanti di bulbi spontanei nei confronti degli ioni Ferro (FRAP test) risulta essere di 66,7 µM Fe(II)/g. L'attività antiossidante di bulbi spontanei, basata sull'ossidazione accoppiata del β-carotene e dell'acido linoleico (β-carotene *bleaching* test) mostra invece, livelli di IC₅₀ di 24,68 µg/ml dopo 30 minuti di incubazione e IC₅₀ di 45,47 µg/ml dopo 60 minuti; mentre, valori di IC₅₀ di 57,71 µg/ml dopo 30 minuti sono stati riscontrati in campioni di bulbi coltivati la cui attività viene persa dopo 60 minuti di incubazione (Marrelli et al, 2017). Tuttavia, l'azione antiossidante, come noto da letteratura, è responsabile di diverse attività biologiche *in vitro*, e nel caso di bulbi di *M. comosum*, interessanti risultati si sono ottenuti su test *in vitro* inerenti l'inibizione della lipasi ed amilasi pancreatiche, nonché della α-glucosidasi (Loizzo et al, 2010; Marrelli et al, 2017).

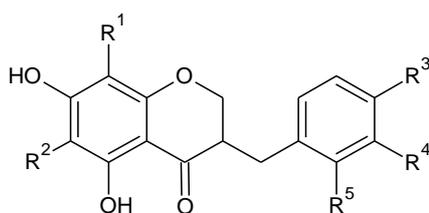
Estratti totali di bulbi di *M. comosum*, presentano buona attività ipoglicemizzante con valori IC₅₀ di 81,3 e 112,8 µg/ml per α-amilasi e α-glucosidasi, rispettivamente (Loizzo et al, 2010) e un'importante attività inibitoria della lipasi pancreatica, con valori IC₅₀ di 0,166 ± 0,005 mg/ml in bulbi spontanei (Marrelli et al, 2017).

Anche Castelli e López (2017) hanno sostenuto, in una recente *review* il ruolo degli *homioisoflavonoids* nell'attività di regolazione dell'*uptake* del glucosio e nella differenziazione degli adipociti (Zhang et al, 2010; Ko et al, 2015), dimostrando quanto sia ancora necessario indagare sulla reale possibilità di utilizzare gli *homioisoflavonoids* come possibili farmaci per il trattamento dell'obesità e dell'iperglicemia.

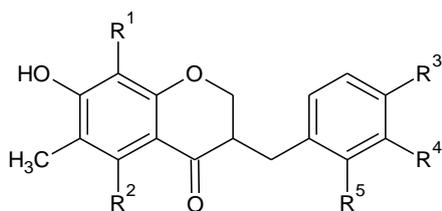
1.1.4.2 Attività antinfiammatoria

Le frazioni ricche di *homioisoflavonoids* provenienti da bulbi di *M. comosum* hanno dimostrato di inibire la dermatite dell'orecchio del topo con una azione farmacologica paragonabile all'antinfiammatorio indometacina (Della Loggia et al, 1989).

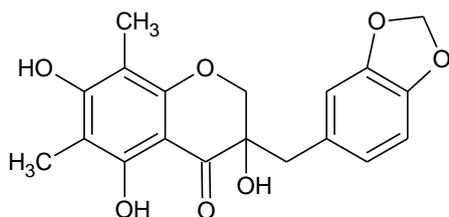
L'attività antinfiammatoria degli *homioisoflavonoids* è riconosciuta da diversi autori (Choi et al, 2007; Hung et al, 2010; Wang et al, 2011; Li et al, 2012) e si riferisce in parte agli effetti sulla inibizione della produzione di nitrossido (NO) indotta da lipopolisaccaridi nella linea cellulare linfocitaria murina BV-2, e in parte da composti con sostituenti 1, 2, 3, 4, 5 e 6 (ultima immagine) che hanno mostrato potenti effetti inibitori sulla produzione di NO con valori IC₅₀ rispettivamente di 17,0; 7,8; 5,1; 19,2; 14,4 e 20,1, μM (Li et al, 2012) rispettivamente.



1. R₁= CH₃ R₂= OH R₃=OH R₄=CH₃
2. R₁= CH₃ R₂=OH R₃= OCH₃ R₄=H
3. R₁= CH₃ R₂=OH R₃=OCH₃ R₄=H
4. R₁= CH₃ R₂= CH₃ R₃ -O-CH₂-O- R₄=H
5. R₁= O CH₃ R₂= OH R₃=OCH₃ R₄= H



Altri sostituenti (6)



6

Attività antinfiammatoria è stata riscontrata sul rilascio delle eotassine, chemochine implicate nel processo di chemiotassi, stimulate da citochine profibrotiche IL-4 e dalla combinazione di IL-4 e TNF- α in cellule BEAS-2B (*human bronchial epithelial cells*), che imita le condizioni *in vivo* dell'asma allergico bronchiale (Hung TM et al, 2010).

Ulteriori studi sull'attività antinfiammatoria da parte degli *homoisoflavonoids* sono stati descritti recentemente da Zhao et al, 2017.

1.1.4.3 Attività antimutagena, anticancerogena e citotossica

Diversi studi hanno dimostrato che alla base delle attività antimutagene e anticarcinogene sono presenti diversi inibitori naturali che agiscono attraverso differenti *pathway* (Wall et al, 1989; Birt et al, 2001; Prakash et al, 2013; Greenwell and Rahman, 2015; Rajesh et al, 2015) e che i composti polifenolici con la loro relativa attività antiossidante, risultano essere tra i più potenti chemopreventivi ad oggi riconosciuti (Walle et al, 2007; Bilecová-Rabajdová et al, 2013; Rahul et al, 2015; Martí et al, 2016; Massi et al, 2017).

Miadokova et al (2002), sostengono che estratti di bulbi di *M. racemosum* ricchi di 3-benzildene-4-cromanone è ritenuto essere un potente antimutageno e anticlastogeno. Tali composti, infatti, testati su 4 ceppi batterici di *Salmonella typhimurium* TA97, TA98, TA100, TA102 e su ceppi di lievito *Saccharomyces cerevisiae* D7, mostrano comprovata attività genotossica tanto da definirli potenti antimutageni/carcinogeni e potenzialmente utili nell'applicazione farmacologica per la prevenzione del cancro.

Ulteriori test di citotossicità sono stati eseguiti *in vitro* per valutare le potenzialità antitumorali degli *homoisoflavonoids* che si sono rivelati attivi anche su linee cellulari molto diverse tra loro. Infatti, estratti applicati su linee cellulari tumorali MDA-MB-435 (*melanoma cell line*) e HT-29 (*human colorectal adenocarcinoma cell line*) hanno mostrato valori di IC₅₀ di 1,0 e 1,1 μ M (Alali et al, 2015) rispettivamente, mentre, su SGC-7901 (*human gastric cancer cell line*), CNS (*central nervous system*) SF-268, NCI-H460 (*human large cell lung carcinoma cells*) in cui la massima azione di citotossicità è stata riscontrata verso la linea cellulare SGC-7901, è stato evidenziato un IC₅₀ di 1.6 μ g/ml addirittura più potente del composto di riferimento mitomicina C (IC₅₀= 13,0 μ g / ml) (Yan et al, 2012).

Altri autori (Machala et al., 2001; Dai et al., 2013) riportano l'efficacia antiossidante e antiproliferativa di *homoisoflavonoids* anche su linee cellulari A2780 (*ovarian cancer*), A2058 (*melanoma*), H522-T1 (*human non-small cell lung cancer cells*), con valori di IC₅₀ di 24,1; 11,2; 111 nM, rispettivamente.

1.1.4.4 Attività antibatterica e antivirale

Riguardo le attività antibatteriche, antifungine ed antivirali, sempre più composti appartenenti ai flavonoidi, terpenoidi, composti organosolfuri, polifenoli, coumarine e saponine, sono oggetto di studi ed approfondimenti da parte dei ricercatori. Nel caso dei flavonoidi, ad esempio, poiché essi sono noti per essere sintetizzati dalle piante in risposta all'infezione microbica (Dixon et al, 1983), è facile intuire come sia possibile rinvenire in saggi *in vitro* derivanti da estratti vegetali, una vasta gamma di sostanze antimicrobiche efficaci contro svariati microrganismi (Cowan, 1999). Nello specifico, il meccanismo biologico può essere spiegato dalla relazione tra l'attività antiossidante e la capacità *radical scavenging*, nonché, su inibizione di sintesi di RNA, riproduzione ed alterazione della parete batterica (Al Nakib et al, 1995; Tsuchiya et al., 1996; Desideri, 1997; Rahaman et al, 2007; Rajesh et al. 2008).

L'attività antivirale degli *homioisoflavonoids* è stata monitorata su cellule BGM (*Buffalo Green Monkey*) al fine di individuare le concentrazioni necessarie per l'inibizione del 50% (IC₅₀), nonché l'indice di selettività (SI). Nessuna delle sostanze indagate è risultata efficace contro il poliovirus di tipo 1 di Sabin (PV1), ma la maggior parte di loro mostrava una bassa citotossicità e una marcata attività antivirale contro il virus *Coxsackie* B1, B3, B4, A9 e Echovirus 30 (*Enteric Cytopathic Human Orphan virus*) (Tait et al, 2006). Altri studi hanno riconosciuto l'attività antimicrobica degli *homioisoflavonoids* sul rallentamento di crescita di ceppi di *Mycobacterium smegmatis* con indici di MICs (*minimal inhibitory concentrations*) in un range compreso tra 17 e 24 µg/ml (Li-Gen Lin et al, 2014) mentre, ulteriori calconi estratti da *Caesalpinia spp*, mostrano spiccate attività antimicrobiche nei confronti di ceppi di *Stafilococcus aureus* NCIM-2079, *Salmonella typhi* MTCC, *Candida albicans* NCIM-3466 e *Cryptococcus neoformans* NCIM-3378, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus*, *Apergillus niger* (Das et al, 2009; Saraiva et al, 2012; Nirmal et al, 2015;).

1.1.4.5 Attività neuroprotettiva

Diversi studi hanno confermato il ruolo degli *homioisoflavonoids* nella riduzione della formazione delle placche β-amiloidi (Aβ) o di contribuire alla digregazione, formazione di queste, nella malattia di Alzheimer (AD) (Sun et al, 2013; Gan et al, 2014; Wang et al, 2015; Pourshojaei et al, 2015).

Loizzo et al (2011), hanno dimostrato, attraverso il metodo di *Ellman*, che la porzione di estratto in esano di bulbi di *M. comosum* presentava valori di inibizione per AChE e BChE con IC₅₀ pari a 104,9 e 128,1 mg/ml rispettivamente; anche altri autori, suggeriscono che diversi *homioisoflavonoids* mostrano, per hMAO-B, valori di IC₅₀ di 0,65 mM e, per altri, AChE e hMAO-B, IC₅₀ di 3,94 e 3,44 mM rispettivamente (Wang et al, 2016).

Inoltre, (E)-3-benzilidenecroman-4-one, 3-benzil-4H-cromen-4-one e 3-benzilcroman-4-one di sintesi, hanno mostrato, *in vitro*, di inibire hMAO-A e hMAO- B. Nello specifico, (E) -3-benzilidenecroman-4-one hanno mostrato attività nel range dei valori nano o micromolari ed alta selettività contro hMAO-B (Desideri et al, 2011).

1.2 Storia tassonomica *Citrus* L.

Il *Citrus* L., 1753 è una pianta appartenente all'Ordine *Sapindales* (*Sapindales* Juss. ex Bercht. & J. Presl, 1820), particolari dicotiledoni delle Angiosperme comprendenti principalmente piante legnose produttrici di gomme e resine, con fiori spesso imperfetti e dal particolare odore (Taylor et al, 2009) rappresentato con la nuova classificazione filogenetica *AGP III*, in 9 famiglie e circa 450 generi.

Il genere *Citrus* L. appartiene alla famiglia delle *Rutaceae* che risulta ampiamente distribuita nelle aree tropicali e subtropicali del mondo (Webber, 1967) e composta da circa 160 generi e 1.800 specie caratterizzate da particolari ghiandole fogliari che conferiscono particolari aromi (Tomlinson, Cambridge University Press).

Appartiene al genere *Citrus*, ma classificato come sottogenere, *Papeda*, che include il limone limetta o limone di Ichang (*Citrus* × *ichangensis*), dal particolare sapore dolce, lo Yuzu o *Citrus junos* Sieb. ex Tanaka (*Citrus ichangensis* × *Citrus reticulata*) e la limetta kaffir (*Citrus* × *hystrix*). La caratteristica di *Papeda* è la crescita generalmente lenta e l'amarrezza dei frutti che li rendono meno appetibili rispetto ad altri agrumi, per cui le sue specie hanno avuto sempre una coltivazione commerciale molto limitata. Alcune specie, come l'*Ichang papeda*, sono utilizzate ai fini paesaggistici, mentre altre sono importanti per portinnesto e come fonte genomica per ibridi resistenti alle malattie e al gelo (Jacob, 2014).

Il genere *Citrus*, include alcuni dei frutti commercialmente più importanti: mandarino (*Citrus reticulata* Blanco), arancia dolce (*Citrus sinensis* L. Osbeck), pompelmo (*Citrus paradisi* Macf.), limone (*Citrus limon* L. Burm.) e lime (*Citrus aurantifolia* Christm. Swingle) anche se molteplici sono le varietà ibride (Mandalate®, Tacle®, Clara®) che rispondono alle richieste del mercato dei succhi, sempre più esigenti e diversificate (Rapisarda et al, 2008), mentre tutti gli altri genotipi attualmente conosciuti sono derivati dall'ibridazione tra queste specie.

La tassonomia e la filogenesi degli agrumi sono molto complicate, controverse e ambigue (Nicolosi et al., 2000) sia a causa della lunga storia di coltivazione (oltre 4000 anni), che della compatibilità sessuale tra le specie, che permette incroci tra *Citrus* e *Papeda*, che all'alta frequenza di mutazione somatica delle gemme. Inoltre, la maggior parte delle specie del genere *Citrus* sono caratterizzate dalla poliembrionia (da 1 a 40 embrioni avventizi dal nucello) (Fusurato, 1957), che fa sì che due o più embrioni si sviluppino in un singolo seme.

Scora (1975) e Barrett e Rhodes (1976), hanno suggerito che ci sono solo tre vere specie "base" di *Citrus* all'interno del sottogenere *Citrus* e sono il cedro (*Citrus medica* L.), il mandarino (*Citrus reticulata* Blanco) e il pomelo (*Citrus grandis* L. Osbeck), mentre tutte le altre specie all'interno di questo sottogenere sono ibridi derivati da questi o da specie di sottogenere *Papeda* o generi strettamente correlati. Tra *C. medica* L. (cedro), *C. grandis* Osbeck (pomelo) e *C. reticulata* Blanco (mandarino), le prime due specie sono rigorosamente monoembrionali con solo prole sessuale mentre *C. reticulata* Blanco è poliembrionica. A fronte di queste evidenze, molteplici sono le ipotesi avanzate sulla filogenesi delle specie selvatiche chiave anche perché la relazione genetica tra le specie coltivate e i loro progenitori "selvaggi" sono ancora irrisolti.

Tutte le informazioni tassonomiche basate su dati morfologici e geografici del *Citrus*, si devono in gran parte a Swingle e Reece (1967) e a Tanaka (1977) che hanno ideato i due sistemi maggiormente accettati dalla comunità scientifica ma che creano ancora molteplici critiche a causa dell'elevata discrepanza nell'accorpamento delle specie: il sistema di Swingle ne riconosce solo 16 specie mentre quello di Tanaka, ne riconosce 162. Se da una parte però, gli studi filogenetici sopra citati, concordano sul fatto che la maggior parte degli agrumi coltivati sono derivati dall'ibridazione di *Citrus reticulata* Blanco, *Citrus grandis* L. Osbeck) e *Citrus medica*

L., dall'altra, ulteriori e recenti studi hanno supportato, in parte, questa ipotesi (Carbonell-Caballero et al., 2015) e alcuni di essi hanno anche aggiunto *Citrus micrantha* come quarta specie fondamentale (Nicolosi et al., 2000 Barkley et al., 2006; Garcia-Lor et al., 2012; Ollitrault et al., 2012). Tuttavia, a parte questo accordo generale, ci sono ancora molte discrepanze riguardo alle relazioni filogenetiche all'interno del genere (Scora 1975, Pfeil and Crisp 2008, Bayer et al, 2009, Penjor et al, 2013) che continuano a richiedere ulteriori approfondimenti che potranno essere soddisfatte solo ed esclusivamente attraverso lo studio genetico della pianta.

Gli studi genomici (Xu et al., 2013, Wu et al., 2014) di specifici organelli, come dei cloroplasti (Bausher et al., 2006), per esempio, consente studi più dettagliati sull'origine, l'addomesticamento e le relazioni filogenetiche all'interno del genere (Parks et al., 2009), soprattutto perché l'analisi del genoma del cloroplasto, mostra un tasso di sostituzione molto più basso del DNA nucleare (Wolfe et al., 1987, Carbonell-Caballero J., 2015) e quindi, fondamentale per il chiarimento dell'appartenenza filogenetica delle specie.

1.2.1 Caratteristiche botaniche del genere *Citrus* L.

Dal seme del *Citrus* L. inizia a germinare la radichetta da cui origina la radice a fittone che crescendo si ricopre di peli radicali i quali, in breve tempo, creano interessanti interazioni simbiotiche con micorrize e batteri così da rendere facilmente assimilabili i nutrienti, nello specifico il fosforo (Graham, 1986) e il boro, la cui deficienza colpisce molti processi fisiologici e biochimici, come lo scambio di gas, il metabolismo degli acidi nucleici, la biosintesi di proteine e amminoacidi (AA), il trasporto e l'accumulo di carboidrati, il metabolismo degli acidi organici (OA), la divisione cellulare, la struttura della parete cellulare, nonché il metabolismo fenolico, biosintesi e trasporto di ormoni vegetali (Lu et al, 2015). Nelle giovani piante, la radice principale è detta chiodo che, se mantenuta tale, costituisce la radice a fittone basilare, tipica della pianta, mentre, se viene danneggiata durante le pratiche vivaistiche, dall'asse principale originano radici secondarie che si mantengono per tutta la durata della vita della pianta e crescono fino a raggiungere i 2 m di profondità. La capacità di espansione delle radici in larghezza e in lunghezza, è fortemente funzione delle caratteristiche pedoclimatiche⁴. Negli impianti commerciali, il fusto porta 3 – 4 branche principali da cui originano altre secondarie; queste strutture, vanno a costituire la chioma; tronco e branche le quali, possiedono, se coltivate in condizioni idonee, una sezione di forma circolare.

La chioma comprende germogli, dai quali originano foglie, gemme ascellari e apicali, spine, fiori e frutti. I giovani germogli sono generalmente di colore verde chiaro con sezione triangolare per la presenza di scanalature che originano dalla base del picciolo. All'estremità del picciolo si evidenzia il meristema apicale formato da *tunica* e un ammasso cellulare in divisione detto *corpus*.

Le gemme, che solitamente si accompagnano da gemme secondarie (una principale e due sottogemme) si trovano all'ascella delle foglie e sono costituite da un meristema apicale protetto da profilli. Solitamente, in alcune specie, all'ascella delle foglie è presente anche una piccola spina la cui dimensione e consistenza dipende dall'età e dallo stato di salute della pianta.

I fiori originano dalla schiusura di gemme dormienti originatesi l'anno precedente, e sono raggruppati in infiorescenze corimbiformi, sono ermafroditi; il fiore è peduncolato con 5 sepali a formare il calice e da 5 liberi, sessili, spessi e coriacei formanti la corolla e alternati con i sepali.

⁴ Tratto da botanica - Morfologia e fisiologia -Stefano La Malfa. Realizzazione editoriale: ART Servizi Editoriali S.r.l.

Gli stami sono da 15 a 60 con una media di 20-30, raggruppati a 3-4 e portanti all'apice le antere. Il pistillo è formato da un ovario sormontato da uno stilo e dallo stigma di forma sferoidale. L'ovario è pluriloculare, le logge da 8 a 18 e provviste di 4-8 ovuli disposti su due file.

Il frutto, botanicamente è una bacca chiamata esperidio di forma sferoidale. Si origina dall'accrescimento dell'ovario ed è formato da un numero variabile di carpelli che, disposti a raggiera costituiscono gli spicchi. Alcune varietà, come Navel, contengono per sincarpia, un frutto secondario che è presente all'estremità stilare del frutto principale. L'esperidio presenta due parti principali, il pericarpo o buccia che a sua volta si suddivide in flavedo o esocarpo (parte esterna di colore arancio) e in mesocarpo o albedo (parte spugnosa bianca), e endocarpo o polpa. Una peculiarità del flavedo è di possedere ghiandole oleifere multicellulari in cui sono presenti oli essenziali: terpeni, sesquiterpeni alifatici, ossigenati, biciclici, acidi grassi, cumarine, flavoni nonché pigmenti (carotenoidi, clorofille, flavonoidi). Secondo il colore della polpa si distinguono cultivar bionde (biondo comune), Navel, Washington Navel, Valencia late e Ovale-calabrese, o sanguigne Moro, Sanguinello e Tarocco.

I semi si trovano nella parte più interna di ogni spicchio, derivano dalla fecondazione degli ovuli e hanno una forma variabile. I Navel per esempio sono definite apirene perché non possiedono semi, così altre varietà, mentre, alcune varietà di mandarino ne contengono fino a 20.

1.2.2 Componente fitochimica in *Citrus L.*

La biosintesi dei flavonoidi ha luogo nel citosol, dove le proteine principali del *pathway* sono organizzate in complessi multienzimatici raggruppati attorno a monossigenasi CytP450-dipendenti, a stretto ridosso del reticolo endoplasmatico a contatto con il citosol. Gli enzimi coinvolti nella biosintesi dei flavonoidi sono classificabili in due gruppi: enzimi che catalizzano reazioni del metabolismo fenilpropanico generale ed enzimi che catalizzano le reazioni che portano alle differenti classi di flavonoidi (Winkel-Shirley, 2002).

La biosintesi dei vari flavonoidi, oltre che dalla genetica della pianta e dal suo ciclo biologico, è regolata da numerosi fattori esterni, stress biotici e abiotici, luce, basse temperature, deficienza di acqua e composizione del terreno, danni meccanici, attacco di parassiti (Petrucci et al, 2013).

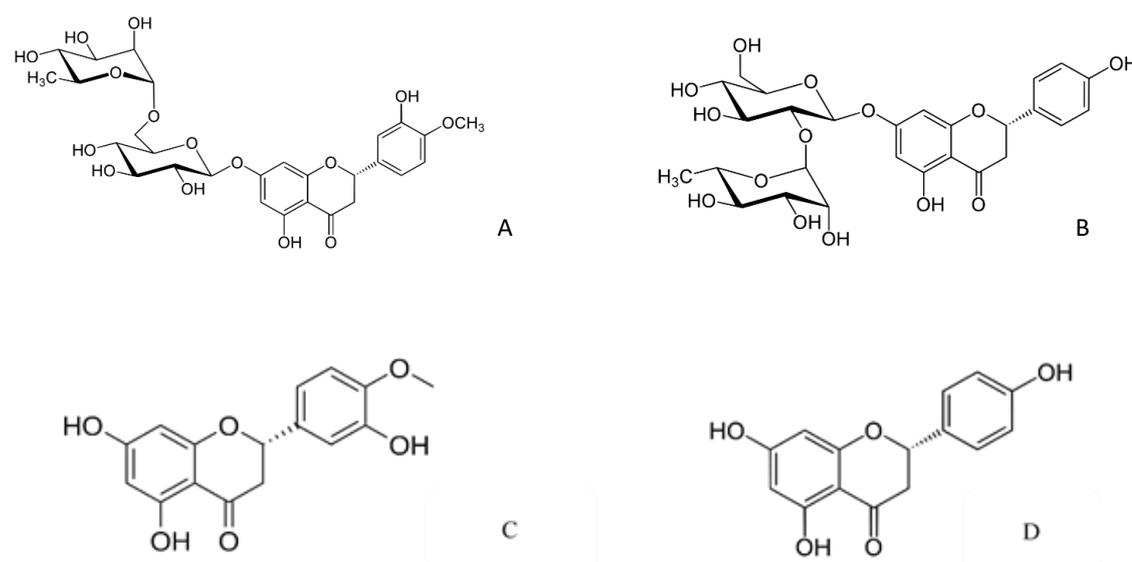
I flavonoidi possono essere classificati come flavonoli, flavoni, isoflavoni, flavanoni, antocianidine e flavanoli (catechine e proantocianidine) e possono essere associati a vari carboidrati e acidi organici (Lau et al, 2006; Rodríguez et al, 2009).

Il glucosio è il residuo zuccherino più comune, ma è possibile trovare anche ramnosio, galattosio, xilosio che divengono la componente da ingombro sterico più importante, responsabile tra l'altro della ridotta attività biologica della molecola. È noto, infatti che le forme aglicone sono quelle maggiormente attive.

Negli ultimi anni sono state attribuite ai flavonoidi diverse proprietà biologiche, dall'attività antiossidante a quella anticancerogena, antidiabetica e antiperlipidemica e diversi sono gli studi che cercano di spiegare le correlazioni tra strutture chimiche e bioattività, nonché chiarire le relazioni tra struttura, attività e farmacocinetica dei componenti bioattivi (Kumar and Pandey, 2013; Wang et al, 2017).

Soprattutto, particolare interesse è stato riservato ad esperedina e naringina che sono la componente flavonoidica (flavonoli) più importante finora isolata dagli agrumi (Tripoli, 2007). Si è scoperto che questi flavonoidi possiedono forti attività antiossidanti e antinfiammatorie sia *in vitro* che *in vivo* (Kumar and Pandey, 2013).

L'esperidina è costituita dall'aglicone esperitina e dal disaccaride rutinosio, mentre la naringina è costituita dall'aglicone naringenina e dal disaccaride rutinosio (Hsu et al, 2002).



schema 1.2 Flavonoli glicosidici e agliconi: A esperedina, B Naringina, C Esperitina, D Naringenina,

Diversi studi hanno confermato l'elevata attività biologica di naringina ed esperidina, dimostrando l'importanza dell'assunzione di questi flavanoni con la dieta. Il consumo umano medio giornaliero di flavonoidi non è noto anche perché non ci sono dati completi e sufficienti sulla composizione degli alimenti per sottoclassi di flavonoidi (Beecher GR. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. J Nutr 2003;133 Suppl:3248S–54S), anche perché in Italia, tra l'altro, le uniche tabelle di riferimento sono quelle pubblicate dall'INRAN (oggi CREA-NUT), dall'altra pochi dati scientifici hanno indicato l'esistenza e l'eventuale tossicità dei flavonoidi, nonché una soglia di tolleranza (Wang et al, 2007; Bugel et al, 2016).

Prove recenti suggeriscono che l'assunzione giornaliera totale di flavonoidi varia tra Nazioni e culture: infatti, il consumo di flavonoidi totali varia da ~ 20 mg/die per Stati Uniti, Danimarca, Finlandia a > 70 mg/die per i Paesi Bassi (Beecher, 2003). Chun et al, (2007) hanno stimato l'assunzione di flavonoidi combinando la banca dati flavonoidi dell'USDA e il *recall* dietetico delle 24 ore nei dati NHANES 1999-2002, da cui è emerso che l'assunzione media giornaliera di flavonoidi rilevata dal consumo di tè è 157 mg, da succhi di agrumi 8 mg e da frutto 3 mg mentre, da vino 4 mg. Un altro studio, condotto sulla popolazione australiana, ha stimato un'assunzione di flavonoidi di 128 mg/die comprendendo 15 tipologie diverse di flavonoidi ad eccezione degli isoflavoni (Lyons-Wall et al, 2004).

Visti i dati inerenti l'intake, diventa poi necessario comprendere quanto e in che forma, i flavonoidi vengono assorbiti e raggiungono il circolo ematico per riuscire a svolgere le attività biologiche ad essi attribuiti. Autori hanno rilevato la presenza di molecole agliconiche e glucuronidi di flavonoidi nell'urina umana (Ameer et al, Fuhr and Kummert, 1995; Kanaze et al, 2007) e nel plasma (Manach et al, 2003; Xiong et al, 2014) in seguito ad ingestione di succo. Questi risultati hanno mostrato che i flavonoidi provenienti dalla dieta e liberati dagli alimenti possono essere assorbiti e metabolizzati; studi, hanno dimostrato che l'assorbimento dipende dalle proprietà fisico-chimiche come la dimensione molecolare, la configurazione, la lipofilità, la solubilità e il pKa delle molecole flavonoidiche (Hollman, 2004).

L'assorbimento, può avvenire nell'intestino tenue o nel colon e può dipendere dal fatto che il flavonoide sia un glucoside o un aglicone: mentre gli agliconi possono essere facilmente assorbiti dall'intestino tenue, i glicosidi devono essere previamente convertiti in forma agliconica (Hollman et al, 1999). Alcuni studi, hanno indagato sull'assorbimento di 3-[14C] -esperetina in ratti indicando che la forma agliconica può essere assorbita per oltre il 90% (Honohan et al, 1976; Brett et al, 2009, Orrego-Lagarón et al, 2016).

La forma glicosidica di naringenina, naringina, non viene rilevata nell'urina umana o animale suggerendo che la naringina sia deglicosilata prima dell'assorbimento intestinale. Altri studi, dimostrano che, una grande percentuale di naringenina assorbita nell'uomo compare nelle urine come glucuronidi di naringenina (Fuhr et al, 1995, Davis et al, 2006) può giocare un ruolo importante nel metabolismo di questo composto.

In uno studio incrociato randomizzato, 20 soggetti hanno consumato una singola porzione di frutto (150 g) o succo (300 g) che conteneva i flavanoni narirutina ed esperidina e altri 109 soggetti di età compresa tra 18-80 anni, hanno consumato solo il succo. I metaboliti di flavanone sono stati misurati in campioni prelevati regolarmente di plasma e urina dopo il consumo di frutta o succo. Dai dati è emerso che i flavanoni coniugati, ma non gli agliconi, sono stati rilevati nel plasma e nelle urine (Brett et al, 2009).

Dai dati di farmacocinetica e di escrezione urinaria plasmatica eseguiti da Brett et al (2009), non sono state indicate differenze nell'assorbimento o escrezione di flavanone tra le matrici di frutta e succo. Nel *dataset* di escrezione urinaria, la variazione individuale era molto ampia (*range*

0-59% di resa urinaria): è stata segnalata una diminuzione minima ma significativa ($P < 0,05$) dell'escrezione dell'esperetina (ma non della naringenina) con l'aumentare dell'età ($P < 0,05$). Gli effetti del sesso, del BMI e dell'uso della pillola contraccettiva non hanno mostrato essere associato alla variazione dell'escrezione di flavanone.

Studi hanno dimostrato che a giocare un ruolo importante nella biodisponibilità dei flavonoidi è la microflora intestinale, i cui enzimi (α -L-ramnosidasi, eso- β -glucosidasi, endo- β -glucosidasi e/o β -glucuronosidasi) sono capaci di idrolizzare i legami glicosidici della naringina, liberando l'aglicone dalla naringenina (Manach C. et al, 2005). Furh et al, 1995, hanno dimostrato che a giocare un ruolo importante nel metabolismo dei flavonoidi, sono le grandi differenze interindividuali, come evidente nelle feci, suggerendo che la presenza o l'assenza di alcuni ceppi batterici (e chiaramente, di particolari predisposizioni genetiche) siano alla base di tale variabilità.

Gli studi che utilizzano modelli microsomiali, cellulari e animali indicano costantemente che la coniugazione rapida, in particolare la glucuronidazione a livello intestinale e epatico, è principalmente responsabile della scarsa biodisponibilità dei composti fenolici, anche se a volte possono essere coinvolti anche altri fattori come la stabilità e la solubilità (Gao et al, 2010).

La glucuronidazione è mediata da UDP-glucuronosiltransferasi (UGT) che insieme agli enzimi del citocromo P450 (CYP), aggreghano i fenoli al livello del gruppo nucleofilo -OH attaccato all'anello aromatico (Wu et al, 2011). Per molecole con più di un gruppo idrossile esistono più isomeri di glucuronidi che, nel caso dei fenoli essendo molto più idrofili rispetto ai loro composti progenitori, il trasporto dai compartimenti intracellulari a extracellulari richiede l'ausilio di trasportatori di efflusso. Questo crea l'interazione tra gli enzimi UGT e i trasportatori di efflusso. Di conseguenza, l'escrezione (o la produzione) di glucuronide non è sempre determinata dal solo metabolismo UGT, e il trasporto di efflusso potrebbe occasionalmente essere il passo limitante della velocità che regola l'efficienza complessiva della glucuronidazione *in vivo* (Jeong et al, 2005; Liu et al, 2007).

1.2.3 Proprietà medicinali ed utilizzi terapeutici

Gli agrumi sono frutti di notevole interesse commerciale, sia per le loro qualità organolettiche (mercato dei succhi) che per quelle salutistiche. Dai dati INRAN si evince che, 100g di arancia (*Citrus sinensis* L. Osbeck), fornisce 34 kcal, 87,2% di acqua, il 7,6% di zuccheri solubili e circa 1,6% di fibra totale, di cui 0,6 % di solubile; rappresenta una interessante fonte di potassio (200mg), calcio (49 mg) e fosforo (22 mg), mentre 100g di mandarini (*Citrus reticulata* Blanco) contengono più del doppio di energia dell'arancia (72 kcal), con 81,4% di acqua e il 17,6% di carboidrati disponibili, 1,7% di fibra totale (0,67% solubile). La principale caratteristica nutrizionale del genere *Citrus* è la vitamina C la cui dose giornaliera raccomandata (RDA) secondo *Institute of Medicine (US) Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds* è di 90 mg/die per gli uomini e 75 mg/die per le donne, e di (Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Institute of Medicine (US) Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds. Washington (DC): National Academies Press (US); 2000) di 75 mg/die negli uomini e 60 mg/die per le donne secondo le linee guida italiane LARN (2014).

L'utilizzo tradizionale di genere *Citrus* vedeva, il limone, come la panacea per tutti i mali e molti dei suoi usi sono basati su credenze popolari, secondo cui, posizionare le fette sugli occhi o sulle tempie contribuisce a ridurre i bruciori (Pitre, 1870⁵). Nella medicina tradizionale, vede, il

⁵ Opere complete di Giuseppe Pitre, *Medicina Popolare Siciliana*, by Pitre, Giuseppe, 1841 -1916; Cavagna Sangiuliani di Galdana, Antonio, conte, 1843-1913, former owner. IU-R.

10% di essenza di bergamotto in alcool a 70 ° come antisettico locale; acqua distillata di *C. aurantium* var. *dulcis* L. e sciroppo di *Capsella bursa pastoris* come antiemorragico nella menorragia durante la pubertà e la menopausa⁶; Nei cosmetici, l'acqua di fiori d'arancio, l'olio di neroli e l'olio di bergamotto sono ingredienti nella formulazione di colonie, profumi e creme per la pelle secca (acqua di fiori d'arancio). Il massaggio del viso con succo di limone riduce l'iperattività delle ghiandole sebacee della pelle grassa⁵. Il limone a cubetti viene utilizzato nelle ricette per bagni antiseborroici. Una miscela di succo di limone e olio di avocado può essere massaggiata su unghie fragili. L'olio essenziale di limone incorporato con creme o latte può svolgere una funzione antisettica nelle infezioni della pelle; è un buon antiseborroico, aiuta a prevenire le rughe ed è lenitivo per le mani⁴, sempre limone disinfettante, ad azione spasmolitica, espettorante, lenitiva, antinfiammatoria⁵.

1.2.3.1 Attività antiossidante e antiobesità

Negli ultimi anni, l'attività antiossidante degli agrumi e il loro ruolo nella prevenzione e nel trattamento di varie malattie croniche e degenerative umane hanno attirato sempre più attenzione. Gli agrumi sono suggeriti per essere una buona fonte di antiossidanti dietetici (Zou et al, 2016) e di contribuire alla gestione del peso corporeo attraverso l'inibizione di enzimi diretti alla digestione dei lipidi (lipasi pancreatica) o all'attivazione di particolari *pathway* enzimatici (Kang et al, 2012; Mayumi et al, 2014; Shimada, 2015; Kim et al, 2016).

Per quanto riguarda l'attività antiossidante, è noto che estratti di *Citrus* (foglie, bucce, polpa) presentino interessanti risultati. Da uno studio che confronta più parti della pianta a confronto tra più specie, emerge che, a concentrazione di 0,1 mg/ml di estratto di foglie, si osservi un'attività *radical scavenging* (DPPH) con percentuali del 48% e 84%, mentre, differenza significativa è stata riscontrata tra il potere di *scavenging* del radicale DPPH tra gli estratti metanolici e acquosi di foglie di *C. naval*, *C. grandis*, *C. clementina* (*Citrus clementina* Hort ex Tan) ($p > 0,05$). Per *C. aurantifolia* (*Citrus aurantifolia* Swingle), *C. hamlin* e *C. limon*, gli estratti acquosi sono leggermente più efficaci degli estratti metanolici (Bachra et al, 2016). L'effetto di *scavenging* più elevato è stato osservato per l'estratto acquoso di foglie di *C. limon* (IC_{50} 35,35 μ g/ml) mentre l'attività più bassa è stata trovata nell'estratto di metanolo di *C. hamlin* (IC_{50} 95,78 μ g/ml). (Khetal et al, 2017).

Altri studi eseguiti su estratti di foglie, polpa e bucce (Muthiah et al, 2012), in linea con quanto dichiarato da Khetal et al, hanno dimostrato che, tra gli estratti saggianti, 8 nello specifico (foglia, buccia e frutto di *C. aurantium* L. e *C. limetta* (*Citrus limetta* Risso), buccia e frutto di *C. limon*) con test DPPH, hanno dato origine a colore giallo (tipica reazione che avviene durante il saggio in cui DPPH -H viene stabilizzato) in modo dipendente dalla concentrazione. L'attività *scavenging* testata con DPPH dell'estratto di bucce di *C. limetta* (*Citrus limetta* Risso) era superiore a quello di altri estratti e la sua IC_{50} era $70,08 \pm 0,93$ μ g/ml rispetto alla IC_{50} dell'acido ascorbico standard ($26,5 \pm 0,71$ μ g/ml) usato come controllo positivo. L'effetto di *scavenging* degli estratti sul radicale DPPH è aumentato in ordine con IC_{50} : bucce di *C. limetta* ($70,08 \pm 0,93$ μ g/ml) > bucce di *C. aurantium* ($86,83 \pm 1,09$ μ g/ml) > bucce di *C. limon* ($104,33 \pm 1,45$ μ g/ml) > polpa di *C. limetta* ($119,41 \pm 0,87$ μ g/ml) > polpa di *C. aurantium* ($130,06 \pm 0,96$ μ g/ml) > foglie

⁶ *Citrus*: The Genus *Citrus*, di Giovanni Dugo, Angelo Di Giacomo, serie Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles ISBN 9780415284912

di *C. aurantium* ($142,25 \pm 0,86 \mu\text{g/ml}$) > polpa di *C. limoni* ($143,33 \pm 0,88 \mu\text{g/ml}$) > foglie di *C. limetta* ($148,16 \pm 0,44 \mu\text{g/ml}$) (Muthiah et al, 2012).

Diversi autori hanno evidenziato la correlazione tra capacità antiossidante e attività biologica, anche nei riguardi del controllo del peso corporeo e delle misure antropometriche (Hossain et al, 2016; Rampersaud and Valim, 2017).

È noto che l'obesità è attribuita ad un eccessivo introito calorico, prevalentemente di grassi, che può essere controllato, attraverso l'inibizione della lipasi pancreatica. Infatti, il solo farmaco, oggi ammesso per la gestione dell'obesità è l'orlistat (tetraidrolipostatina) che sopprime l'attività delle lipasi pancreatiche riducendo la degradazione dei trigliceridi con conseguente riduzione dell'assorbimento degli acidi grassi liberi. Studi dimostrano che estratti di bucce di *Citrus spp.* agiscono, inibendo le lipasi gastriche e pancreatiche, cosiché venga inibita l'idrolisi dei trigliceridi con riduzione degli acidi grassi liberi assorbibili che invece vengono escreti con le feci Karagozlu et al, 2012).

Ding et al (2012) hanno dimostrato che somministrando estratto di buccia di *Citrus ichangensis* in ratti, per 12 settimane di trattamento, si ha diminuzione non solo dell'introito calorico attraverso una perdita di appetito, ma una significativa perdita di peso corporeo.

Da uno studio eseguito su ratti sottoposti a supplementazione nella dieta, di naringenina a diverse dosi (0,003%, 0,006% e 0,012%), per un periodo di 6 settimane è emerso, che il flavanone è in grado di ridurre le adiposità e il contenuto in trigliceridi in adipociti e regolare anche la differenziazione di questi (Cho et al, 2011). La differenziazione è un passo fondamentale nella regolazione della deposizione di grasso nei tessuti adiposi e quindi nel controllo del peso corporeo (Horiba et al, 2010): è infatti noto che l'obesità è caratterizzata da un aumento della massa del tessuto adiposo che risulta sia dall'aumento del numero di cellule adipose (iperplasia) sia dall'aumento delle dimensioni degli adipociti (ipertrofia) (Couillard et al. 2000). Il numero di adipociti presenti in un organismo è determinato in larga misura dal processo di differenziazione degli adipociti, che genera adipociti maturi da preadipociti fibroblastici che sono alla base dell'aumento di peso corporeo e responsabili della difficoltà della perdita di peso, anche in seguito a trattamento dietetico. Gli studi hanno dimostrato come, la naringenina sia in grado di controllare la differenziazione degli adipociti, in ratti (Cho et al, 2011).

1.2.3.2 Attività antiperlipidemica

Studi hanno stato evidenziato un controllo sulle iperlipidemie in seguito a somministrazione, in topi, di estratto di limone (Fukuchi et al, 2008). La supplementazione di naringina ha anche ridotto le concentrazioni elevate di lipidi plasmatici nei ratti sottoposti a dieta ad alto contenuto di grassi (Pu et al, 2012) così come dimostrato da Pu et al (2012) e nel plasma di ratti alimentati con una dieta ad alto contenuto di colesterolo (Shin et al, 1999).

Un recente studio (Mallick N, Khan RA, 2016) ha confrontato l'azione di *Citrus sinensis* (*Citrus sinensis* L. Osbeck) e atorvastatina in ratti indotti ad iperlipidemia vs animali di controllo sani, sui livelli plasmatici di colesterolo, LDL, HDL e trigliceridi (TG), dimostrando un declino molto significativo dei livelli di colesterolo, LDL e TG ad opera di *C. sinensis* somministrato a diverse dosi (2, 5 e 8 ml/kg) rispetto ai controlli iperlipidemici, che erano simili al farmaco standard atorvastatina. Tuttavia, i livelli di HDL risultavano aumentati in modo significativo con una dose di *C. sinensis* di 8 ml/kg, quasi paragonabile ad atorvastatina.

L'effetto ipolipidemico del limone è stato studiato da Rafeeq Alam Khan et al. (2010), in seguito a valutazione del profilo lipidico (colesterolo, trigliceridi, LDL e HDL) dopo

somministrazione, in ratti alimentati con una dieta ipercolesterolemica, di limone alla dose di 1 ml/kg per 30 e 45 giorni rispettivamente.

Dopo 30 giorni gli animali hanno mostrato un rilevante decremento del colesterolo con valori pari a 150 ± 19 mg/dl rispetto agli animali controllo, il cui valore era $345,3 \pm 28$ mg/dl. Mentre dopo 45 giorni è continuata la diminuzione del colesterolo e si è osservata una diminuzione molto significativa, cioè $16,9 \pm 2,8$ mg/dl rispetto al valore degli animali di controllo, vale a dire $232,6 \pm 9,0$ mg / dl. Analogamente, una diminuzione significativa della concentrazione di LDL è stata osservata dopo 30 giorni, ovvero $122,6 \pm 13$ mg/dl rispetto agli animali di controllo, vale a dire 273 ± 38 mg/dl. La diminuzione dei livelli di colesterolo e LDL persisteva anche dopo 45 giorni. Mentre la concentrazione di HDL è aumentata significativamente dopo 30 giorni, cioè $7,27 \pm 1,7$ mg/dl rispetto al controllo, cioè $3,07 \pm 0,26$ mg/dl. Tuttavia, l'aumento del livello di HDL è diventato insignificante dopo 45 giorni, cioè $2,15 \pm 0,31$ mg/dl rispetto al controllo, cioè $2,1 \pm 0,32$ mg/dl. La diminuzione dei trigliceridi era insignificante dopo 30 giorni rispetto agli animali di controllo. Tuttavia, è stata osservata una diminuzione molto significativa nei livelli di trigliceridi dopo 45 giorni, cioè $26,69 \pm 1,4$ mg / dl rispetto al controllo $40,3 \pm 3,5$ mg / dl (Khan et al, 2010).

1.2.3.3 Attività antipertensiva

Azioni biologiche sono state riscontrate anche nel controllo dell'ipertensione, in cui, l'ingestione di esperedina ha dimostrato di regolare l'espressione genica correlata alla modulazione del tono vascolare (Yamamoto et al, 2013) ed estratto acquoso di *Citrus aurantifolia* (*Citrus aurantifolia* Swingle) mostrano un'azione diretta sui muscoli cardiaci e sulla muscolatura liscia dei vasi sanguigni con conseguente vasocostrizione (Souza et al, 2011).

Studi condotti su pazienti con ipertensione di stadio I⁷, hanno dimostrato l'effetto antipertensivo del succo di *Sweetie fruit* conosciuto anche come Oroblanco (*Citrus grandis* L.×*C. paradisi* Macf.) con e senza alto contenuto di flavonoidi. Ogni paziente ha ricevuto succo di *sweetie* ad alto contenuto di flavonoidi (HF) e succo a basso contenuto di flavonoidi (LF), ciascuno per un periodo di 5 settimane. Il succo di *sweetie* HF finale aveva un contenuto pari a 677 mg/l di naringina e 212 mg/l di narirutina, rispetto a 166 mg/l (25%) e 64 mg/l (30%) nel succo finale di LF *sweetie*. Il succo finale di HF e LF aveva un contenuto simile di glucosio, potassio, esperidina (2,6 mg/l e 2,9 mg/l, rispettivamente) e neoesperidina (4 mg/l e 3 mg/l, rispettivamente). Entrambi i succhi avevano una consistenza, colore e sapore simili. Dallo studio è emerso che il succo di *sweetie* HF era più efficace del succo di *sweetie* LF nel ridurre la pressione diastolica ($P = 0,04$), mentre la pressione sistolica risultava diminuita in entrambi i gruppi; ma non vi era alcuna differenza significativa tra i soggetti trattati con *sweetie* HF rispetto a quelli dati il *sweetie* LF. In questo studio, il succo di *sweetie* HF ha mostrato di avere un significativo effetto benefico nel ridurre la pressione diastolica, rispetto all'effetto osservato con il succo di *sweetie* LF, in pazienti con ipertensione di stadio I. Questi dati suggeriscono che i principi attivi associati all'effetto antipertensivo del succo di *sweetie* sono i flavonoidi naringina e narirutina (Reshef et al, 2005). Ulteriori studi dimostrano che la supplementazione di naringina è in grado di ridurre l'ipertensione, attraverso vasodilatazione, nei ratti obesi sottoposti a dieta ad alto contenuto di carboidrati e grassi e a ratti ipertesi a rischio di ictus (Alam et al, 2013; Ikemura et al, 2012).

⁷ Secondo la classificazione dei valori tensivi secondo WHO e l'International Society of Hypertension (ISH, 1999) è definita l'ipertensione di Grado 1 (lieve) una pressione sistolica di 140-159 mmHg.

Ulteriore studio (Yo et al., 2014) ha dimostrato che il trattamento con esperidina ha significativamente migliorato la pressione arteriosa media, ridotto la pressione diastolica ventricolare sinistra e ha migliorato sia la funzione inotropa che lusitropica del cuore.

1.2.3.4 Attività antiperglicemica

Akiyama et al (2014) ha dimostrato che un trattamento dietetico con esperidina (10 g/kg) in ratti con diabete indotto, ha ridotto la glicemia e normalizzato i livelli di lipidi e di adiponectina.

Un recente studio *in vivo* condotto su estratti acquosi omogenizzati, estratti alcolici ed estratti in n-esano di buccia di *Citrus* (mandarini, arance dolci, pompelmo e lime) ha dimostrato di possedere attività ipolipidemizzante e ipoglicemizzante per tutti gli estratti trattati (Fayeka et al, 2017). La diminuzione dei livelli di colesterolo è stata osservata in estratto acquoso di buccia di mandarino e dalla sua frazione in esano (59,3% e 56,8% rispettivamente) raggiungendo lo stesso effetto del farmaco di riferimento utilizzato (54,7%) (metformina per il controllo del diabete e atorvastatina per colesterolo e trigliceridi). Per lo più, tutti i campioni riducono il triacilgliceride (del 36% -80,6%) meglio del farmaco di riferimento utilizzato (del 35%), mentre il glucosio è diminuito (del 71,1% -82,8 e 68,6% -79,6%, rispettivamente) principalmente negli omogenizzati in estrazione acquosa, ad eccezione dell'estratto di lime, e negli estratti alcolici, ad eccezione di mandarino, le bucce di agrumi hanno mostrato attività migliore del farmaco di riferimento utilizzato (del 68,3%) (Nesrin et al, 2017).

Ulteriori studi condotti sull'utilizzo della naringina ai fini del controllo glicemico, ha mostrato che questo flavanone possiede una attività inibitoria dell' α -glucosidasi con IC_{50} 0,55 μ M, 196,83 volte più attiva dell'acarbosio, ipoglicemizzante farmacologico. L'attività di inibizione è stata significativamente ridotta quando i flavonoidi di agrumi erano pre-incubati con l'amido. Il sito di legame per naringina, esperidina ed altri flavonoidi, dell' α -amilasi mostrava un numero di contatti polari, rispettivamente, di 47 e 51 per naringina ed esperidina rispettivamente, in più rispetto a quello che riguardava l'acarbosio. Questi risultati hanno permesso di stabilire la capacità dei flavonoidi di agrumi selezionati come obiettivo terapeutico per la modulazione dell'iperglicemia postprandiale (Sahnoun et al, 2017). Ulteriori studi condotti su ratti con diabete indotto da STZ hanno esplorato le attività degli enzimi implicati nei meccanismi di metabolizzazione dei carboidrati, del glicogeno epatico e il profilo lipidico lipidici, nonché sistemi enzimatici afferenti al sistema circolatorio e al pancreas, marcatori funzionali epatici e renali. La supplementazione per 45 giorni con esperidina (40 mg/kg per peso corporeo) in ratti diabetici (STZ-indotti) ha determinato un calo significativo del glucosio plasmatico e un netto miglioramento dei livelli plasmatici di insulina e glicogeno. Tutti i parametri inerenti gli enzimi metabolici implicati nel metabolismo epatico, il profilo lipidico, nonché i biomarker sierici della tossicità epatica e renale sono stati riportati a valori quasi normali alla pari delle attività fornite dal farmaco glibenclamide (1 mg/kg peso corporeo), usato come ipoglicemico orale standard (Revathy et al, 2018).

Il trattamento orale di naringina (25 mg/kg di peso corporeo) esercita una significativa inibizione dell'attività α -glucosidasi intestinale *in vivo*, ritardando l'assorbimento dei carboidrati in ratti diabetici, con conseguente abbassamento significativo dei livelli glicemici postprandiali (Priscilla et al, 2014). Naringina invece, è risultata efficace nel proteggere contro lo sviluppo della MetS attraverso il cambiamento dell'espressione di geni epatici coinvolti nel metabolismo lipidico e nella gluconeogenesi, con conseguente attivazione di più tipi di segnalazione intracellulare nei topi esposti ad una dieta ad alto contenuto di grassi (HFD) (Pu et al, 2012).

Gli effetti antidiabetici *in vivo* della naringenina possono essere mediati da AMPK, chinasi implicata nel processo di beta ossidazione degli acidi grassi, infatti, l'attivazione della chinasi aumenta la tolleranza al glucosio e la sensibilità all'insulina. Inoltre, la somministrazione di naringenina ha ridotto i livelli plasmatici di glucosio nei ratti diabetici streptozotocina (STZ) - indotti (Choi et al, 1991) e ridotto l'insulino-resistenza in topi sottoposti ad una dieta HFD (Mulvihill et al, 2009).

Un recente studio ha dichiarato che ratti diabetici sottoposti per 45 giorni ad un trattamento con naringenina (25 mg/kg di peso corporeo) hanno ridotto marcatamente i livelli di iperglicemia e iperinsulinemia, cambiamenti del profilo lipidico, diminuzione della perossidazione lipidica della membrana cellulare, potenziato le attività di antiossidanti e migliorato i marcatori di funzionalità epatica (Priscilla et al, 2014). Ulteriori studi hanno dimostrato l'attività ipoglicemica *in vitro* e *in vivo* di flavonoidi presenti in *Citrus*. Nota è anche l'attività di inibizione dell'amilasi pancreatica responsabile della digestione degli amidi introdotti con la dieta (Parmar and Kar, 2008; Shen et al, 2012).

Tuttavia, un recente studio ha dimostrato che sarebbe sconsigliata la somministrazione contemporanea di pioglitazone, agonista completo del recettore perossisoma proliferatore-attivato (PPAR γ) e utile per il trattamento del diabete mellito di tipo 2 e la naringenina. La somministrazione di naringenina (100 mg/kg) e pioglitazone (10 mg/kg) in topi Tsumura Suzuki Obese Diabetes (TSOD) per 4 settimane hanno dimostrato che la somministrazione orale di naringenina attenuava l'azione ipoglicemica di pioglitazone e che, la compresenza di entrambe le sostanze non influenzava i livelli di glicemia a digiuno, neppure il peso del cuscinetto adiposo dell'epididimo e il peso corporeo in questo periodo di somministrazione. Inoltre, pioglitazone ha soppresso l'espressione di adipochine come l'inibitore tissutale delle metalloproteinasi-1 nel tessuto adiposo dei topi TSOD, generalmente secrete dai macrofagi e responsabili della vulnerabilità della placca aterosclerotica, ma questo effetto è stato attenuato dalla naringenina. Inoltre, la naringenina non ha influenzato la farmacocinetica di pioglitazone dopo somministrazione singola o ripetuta ma ha mostrato lievi attività agoniste (Yoshida et al, 2017).

1.2.3.5 Proprietà antitumorali

Gli studi pre-clinici e clinici nel campo della chemioprevenzione hanno fornito molti dati preziosi per prevenire l'insorgenza della malattia e per sopprimere la crescita delle cellule cancerose. L'estratto etanolic di *C. reticulata* (*Citrus reticulata* Blanco) e *C. aurantiifolia* (*Citrus aurantifolia* Swingle) ha mostrato effetti anticancerogeni, antiproliferativi, co-chemioterapici ed estrogenici. È stato dimostrato che esperidina, naringenina e naringina, possiedono un'attività di inibizione sulla crescita di alcune cellule tumorali attraverso vari meccanismi e di avere un effetto promettente in combinazione con diversi agenti chemioterapici contro la crescita delle cellule tumorali. Alcuni meccanismi coinvolti in queste attività riguardano la modulazione del ciclo cellulare, l'effetto antiangiogenico e l'induzione dell'apoptosi (Meiyanto et al, 2012). Gli studi sono stati confermati anche da altri autori (Benavente-García and Castillo, 2008).

Un recentissimo studio ha dimostrato che estratti di buccia di agrumi alle diluizioni di 1/200-1/500 sull'attività dei fattori di trascrizione correlati allo stress ossidativo, tra cui AP-1, NF-KB, NRF2, p53 e STAT3, su HCT116 (human colon cancer cells) ha mostrato di possedere una capacità di sopprimere lo stress ossidativo cellulare attraverso l'induzione di NRF2, impedendo in tal modo la carcinogenesi del colon indotta da azoxymethane (Onuma et al, 2017).

1.2.3.6 Attività antimicrobica

L'attività antimicrobica è stata esaminata da Kumar et al., eseguendo un'analisi fitochimica degli agrumi e valutando la possibilità di utilizzare rifiuti derivanti dagli agrumi stessi. L'efficacia antibatterica è stata analizzata mediante cinque diversi estratti (da acetato di etile, acetone, etanolo, etere di petrolio e acqua) ottenuti con estrattore di soxhlet da bucce di due tipi di agrumi (*C. sinensis* e *C. limon*). Gli estratti sono stati poi sottoposti a screening contro cinque batteri patogeni *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella typhi*. La più alta potenzialità antibatterica è stata evidenziata dall'estratto da acetone di buccia di *Citrus sinensis* seguita dall'estratto da acetato di buccia di *Citrus limon*. L'estratto di buccia di *Citrus sinensis* e *Citrus limon* possono essere considerato altrettanto potenti come gli antibiotici quali la metacillina e la penicillina (Kumar et al, 2011).

Nannapaneni et al (2008), hanno riportato l'attività antimicrobica degli estratti naturali a base di agrumi commerciali contro *Escherichia coli* e su ceppi mutanti. In particolare sette oli essenziali di agrumi sono stati utilizzati in questo studio. Tutti gli oli essenziali sono stati valutati per le attività antimicrobiche contro *Escherichia coli*. Il limonene (frazione C7) è stato il più attivo verso i ceppi *E. coli* (Nannapaneni et al, 2008). Nengguo et al (2010) si sono occupati di valutare l'azione dei carotenoidi estratti dalla buccia di Shatian Pummelo (*Citrus grandis osbeck*) e della loro attività antimicrobica nei confronti di *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus oryzae* e *Saccharomyces cerevisiae*. I risultati hanno mostrato che le condizioni ottimali di estrazione erano a una temperatura di 50 °C, con un rapporto solvente-olio di 10: 1 e per una durata di 40 min. L'estratto presenta un ampio spettro di attività antimicrobiche contro *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, e *Rhizopus oryzae* con zone di inibizione che vanno da 8,97 mm a 19,47 mm e il MIC da 18,75 µg/ml a 140 µg / ml. Tuttavia, non ha mostrato alcun effetto inibitorio su *A. niger*, *A. flavus* e *P. chrysogenum*.

L'attività antimicotica e la composizione chimica dell'olio essenziale *Citrus reticulata* Blanco (Chutia et al, 2009) contro i fitopatogeni provenienti dall'India del Nord Est è stato descritto da Chutia et al. L'olio essenziale (EO) isolato dall'idrodistillazione della buccia di frutti maturi completamente maturati di *Citrus reticulata* Blanco, è stato analizzato mediante GC e GC-MS. Circa trentasei componenti sono stati identificati che costituiscono circa il 99% dell'olio. I principali componenti sono stati il limonene (46,7%), il geraniale (19,0%), il nerale (14,5%), il geranilacetato (3,9%), il geraniolo (3,5%), il b-caryophyllene (2,6%), il nerolo (2,3%), acetato (1,1%) ecc.

Autori hanno riportato l'attività antifungina dell'estratto acquoso di buccia di frutta di *Citrus sinensis*. I costituenti fitochimici presenti nell'estratto della buccia di frutta includono flavonoidi, saponine, alcaloidi. I risultati dell'attività antimicrobica degli estratti di frutta hanno mostrato l'attività più elevata (diametro della zona di inibizione di 180 mm) per gli estratti acquosi di buccia *Citrus sinensis* contro *Salmonella typhi* A mentre l'attività più bassa (diametro della zona di inibizione di 10mm) contro *Salmonella typhi* (Kumar et al, 2010)

1.3 Storia tassonomica *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. et Nakai

Il *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. et Nakai, 1916 appartiene alla famiglia delle *Cucurbitaceae* (*Cucurbitaceae* Juss.), Angiosperme appartenenti all'ordine *Violales* (*Cucurbitales* secondo la classificazione APG III) che comprende circa 118 generi e 825 specie (Lebeda et al, 2007).

Cucurbitaceae Juss., è una famiglia moderatamente grande di piante da fiore (Yamaguchi, 1983) dicotiledone, distribuita ampiamente in tutto il mondo. Storicamente, la sua prima raccolta è stata documentata 5000 anni fa in Egitto e in seguito si diffuse in altre parti del mondo, attualmente, la Cina è il primo produttore seguita da Turchia, Stati Uniti, Iran e Repubblica della Corea (Zohary and Hopf, 2000; Lucier and Lin, 2001).

Circa tre generi appartenenti alla famiglia delle *Cucurbitaceae* portano il nome comune di “melone”: *Cucumis*, *Citrullus* e *Cucumeropsis* e, all'interno di questa famiglia, i generi *Cucumis*, *Cucurbita* e *Citrullus* sono quelli considerati di grande importanza economica (Uluturk et al, 2011). *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. et Nakai è un membro della sottofamiglia *Cucurbitoidae*, tribù *Benincaseae*, sottotribù *Benincasinae* (Dane and Liu (2007), e ha quattro specie diploidi ($2n = 22$) che vengono coltivate in Africa, Asia e nel Mediterraneo (Levi et al, 2001 e si compone di due varietà di cocomeri: *C. lanatus* var. *lanatus* e *C. lanatus* var. *citroides* (Bailey) Mansf.

1.3.1 Caratteristiche botaniche *Citrullus lanatus*

Citrullus lanatus Thunb. è una pianta erbacea annuale, rampicante e poco legnosa. I fasci vascolari di solito sono bicollaterali, spesso disposti ad anelli concentrici.

Le foglie alterne e spirali, sono erbacee ma rigide, spesso palmate – lobate più o meno serrate con parecchie nervature che penetrano nel dente stesso e terminano in un apice ghiandolare espanso, palminervie. Le dimensioni oscillano tra i 60-200 mm di lunghezza e 40-150 mm di larghezza.

Le infiorescenze sono spesso ridotte ad un singolo fiore ascellare.

Le parti giovani sono densamente lanose con peli dal colore giallo – bluastro, mentre le più vecchie sono glabre.

I fiori di solito sono unisessuali, le piante sono monoiche o dioiche, normalmente actinomorfi con ipanzio corto o allungato, spesso aperto per un solo giorno. I sepali, generalmente, 5, di solito sono connati (calice gamosepalo) e ridotti, mentre i petali, anch'essi 5, connati a formare una corolla campanulata con uno stretto tubo e lobi svasati, quasi appuntiti, bianchi, gialli ed arancione. I fiori maschili compaiono per primi e superano in numero quelli femminili in un rapporto di 7:1, l'impollinazione è entomofila (api) e l'allogamia è la regola, dopo 40-50 giorni dalla fecondazione i frutti raggiungono la maturazione.

Il frutto allo stato selvatico e di forma subglobosa, indeiscente e fino a 200 mm di diametro, con un gambo lungo fino a 50 mm (Oyolu, 1977; Fursa, 1981; Maynard, 2001; Van der Vossen et al, 2004; Sheikh et al, 2013), è una peponide il cui epicarpo, mesocarpo ed endocarpo sono saldati insieme, in esso si distingue la “buccia”, esternamente liscia e coriacea, e la “polpa” che riempie totalmente il frutto e nella quale sono immersi numerosi semi appiattiti, del peso di 35-100 mg, di colore dal giallo al marrone o neri, raramente bianchi (Jackson, 1990).

1.3.2 Componente fitochimica in *Citrullus lanatus* (Thunb.)

Negli ultimi anni, i consumatori sempre più consapevoli che per prevenire malattie alimentari correlate, come ipertensione, diabete, cancro, malattie cardiovascolari, obesità, è necessario una forte richiesta di frutta e di alta qualità (Choudhary et al, 2015). Tanto è scritto sui vegetali e sui frutti, non tantissimo sull'anguria le cui caratteristiche nutrizionali variano in base alle diverse cultivar e genotipi, dall'area di campionamento e dalle fasi di maturazione dei frutti (Tlili et al, 2011).

Il *C. lanatus* (Thunb.) è oggetto di studi scientifici per via del suo contenuto in polifenoli, e flavonoidi totali, licopene e relativa attività antiossidante, ma soprattutto perché una interessante fonte di citrullina (Liu et al, 2010).

Il licopene è un pigmento carotenoido rosso, presente in natura in molti vegetali, studiato per più di 70 anni e con oltre 2000 articoli pubblicati su riviste *peer-reviewed* e altre 4000 pubblicazioni (scientifico e non) sono state scritte sull'argomento (Story et al, 2010).

La formula chimica del licopene è $C_{40}H_{56}$, possiede: 11 doppi legami coniugati e 2 non che consentono un'estesa isomerizzazione, con conseguente 1056 configurazioni teoriche *cis-trans* (Nguyen et al, 1944). Solo pochi isomeri sono effettivamente rinvenuti in natura, e la configurazione *all-trans* è l'isomero più comune trovato negli alimenti (Nguyen and Schwartz, 2000) mentre, da indagini sulle stabilità termodinamiche, è l'isomero *5-cis* il più stabile seguito da tutti i *trans*, *9-cis*, *13-cis*, *15-cis*, *7-cis* e *11-cis* (Chasse et al, 2001) (Fig. 2). Il colore è direttamente correlato alla sua forma isomerica: infatti, l'isomero *all trans* e la maggior parte degli altri isomeri del licopene sono rossi, mentre il composto tetra-*cis* -licopene possiede una tonalità arancione (Nguyen and Schwartz, 2000).

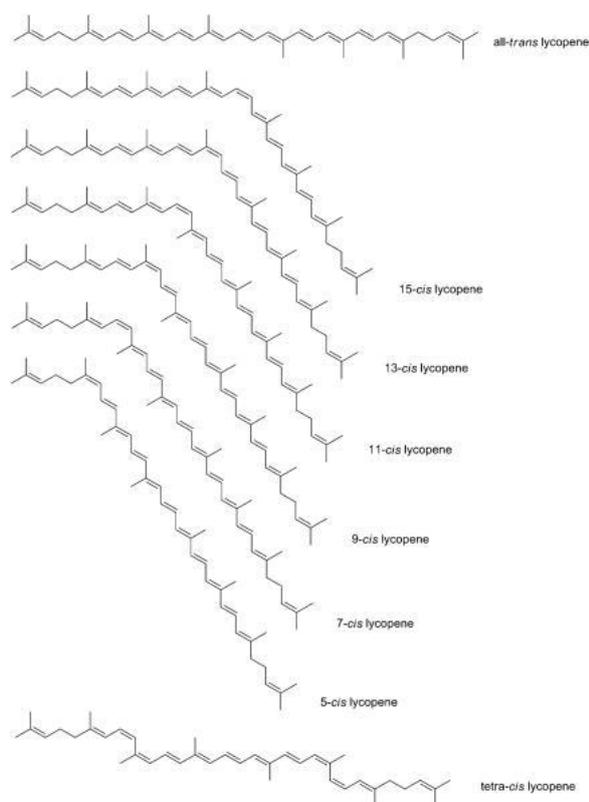


Fig. 2 Struttura licopene e diversi isomeri

L'apporto dietetico di licopene varia molto a seconda della popolazione studiata, secondo uno studio italiano, gli abitanti del nostro Paese, consumano in media 14,3 mg/die di carotenoidi totali (Lucarini et al, 2006). Il licopene costituisce la maggior parte dei carotenoidi nella dieta italiana, con un'assunzione media di 7,4 mg/die (Lucarini et al., 2006), mentre, negli USA varia da 6,6-10,5 mg/die per gli uomini e da 5,7-10,4 mg/die per le donne (Porrini and Riso 2005). L'assunzione giornaliera media di licopene è di 1,1 mg/die nel Regno Unito, 1,6 mg/die in Spagna, 3,8 mg/die in Australia, 4,8 mg/die in Francia e 4,9 mg/die nei Paesi Bassi (Porrini and Riso 2005).

La biodisponibilità può essere influenzata dalla trasformazione del cibo e dalla composizione della dieta. Nel primo caso, si deve tenere presente che le tecniche di lavorazione e l'immagazzinamento improprio, come l'esposizione alla luce, all'ossigeno o a fonti di calore, possono alterare il rapporto degli isomeri licopene e degradare completamente le molecole rendendo i prodotti alimentari meno desiderabili per il consumatore (Xianquan et al, 2005; Nguyen et al, 1998). Secondariamente, dato che il licopene è un composto liposolubile, l'assunzione di una fonte lipidica durante il pasto, ne aumenta la sua biodisponibilità. Uno studio di Unlu et al. (2005) ha dimostrato che il consumo di salsa di pomodoro con avocado (come fonte lipidica) ha portato ad un aumento di 4,4 volte l'assorbimento del licopene rispetto alla salsa senza avocado (Unlu et al, 2005). Agli autori hanno indagato sull'assorbimento del licopene dopo somministrazione di diversi volumi di succo di pomodoro (da 10 mg a 120 mg di licopene), a cui è stata aggiunta una percentuale costante di grassi, dimostrando che, indipendentemente dalla dose, il licopene assorbito era compreso tra 1,8 mg e 14,3 mg, con una media di 4,7 mg. Inoltre, la quantità di licopene assorbita dagli uomini che consumano succo contenente 120 mg di licopene non è risultata significativamente diversa da quella assorbita dagli uomini che consumano succo contenente 10 mg di licopene. Questi autori hanno suggerito che le differenze interindividuali, non la dose, hanno il maggiore impatto sulla quantità di licopene assorbita (Diwadkar-Navsariwala et al, 2003).

Gli isomeri di licopene sono assorbiti a livello intestinale e rinvenibili nel plasma, nel latte materno e nei tessuti umani e sono principalmente isomeri di tipo *cis* (Hadley et al, 2003; Ferruzzi et al, 2001).

Una volta ingerito, il licopene deve essere prima rilasciato dalla matrice alimentare per essere successivamente incorporato in micelle miste (Fig. 3). Le micelle contengono sali biliari, colesterolo e acidi grassi provenienti dal pasto, e la natura anfifilica della struttura micellare aiuta a mantenere solubili i nutrienti lipofili nella digesta acquosa (During and Harrison, 2004).

Le micelle si avvicinano agli enterociti e il licopene si diffonde passivamente attraverso la membrana apicale (During and Harrison 2004). Storicamente, i ricercatori ritenevano che il licopene fosse assorbito per diffusione passiva come i lipidi (Furr and Clark, 1997), e si ritiene ancora oggi che questo, sia almeno parzialmente vero. Tuttavia, diversi autori hanno scoperto che l'assorbimento del licopene può essere facilitato da un trasportatore della membrana del colesterolo noto come *scavenger receptor class B type I* (SR-BI) (During et al, 2005; Moussa et al, 2008).

Una volta all'interno dell'enterocita, il licopene e lipidi vengono racchiusi in chilomicroni e trasportati attraverso la membrana basolaterale per poi essere riversati nel sistema linfatico (During and Harrison, 2004).

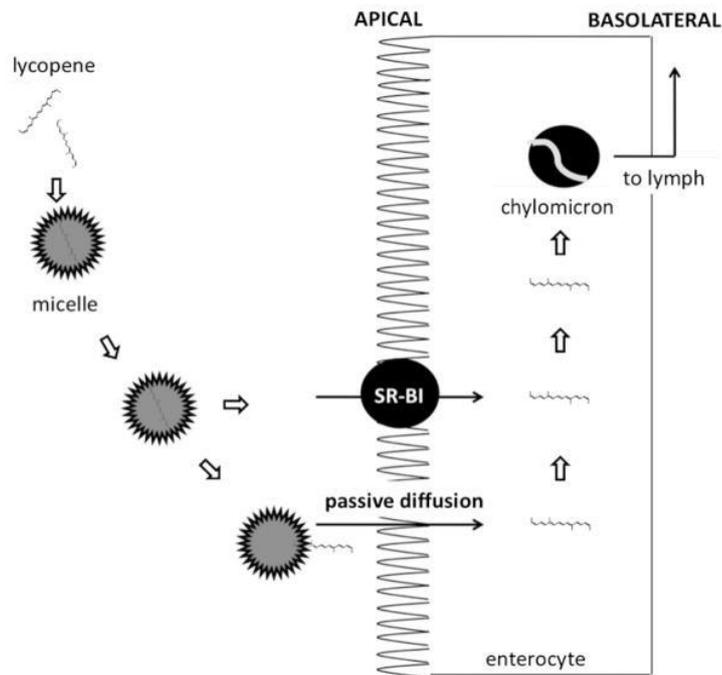


Fig. 3 Digestione e assorbimento di licopene nel piccolo intestino. Fonte Story et al, 2010

La L-citrullina è un aminoacido naturale non proteogenico il cui nome deriva dal *Citrullus vulgaris* (Wada, 1930) e nei mammiferi serve come precursore della L-arginina. Sono tantissimi gli studi condotti sull'arginina (2-amino-5-acido guanidinovaleico) e sul suo metabolismo da oramai oltre 100 anni. Una interessante rassegna sulla storia dell'arginina che chiarisce non solo il suo percorso quanto il suo metabolismo, è stata ampiamente trattata nella *review* di Wu and Morris, (1998). L'arginina è un prodotto implicato nel metabolismo che porta alla formazione dell'ornitina e dell'urea, identificata, nel fegato ed implicata nel ciclo di Krebs e Henseleit. Secondo i dati riportati da Wu G. and Morris S.M. (1998) l'arginina, necessaria per la sintesi della creatina, precursore della creatinina e indicatore di funzionalità renale e, sotto l'aspetto dietetico, si è ritenuto che, la sua assunzione rappresentasse, anche, un fattore di crescita per il pulcino, per l'ottimale crescita del ratto giovane ma non per il ratto adulto, definendo l'arginina come un aminoacido essenziale i giovani mammiferi in crescita. Le fonti di arginina possono essere di diversa provenienza, esogena, con la dieta (fonte animale o vegetale), o endogena dal metabolismo della citrullina. La glutammina e il glutammato sono catabolizzati dall'intestino tenue (Windmueller and Spaeth, 1975; Stoll, B., et al. 1998, Matthews, D. E., et al. 1993) a livello dell'enterocita (Wu, 1997), e fungono da principali precursori per la sintesi intestinale di arginina o citrullina (Wu, G. 1997, Wu, 1998). Negli anni '80, Windmueller e Spaeth (Windmueller, H. G. and Spaeth, A. E. 1981) hanno riportato che l'intestino tenue è la principale fonte di citrullina circolante per la sintesi endogena di arginina nel ratto adulto e che, la citrullina provenisse da glutammina/glutammato attraverso L- Δ^1 -pirrolina-5-carbossilato (P5C) sintetasi (Wakabayashi and Jones, 1983, Wakabayashi et al, 1991) Oltre alla glutammina e al glutammato, la prolina è anche un importante precursore per la sintesi intestinale di citrullina e arginina (Wu, 1997). Studi dimostrano che, alla nascita, l'intestino tenue è il sito principale della sintesi dell'arginina totale, (Wu and Morris, 1998) ma gradualmente diventa il sito principale della produzione di citrullina in seguito all'aumento di espressione dell'arginasi intestinale (Hurwitz and Kretchmer 1986; De

Jonge et al 1998). Questa transizione è compensata dalla capacità gradualmente crescente del rene di sintetizzare l'arginina dalla citrullina (Wakabayashi and Jones, 1983).

Il *pathway* dell'arginina, nei mammiferi, può avvenire attraverso la P5C sintetasi e la prolina ossidasi (Fig. 4) (Wu et al. 1997). Alcuni degli enzimi in questo percorso sono presenti in alcune cellule e non in altre, infatti, glutaminasi fosfato-dipendente, ornitina aminotransferasi (OAT), argininosuccinato sintasi (ASS), argininosuccinato liasi (ASL) e aspartato aminotransferasi sono ampiamente distribuiti nei tessuti animali (Wu et al., 1997, Curthoys and Watford 1995), mentre carbamoyl-phosphate synthase I CPS I, ornitina carbamoiltransferasi (OCT) e N-acetilglutammato sintasi sono limitati al fegato e alla mucosa intestinale (Wu and Morris, 1998):

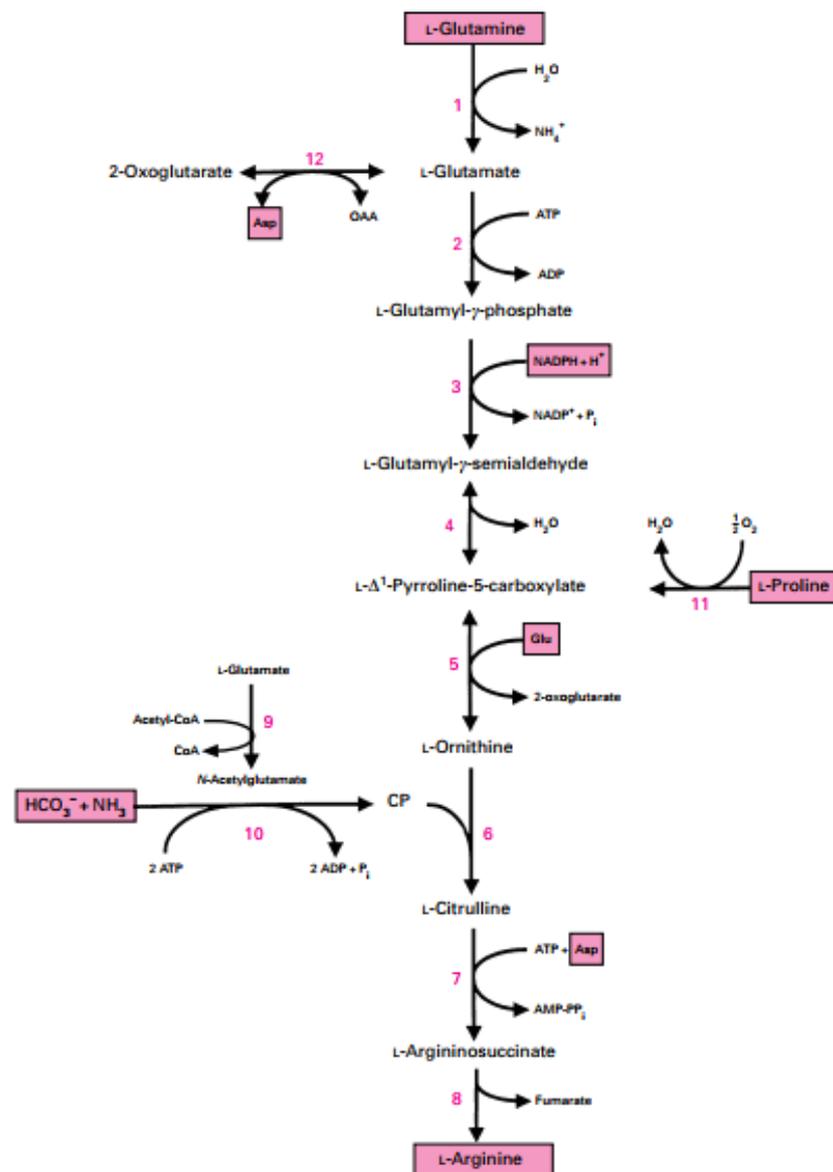


Fig. 4 Enzimi che catalizzano le reazioni indicate sono: 1, glutaminasi fosfato-dipendente; 2 e 3, P5C sintetasi; 5, ornitina aminotransferasi (OAT); 6, ornithine carbamoyltransferase (OCT); 7, argininosuccinato sintasi; 8, argininosuccinato liasi; 9, N-acetilglutammato sintasi; 10, carbamoil-fosfato sintasi I (CPS I); 11, prolina-ossidasi; 12, aspartato aminotransferasi. Il passaggio 4 è spontaneo reazione non enzimatica. Fonte Wu and Morris, 1998

L'espressione differenziale dei vari enzimi ha portato a funzioni metaboliche altamente compartimentate di diversi organi, mentre, il percorso completo per la sintesi di arginina si trova solo nell'intestino tenue dei neonati; nei suini, tuttavia, il percorso completo è presente anche negli animali svezzati. Negli adulti, la maggior parte della sintesi di arginina endogena coinvolge un *pathway* interorgano (noto anche come asse intestinale-renale), e in cui, il piccolo intestino, rilascia la citrullina nella circolazione del sangue che viene convertita in arginina, nei reni (Lau et al, 2000). Studi, hanno dimostrato che, approssimativamente il 60% della sintesi netta di arginina nei mammiferi adulti si verifica nel rene (Dhanakoti et al. 1990, Lau et al, 1990), dove la citrullina viene estratta dal sangue e convertita in arginina mediante l'azione di ASS e ASL che sono localizzati all'interno del tubulo prossimale contorto del nefrone (Morris et al. 1991, Dhanakoti et al, 1992). Questo spiegherebbe perché, i soggetti con insufficienza renale cronica presentano elevati livelli plasmatici di citrullina (Tizianello et al, 1980; Reddy et al, 2015). Sorprendentemente, tuttavia, in questi pazienti c'è una diminuzione minima o nulla dell'arginina plasmatica. La base per il mantenimento dell'arginina plasmatica a livelli normali o quasi normali è sconosciuta, ma probabilmente implica una combinazione di fattori (Reyes et al, 1994), compreso un aumento del rilascio di arginina per catabolismo proteico nel muscolo scheletrico, aumento della sintesi di arginina nei siti extrarenali, ipertrofia di tubuli prossimali, iperfiltrazione (che aumenta la quantità di citrullina filtrato per nefrone) e un aumento del tasso di sintesi di arginina a causa di elevati livelli plasmatici di citrullina. L'ultimo punto consegue dalla constatazione che i tassi di sintesi dell'arginina renale sono essenzialmente una funzione dei livelli plasmatici di citrullina (Dhanakoti et al, 1990).

Furchgott e Zawadski (Furchgott and Zawadski, 1980) definirono l'arginina implicata nel rilassamento della muscolatura arteriosa e nella produzione del nitrossido (NO) endogeno. NO è stato identificato come l'intermedio biologicamente attivo nei macrofagi e nelle cellule endoteliali, del *pathway* dell'arginina (nitrito + nitrato) (Marletta et al, 1988) ritenuta indispensabile per regolare la vasodilatazione, le risposte immunitarie, la neurotrasmissione e l'adesione di piastrine e leucociti (Bredt and Snyder, 1994; Moncada and Higgs, 1995).

NO derivato dall'endotelio (EDNO) regola il tono arterioso attraverso un'azione dilatatrice su cellule muscolari lisce vascolari che dipende dall'attivazione solubile della guanilylciclasa e dal conseguente aumento della 3' 5' - guanosina monofosfato (cGMP), e per questo motivo, è oggi ritenuto il più importante mediatore della vasodilatazione endotelio-mediata (Palmer et al, 1987; Ignarro et al, 1987) la cui riduzione risulta essere la causa ad oggi più studiata tra quelle che precedono lo sviluppo clinico dell'aterosclerosi e che contribuiscono alla progressione della malattia.

1.3.3 Proprietà medicinali ed utilizzi terapeutici

Citrullus lanatus Thunb. contiene circa il 6% di zucchero e il 92% acqua in peso. Come con molti altri frutti, è un fonte di vitamina C. La composizione di anguria per 100 g edibile porzione (50-70% del frutto maturo) include: acqua 91,5 g, energia 134 kJ (32 kcal), proteine 0,6 g, grassi 0,4 g, carboidrati 7,2 g, calcio 8 mg, Fosforo 9 mg, ferro 0,17 mg, tiamina 0,08 mg, riboflavina 0,02 mg, niacina 0,2 mg, folato 2 mg e acido ascorbico 9,6 mg (USDA, 2002).

L'anguria è una ricca fonte naturale di licopene, carotenoide di grande interesse a causa della sua capacità antiossidante e per i potenziali benefici per la salute e ampiamente utilizzato nella medicina popolare (Aruna et al, 2014a; Aruna et al, 2014b; Oyolu, 1977).

Le foglie di *Citrullus lanatus* sono utilizzate per le proprietà antinfiammatorie, analgesiche, e data l'attività antimicrobica, per curare la gonorrea (Thirunavukkarasu et al, 2010; Rahman et

al, 2013). È noto anche che le piante di *Citrullus spp.* contengono composti dalle moltitudini di attività biologiche riconosciute come triterpeni, steroli, cucurbitacina e alcaloidi (Yuan et al, 2006; Hassan et al, 2011).

I semi marroni piatti sono utilizzati in ambito popolare come fonte proteica per via dell'alto valore biologico riconosciutogli nonché per il buon gusto di nocciola, e per le significative quantità di vitamina C, minerali, grassi, amido e riboflavina. A volte è usato nel trattamento di infezioni del tratto urinario (Grieve and Leyel 1984; Moerman, 1998). Le sostanze grasse contenute nel seme, così come estratti acquosi o alcolici, erano stati segnalate per essere in grado di eliminare tenie e nematodi (Chopra, 1958).

Da dati etnobotanici emerge che il *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. et Nakai subsp. *lanatus* var. *citroides* (Bailey) Mansf. Ex Greb. (melone selvatico) è consumato per curare la febbre quando utilizzato a piena maturazione o quasi putrido (Grieve and Leyel, 1984).

Il frutto è anche diuretico (Grieve and Leyel 1984) ed è efficace nel trattamento dell'ernia e della litiasi renale (Chiej, 1984). La buccia del frutto è prescritta in casi di intossicazione alcolica e diabete (Erhirhie and Ekene, 2014). *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. et Nakai è usato in Sudan del Nord per ustioni, gonfiori, reumatismi, gotta e come lassativo (Schippers, 2002).

La radice ha attività purgante e in dose elevata può anche servire come emetico (Grieve and Leyel, 1984).

1.3.3.1 Attività antiperglicemica

Il potenziale antidiabetico dell'anguria (*Citrullus vulgaris* Schrad) è stato valutato in diversi studi *in vivo*. Topi *Imprinting Control Region* (ICR) sono stati nutriti con una dieta sperimentale che conteneva il 10% di polpa di anguria in polvere (WM-P), una che conteneva 1% di estratto in etanolo dalla buccia (WM-E) e una dieta di controllo priva di ogni supplementazione. Alla fine delle 4 settimane, ai topi è stato indotto diabete con STZ (40 mg/kg, somministrazione intraperitoneale p.i.) dopo somministrazione per 5 giorni consecutivi. La supplementazione con WM-E ha mostrato, in modo significativo, la riduzione dei livelli di glucosio nel sangue e l'aumento dei livelli di insulina nel siero. Mentre, la supplementazione con WM-P ha anche indotto cambiamenti moderati, ma non in modo statisticamente significativi (Jiyun et al, 2011).

Un ulteriore studio *in vivo* effettuato su 15 ratti albinici maschi sottoposti ad un protocollo che prevedeva: nello stadio I, tutti gli animali sono stati alimentati con una dieta normocalorica. Dopo 1 settimana, 5 animali sono stati selezionati e sacrificati per analisi biochimiche per formare il gruppo di controllo non diabetico. Gli animali rimanenti sono stati tenuti a digiuno per 24 ore prima di essere iniettati peritonealmente con una soluzione preparata di alloxan ad un dosaggio di 35 mg/kg di peso corporeo. 5 ratti su 10, sono stati sacrificati come gruppo diabetico mentre gli ultimi cinque animali sono stati nutriti con succo di melone per un'ulteriore settimana.

I risultati delle analisi biochimiche hanno mostrato un aumento significativo della concentrazione del livello di glucosio nel sangue dopo il trattamento con alloxan, indice del diabete indotto: mentre, il succo di anguria ha portato ad ipoglicemia e aumenti delle attività di inibizione di come glutazione (GSH), glutazione perossidasi (GPx), catalasi e SOD% con una concentrazione malondialdeide (MDA) ridotta dopo i trattamenti (Oseni et al, 2015; Kolawole et al, 2016).

1.3.3.2 Attività antiperlipidemica

La lipasi pancreatica (PL) è un enzima, secreto dal pancreas e svolge un ruolo eccellente nell'assorbimento dei trigliceridi nell'intestino tenue. Gli inibitori della lipasi pancreatica sono considerati un prezioso agente terapeutico per il trattamento dell'obesità indotta dalla dieta (Lowe M., 2002; Sugiyama et al, 2007).

Oggigiorno è necessario ora aggiornare le conoscenze sulle numerose fonti naturali che potrebbero agire da inibitori del PL per poterle esaminare come nuovi potenziali agenti terapeutici antiobesità con bassi effetti secondari.

1.3.3.3 Attività antipertensiva

Come ampiamente trattato, l'anguria contiene L-citrullina e questo contribuisce a migliorare la funzione vascolare attraverso una maggiore biodisponibilità di L-arginina e sintesi di ossido nitrico. Recenti studi hanno dimostrato che l'integrazione cronica di L-citrullina aumenta la sintesi di ossido nitrico, diminuisce la pressione sanguigna e può aumentare il flusso sanguigno periferico. Questi cambiamenti sono accompagnati da miglioramenti nell'ossigenazione e prestazione dei muscoli scheletrici durante l'esercizio di resistenza e pertanto, altamente consigliato per le performance sportive. L'effetto antipertensivo della supplementazione di L-citrullina/anguria è evidente negli adulti con preipertensione o ipertensione, ma non in normotesi. Tuttavia, l'integrazione di L-citrullina può attenuare la risposta della pressione arteriosa all'esercizio in uomini normotesi (Wood, 2008; Figueroa et al, 2012; Figueroa et al, 2014; Figueroa et al, 2017).

La somministrazione di L-arginina ha migliorato la vasodilatazione endotelio-dipendente in una serie di studi clinici sull'uomo con ipercolesterolemia e aterosclerosi (Quyyumi et al, 1997; Lerman et al, 1998). Tuttavia, solo alcuni studi hanno esaminato l'effetto della L-arginina sulla funzione specifica vasomotoria legata all'ipertensione e i risultati sono stati contrastanti.

Uno studio condotto in 14 soggetti con pressione sanguigna elevata, in cui è stata infusa L-arginina non ha indotto cambiamenti sul flusso sanguigno (Panza et al, 1993). Al contrario, la somministrazione orale di 6 g di L-arginina ha migliorato in modo significativo la dilatazione flusso-mediata dell'arteria brachiale in pazienti con ipertensione essenziale, ma le risposte non sono state associate a diminuzione della pressione arteriosa (Lekakis et al, 2002). In una relazione su pazienti con ipertensione lieve-moderata di nuova diagnosi, L-arginina orale (2 g t.i.d.) ha ridotto la pressione arteriosa e migliorato la funzione endoteliale dopo 1 settimana di trattamento (Pagnotta et al, 1997).

Nei pazienti con ipertensione lieve, l'infusione di L-arginina (500 mg/kg per 30 min) ha ridotto la pressione arteriosa media dell'8% e ha ridotto la resistenza renovascolare (Higashi et al, 1995). Al contrario, L-arginina non induce ipotensione negli adulti con ipertensione maligna accelerata, suggerendo che durata della malattia, gravità e il grado sottostante di disfunzione endoteliale può essere un fattore importante nella risposta al trattamento (Sato et al, 2000).

Gli effetti emodinamici della L-arginina sono evidenti anche nei soggetti normali, che presentano una riduzione dose-dipendente della pressione arteriosa con dosi crescenti fino a 30 g di L-arginina (Bode-Boger et al, 1998). Negli adulti normotesi, una infusione di 30-min di L-arginina (500 mg/kg) ha ridotto la pressione arteriosa media del 9% (Mehta et al, 1996).

Carenze di L-arginina, sono state osservate in pazienti diabetici, spesso, associati ad incremento della produzione di Dimetil-L-Arginina Asimmetrica (ADMA) (Ito et al, 1999), un inibitore endogeno dell'Ossido Nitrico sintetasi endoteliale (NOS), associato a disfunzione endoteliale, vasocostrizione periferica, iperglicemia, iperomocisteinemia, iperlipidemia,

ipertensione arteriosa, ipertensione polmonare e scompenso cardiaco acuto sia in esperimenti *in vivo* su uomo e animale che *in vitro* (Atamer et al, 2012).

Il ruolo dell'ADMA nella patogenesi dell'ipertensione clinica non è stato completamente esaminato, sebbene vi siano suggerimenti che elevate concentrazioni fisiologiche possano essere collegate a azioni pressorie sistemiche. Nei modelli animali, la somministrazione acuta di ADMA aumenta la resistenza periferica e aumenta la pressione sanguigna sistemica che viene invertita dalla L-arginina (Matsuoka et al, 1997).

Oltre all'ADMA, dati sperimentali dimostrano che l'insulina media la dilatazione vascolare e modula il tono vascolare attraverso meccanismi NO-dipendenti (Scherrer et al, 1994; Steinberg et al, 1994).

L'insulino-resistenza è una caratteristica comune dell'ipertensione e la vasodilatazione mediata dall'insulina è compromessa in tali pazienti (Ferrannini et al, 1987). Le anomalie nel metabolismo del glucosio, dell'insulina e delle lipoproteine sono comuni nell'ipertensione e per questo rappresentano, un meccanismo fisiopatologico (Grundy et al, 2004) di notevole interesse. Esistono anche prove che suggeriscono che la supplementazione di L-arginina può offrire una sinergia con le modalità di trattamento esistenti nei pazienti con insulino-resistenza. In uno studio su 10 pazienti diabetici non insulino-dipendenti di nuova diagnosi con lieve iperglicemia, infusione di L-arginina (1 g/min per 30 min) sollevata insulina plasmatica e ha causato una riduzione del 6% della pressione arteriosa sistemica (Marfella, et al, 1996) il trattamento con metformina per 8 settimane ha amplificato l'effetto ipotensivo della L-arginina ma non ha influenzato il digiuno o le concentrazioni di insulina stimolate, supportando la proposta che la metformina aumenta la sensibilità ai cambiamenti emodinamici indotti da L-arginina. Il trattamento con metformina è anche associato a diminuzioni della concentrazione di ADMA e ad aumenti favorevoli dell'L-arginina: rapporto ADMA (Asagami et al, 2002).

Recenti studi hanno dimostrato che l'integrazione cronica di L-citrullina aumenta la sintesi di ossido nitrico, diminuisce la pressione sanguigna e può aumentare il flusso sanguigno periferico. Questi cambiamenti sono accompagnati da miglioramenti nell'ossigenazione e prestazione dei muscoli scheletrici durante l'esercizio di resistenza. L'effetto antipertensivo della supplementazione di L-citrullina/ anguria è evidente negli adulti con preipertensione o ipertensione, ma non in normotesi. Tuttavia, l'integrazione di L-citrullina può attenuare la risposta della pressione arteriosa all'esercizio in uomini normotesi (Figueroa et al, 2017).

1.3.3.4 Attività antibatterica

L'attività antimicrobica di estratti in cloroformio di gambi, frutti e semi di *Citrullus lanatus* var. *citroides*, è stata testata contro i batteri (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Proteus vulgaris*) e funghi (*Aspergillus niger* e *Candida albicans*). L'analisi dei dati ha rivelato che, l'estratto del frutto ha mostrato massima attività antibatterica con valutazione su piastra pari a: *S. aureus*: 36 mm, *B. subtilis*; 38 mm, *E. coli*; 37 mm, *P. vulgaris*; 23 mm e *P. aeruginosa*; 19 mm. I risultati sono stati confrontati in concomitanza con farmaci standard; clotrimazolo e gentamicina. Sulla base dei risultati attuali, si è concluso che *Citrullus lanatus* var. *citroides* ha un'attività antimicrobica, che è potente come farmaci antimicrobici standard contro il selezionato microrganismi (Hassan et al, 2011).

Diversi studi riconoscono l'attività antimicrobica principalmente ai semi rispetto alle altre parti della pianta (Dash and Ghosh, 2017; Babaiwa et al, 2017).

1.3.3.5 Attività anticarcinogenica

Studi hanno dimostrato che estratto metanolico di semi di *Citrullus lanatus* ha attività protettiva nei riguardi dell'iperplasia prostatica benigna, indotta sperimentalmente in topi Wistar maschi adulti. Dall'esame istologico della prostata è stato evidenziato che, i tessuti dei ratti sottoposti alla supplementazione di estratto (a due dosi, bassa e alta, 2mg/kg e 4 mg/kg per peso corporeo), presentavano cambiamenti significativi nell'architettura tissutale. Il livello di PSA è stato significativamente abbassato in entrambi gli estratti a dosi basse e alte ($P < 0,05$) e in maniera dose dipendente. L'estratto ad entrambe le dosi ha ridotto significativamente la dimensione della prostata ($P < 0,05$), ma non è stato possibile ripristinare la dimensione iniziale dei testicoli rattrappiti e con grave oligospermia causata dagli ormoni. (Adesanya, et al, 2011).

1.3.3.6 Attività controllo disfunzione erettile

Recenti studi hanno dimostrato la capacità dei fitocostituenti di *Citrullus spp.* sulla promozione erettile in ratti (Jimoh et al, 2017). Studi hanno testato la polpa di *Citrullus lanatus* sul comportamento sessuale di ratti maschi. L'estratto è stato somministrato per via orale a dosi di 100, 500 e 1000 mg/kg a diversi gruppi di ratti maschi ($n = 5$) al giorno per 22 giorni. I ratti femmina ricettivi sono stati preparati mediante trattamento ormonale. Il comportamento di accoppiamento è stato studiato e confrontato con il farmaco di riferimento standard comunemente conosciuto come viagra (sildenafil citrato). Gli effetti avversi dell'estratto vegetale sono stati valutati anche osservando almeno una volta al giorno qualsiasi segno di cambiamento comportamentale: assunzione di acqua, cibo ed eventuale stress. I risultati hanno indicato che la somministrazione orale dell'estratto di polpa di anguria ha causato un aumento significativo della frequenza di montaggio, della frequenza di intromissione e della latenza eiaculatoria e una diminuzione significativa della latenza di montaggio e della latenza di intromissione ($P < 0,05$). L'estratto alla dose di 1000 mg/kg non ha prodotto segni clinici di tossicità o mortalità in nessuno degli animali durante la durata del trattamento (Munglue et al, 2014).

Si ritiene che l'ossido nitrico (NO) sia il principale neurotrasmettitore vasoattivo non antergenergico, non-colinergico e mediatore chimico dell'erezione del pene. Il segnale - NO viene rilasciato dalle terminazioni nervose centrali e periferiche e dalle cellule endoteliali e attiva una reazione a cascata, che alla fine porta ad un aumento della concentrazione cellulare di cGMP (guanosina monofosfato ciclico). Questa seconda molecola messaggero induce una serie di eventi che portano al rilassamento della muscolatura liscia attraverso una regolazione dell'attività dei canali del calcio così come le proteine contrattili intracellulari che influenzano il rilassamento della muscolatura liscia del corpo cavernoso. I meccanismi proposti coinvolgono una idrossilazione iniziale di L-arginina, la cui concentrazione aumenta in seguito all'introduzione di L-citrullina (e quindi di anguria) che conduce alla formazione di N-idrossi-L-arginina, che può anche fungere da substrato per la NOS (ossido nitrico sintasi). Questo è seguito dall'ossidazione dell'intermedio, usando un singolo elettrone di NADPH (nicotinammide adenina dinucleotide fosfato) per formare L-citrullina e NO (Luiking et al, 2012). Le azioni vascolari di NO includono la vasodilatazione diretta (dipendente dal flusso e dal recettore mediato), vasodilatazione indiretta mediante inibizione del vasoconstrictore, effetti anti-trombotico e anti-infiammatorio (Loscalzo, 2013). Luiking et al., 2012, Shamloul and Ghanem, 2013).

1.3.3.7 Attività lassativa

Studi hanno confermato l'effetto lassativo dell'estratto di polpa di *Citrullus lanatus* in ratti Wistar. I ratti sono stati divisi in 5 gruppi di 6 animali ciascuno, in cui, il primo gruppo è servito come controllo, il secondo gruppo servito come standard (sodio picosolfato) mentre i gruppi 3, 4 e 5 sono stati trattati con estratto a diverse dosi di 250, 500 e 1000 mg/kg di peso corporeo, rispettivamente per via orale (p.o.) L'attività lassativa è stata determinata sulla base del peso delle feci prodotte. Lo studio ha permesso di valutare anche il tasso di motilità intestinale dimostrando che l'estratto possiede una significativa attività lassativa dose modo dipendente. L'effetto dell'estratto a 500 e 1000 mg/kg (p.o.) era simile a quello del controllo positivo (picosolfato di sodio conosciuto) (5 mg/kg, p.o). Le stesse dosi dell'estratto (500 e 1000 mg/kg, per via orale p.o.) ha prodotto un aumento significativo ($p < 0,01$) della motilità e quindi del transito ($p < 0,01$). (Swapnil et al, 2011).

Capitolo 2

Sindrome metabolica e fattori di rischio

2.1 Criteri di definizione della Sindrome metabolica

La Sindrome metabolica (MetS) è un insieme di anomalie metaboliche che conferisce a un individuo un aumento sostanziale del rischio di malattia cardiovascolare (CVD), circa il doppio rispetto a quelli senza sindrome. I soggetti affetti da MetS presentano un aumentato rischio di mortalità da CVD, malattia coronarica, ictus, disfunzione vascolare e mortalità per tutte le cause (Ford, 2004), tanto da essere considerato un fattore di rischio di primo ordine per le complicanze aterotrombotiche (Kaur, 2014). La sua presenza o assenza dovrebbe essere considerata un indicatore del rischio a lungo termine. D'altra parte, il rischio a breve termine (5-10 anni) è meglio calcolato utilizzando gli algoritmi classici (Framingham, REGICOR {Registre GIroní del COR}), poiché includono età, sesso, colesterolo totale o LDL e fumo (Grundy SM, 2006). La patogenesi della MetS e dei suoi componenti non è ben compresa, l'obesità centrale e la resistenza all'insulina sono riconosciute come fattori causali (Srikanthan et al, 2016). Diverse organizzazioni hanno delineato i criteri diagnostici per la MetS, che indica i valori per l'obesità (circonferenza della vita o BMI), i livelli di trigliceridi, i livelli di HDL (High Density Lipoprotein), ipertensione, iperglicemia e talvolta l'albumina o il rapporto albumina: creatinina. Ci sono state diverse definizioni di MetS, ma i criteri di definizione più comunemente usati attualmente sono *World Health Organization* (WHO) (Alberti and Zimmet, 1998), *European Group for the study of Insulin Resistance* (EGIR) (Balkau and Charles, 1999), *National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III)* (*Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults*, 2001), *American Association of Clinical Endocrinologists* (AACE), e *International Diabetes Federation* (IDF) (tab. 2).

tab. 2 Criteri diagnostici per MetS

Clinical measures	WHO (1998)	EGIR (1999)	ATPIII (2001)	AACE (2003)	IDF (2005) [
Insulin resistance	IGT, IFG, T2DM, or lowered insulin Sensitivity ^a plus any 2 of the following	Plasma insulin >75th percentile plus any 2 of the following	None, but any 3 of the following 5 features	IGT or IFG plus any of the following based on the clinical judgment	None
Body weight	Men: waist-to-hip ratio >0.90; women: waist-to-hip ratio >0.85 and/or BMI > 30 kg/m ²	WC ≥94 cm in men or ≥80 cm in women	WC ≥102 cm in men or ≥88 cm in women	BMI ≥ 25 kg/m ²	Increased WC (population specific) plus any 2 of the following
Lipids	TGs ≥150 mg/dL and/or HDL-C <35 mg/dL in men or <39 mg/dL in women	TGs ≥150 mg/dL and/or HDL-C <39 mg/dL in men or women	TGs ≥150 mg/dL HDL-C <40 mg/dL in men or <50 mg/dL in women	TGs ≥150 mg/dL and HDL-C <40 mg/dL in men or <50 mg/dL in women	TGs ≥150 mg/dL or on TGs Rx. HDL-C <40 mg/dL in men or <50 mg/dL in women or on HDL-C Rx
Blood pressure	≥140/90 mm Hg	≥140/90 mm Hg or on hypertension Rx	≥130/85 mm Hg	≥130/85 mm Hg	≥130 mm Hg systolic or ≥85 mm Hg diastolic or on hypertension Rx
Glucose	IGT, IFG, or T2DM	IGT or IFG (but not diabetes)	>110 mg/dL (includes diabetes)	IGT or IFG (but not diabetes)	≥100 mg/dL (includes diabetes) ^b
Other	Microalbuminuria: Urinary excretion rate of >20 mg/min or albumin: creatinine ratio of >30 mg/g.			Other features of insulin resistance ^c	

Sebbene il rapporto NCEP ATP III e l'OMS abbiano entrambi identificato CVD come l'esito clinico primario della MetS, la maggior parte delle persone con MetS presenterà insulino-resistenza, con conseguente aumento del rischio di diabete di tipo 2. Una volta che il diabete diventa clinicamente evidente, il rischio di CVD aumenta notevolmente. (Fig. 5). Oltre alla CVD e al diabete di tipo 2, le persone con MetS sono apparentemente più suscettibili ad altre condizioni, tra cui sindrome dell'ovaio policistico, fegato grasso, calcoli biliari di colesterolo, asma, disturbi del sonno e alcune forme di cancro, come seno, pancreas, colon-retto e prostata (Grundy et al, 2004; Grundy et al, 2014):

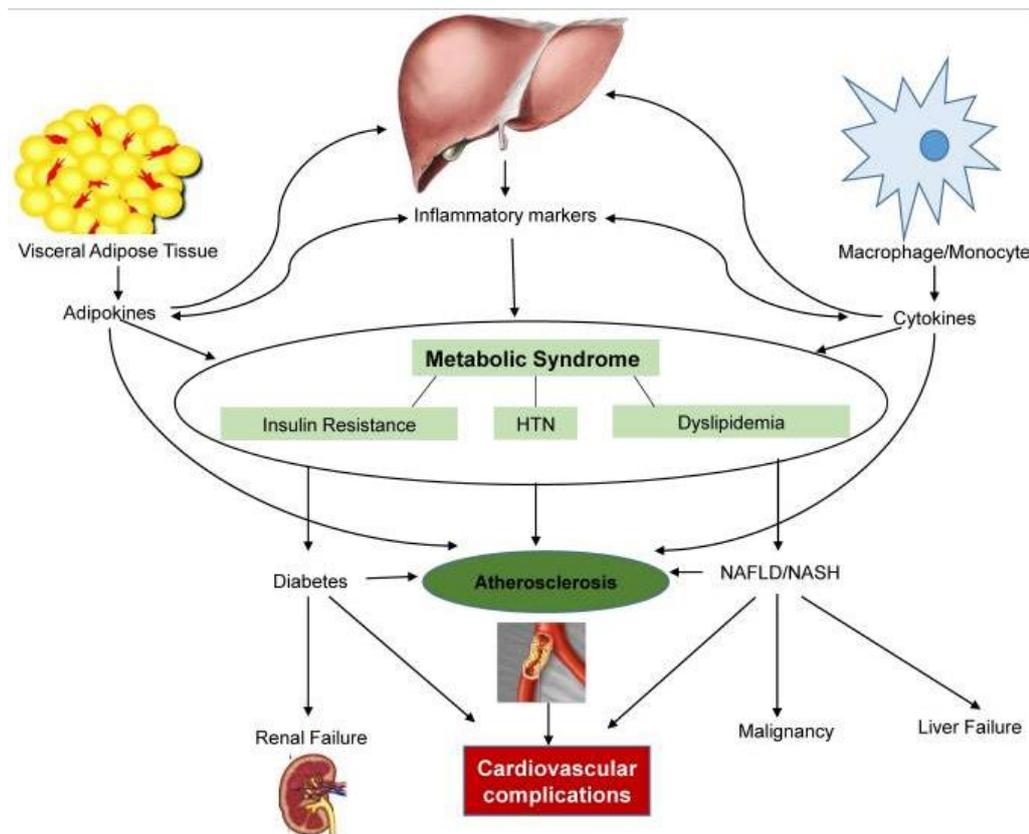


Fig. 5 Interazione di adipochine, citochine e marcatori infiammatori che contribuiscono allo sviluppo della MetS e delle sue complicanze. HTN-Ipertensione, NAFLD/NASH- steatosi epatica. Fonte Srikanthan et al, 2016

La ricerca mostra che gli adipociti producono sostanze bioattive, note come adipocitochine o adipochine. L'accumulo di adipociti porta alla produzione irregolare di adipochine, che contribuisce allo sviluppo della MetS (Ryo et al, 2004). L'elenco di queste adipochine e citochine disregolate è in costante crescita ed è un riflesso dell'eterogeneità del tessuto adiposo a causa del numero di tipi di cellule residenti (Deng and Scherer, 2010).

Il meccanismo mediante il quale l'accumulo di adipe elucida la disregolazione non è del tutto chiaro in questo momento, ma alcuni suggeriscono che sia almeno in parte dovuto allo stress ossidativo sistemico causato dall'obesità (Furukawa et al, 2004; Raghavan et al, 2012; Fernández-Sánchez et al, 2011).

2.2 Fattori di rischio

2.2.1 Obesità

Studi di popolazione hanno chiaramente dimostrato la relazione tra un aumentato rischio di malattie croniche non trasmissibili ed aumento di peso corporeo, sia in termini di adiposità totale che, di adiposità viscerale (Després and Lemieux, 2006; Ouchi et al, 2011; Furukawa et al, 2017). Evidenze scientifiche suggeriscono che tra gli individui ugualmente sovrappeso o obesi, quelli che manifestano adipe viscerale presentano un maggiore rischio di diabete di tipo 2 e CVD (Rexrode et al, 1998; Hajian-Tilaki and Heidari, 2015, Furukawa et al, 2017) e questo perché, il grasso viscerale è associato ad un aumento della produzione di adipocitochine anomale TNF - α , IL-1, IL-6, adiponectine e leptino- resistenza (Kaur, 2014).

Per questo motivo, la valutazione della circonferenza vita, soprattutto nella pratica clinica, rappresenta, un efficace metodo per valutare la presenza di una adiposità addominale (Rexrode et al, 1998; Alberti et al, 2005; Rothberg et al, 2017; Prasad et al, 2017), infatti, l'introduzione della circonferenza vita nella definizione di EGIR, piuttosto che del BMI, è stato un importante progresso concettuale, riconoscendo quest'ultimo parametro, come insufficiente indicatore clinico per determinare l'obesità centrale e l'insulino-resistenza.

Studi hanno ampiamente dimostrato che, una modesta perdita di peso, nell'obeso, compresa tra il 5% e il 10% del peso corporeo è associata a miglioramenti nei profili di rischio cardiovascolare e ridotta incidenza del diabete di tipo 2 e, l'orlistat, nella terapia farmacologica è stato approvato da oltre 10 anni (Drew et al, 2007).

L'orlistat, un derivato semisintetico della lipstatina, è un inibitore potente e selettivo di lipasi gastriche e pancreatiche che svolgono un ruolo fondamentale nella digestione dei grassi alimentari, e non esercita attività contro amilasi, tripsina, chimotripsina e fosfolipasi (Al-Suwailem et al, 2006). Le lipasi esercitano il proprio effetto all'interno del tratto gastrointestinale e l'orlistat agisce legandosi covalentemente al residuo di serina del sito attivo dell'enzima, inibendone l'attività biologica (Al-Suwailem et al, 2006). Quando viene somministrato con cibi contenenti grassi, l'orlistat inibisce parzialmente l'idrolisi dei trigliceridi, riducendo così il successivo assorbimento di monoacilgliceridi e acidi grassi liberi. Si ritiene che orlistat abbia un basso potenziale di abuso perché non viene assorbito (<1%) e non ha alcun effetto a livello centrale. Ad oggi, è stato segnalato un solo caso per l'orlistat abusato in donne con peso medio con disturbi alimentari e dipendenza da stimolanti (Carolyn and Malcolm, 2002).

L'attività farmacologica di orlistat è dose-dipendente e a quelle terapeutiche, 120 mg t.i.d. assunti con i pasti principali somministrati in associazione con una dieta ben bilanciata, lievemente ipocalorica, porta ad una inibizione dell'assorbimento dei grassi ingeriti di circa il 30% del grasso contribuendo ad un ulteriore deficit calorico di circa 200 calorie.

Orlistat non produce disturbi significativi ai processi fisiologici a livello del tratto gastrointestinale (svuotamento e acidità, motilità della colecisti, composizione della bile e litogenicità) o all'equilibrio sistemico di minerali ed elettroliti. Allo stesso modo, orlistat non influenza l'assorbimento e la farmacocinetica di farmaci con un indice terapeutico ristretto (fenitoina, warfarin, digossina) o composti frequentemente utilizzati da pazienti obesi (contraccettivi orali, gliburide, pravastatina, nifedipina a rilascio lento) (Guerciolini, 1997).

Tuttavia, l'orlistat è riconosciuto per alcuni effetti avversi, quali steatorrea, gonfiore, macchie oleose, urgenza fecale e incontinenza fecale. La percentuale di pazienti che manifestano almeno uno di questi effetti indesiderati sembra essere compresa tra il 16% e il 40% (Padwal et al 2003) e l'effetto collaterale più psicologicamente disturbante è l'incontinenza fecale che si trova in circa il 7% dei pazienti (Drew et al, 2007).

2.2.2 Insulino-resistenza

Il ruolo dell'insulino-resistenza nello sviluppo del MetS è supportato dallo studio di Bruneck, che ha esaminato la prevalenza dell'insulino-resistenza in soggetti di età compresa tra 40-79 anni utilizzando il metodo di valutazione del modello omeostatico (HOMA) (Bonora et al, 1998). In questo studio, il grado di insulino-resistenza era correlato a diverse alterazioni metaboliche, e quando diverse anomalie erano raggruppate insieme, l'insulino-resistenza era quasi sempre presente (Nesto, 2003; Mayans et al, 2015). Si ritiene, dunque che, la resistenza all'insulina sia una caratteristica centrale del MetS, anche se il legame meccanicistico tra la resistenza all'insulina e la maggior parte dei componenti del MetS non è completamente compreso. Sebbene la resistenza all'insulina sia fortemente associata alla dislipidemia aterogena e allo stato proinfiammatorio, essa è meno strettamente associata all'ipertensione e allo stato protrombotico (Alberti et al, 2006).

L'insulino-resistenza è definita come una condizione fisiopatologica, nella quale una normale concentrazione di insulina, non produce adeguatamente una normale risposta insulinica nei tessuti bersaglio periferici come il tessuto adiposo, muscoli e fegato. In questa condizione, le cellule beta del pancreas, secernono più insulina (iperinsulinemia) per compensare l'iperglicemia in individui insulino-resistenti. Lo stato di iperinsulinemia può compensare l'insulino-resistenza in mantenimento la condizione di normoglicemia, tuttavia, può causare una sovraespressione dell'attività insulinica in alcuni tessuti normalmente sensibili. Questa accentuazione di alcune azioni dell'insulina è accoppiata con una resistenza ad altre azioni dell'insulina portando alle manifestazioni cliniche della MetS. Nel tempo, l'incapacità delle cellule beta pancreatiche di produrre sufficiente insulina, porta a iperglicemia e diabete tipo 2 conclamato. L'insulino-resistenza determina danni a diversi organi insulino-sensibili come il fegato e i reni (Reaven 1988, 2003; Yoon et al., 2014).

L'iperinsulinemia riflessa può contribuire anche alla fisiopatologia dell'ipertensione essenziale attraverso un aumento dell'assorbimento renale di acqua e/o aumento dell'attività simpatica (Reaven, 2003; Yoon et al., 2014) e il danno endoteliale. Quest'ultimo si identifica con una ridotta biodisponibilità di monossido d'azoto (NO).

Il NO è una delle tante sostanze vasoattive prodotte dall'endotelio in condizioni normali e che garantiscono l'omeostasi del sistema vascolare, assicurando da una parte un flusso ematico adeguato e una ottimale distribuzione dei nutrienti e dall'altra esercitando un'azione preventiva verso i fenomeni trombotici. Quando questo meccanismo viene meno, è favorita l'aterosclerosi e la trombosi (Yoon et al., 2014).

2.2.3 Dislipidemia

La dislipidemia è considerato come uno squilibrio del livello sierico di LDL (che aumenta) e delle particelle di colesterolo HDL (che diminuisce) (Reaven, 1988). Come definito da Kaur (2014), la dislipidemia è caratterizzata da spettro di anomalie lipidiche qualitative che si riflettono in perturbazioni nella struttura, metabolismo e attività biologiche di entrambe le lipoproteine aterogene e del colesterolo HDL antiaterogeno. La dislipidemia è frequentemente associata alla resistenza all'insulina. Come accennato in precedenza, l'iperinsulinemia riflessa, causata dalla resistenza all'insulina, crea un iniziale lieve-moderato aumento delle LDL e basso valore delle HDL. L'accumulo degli adipociti addominali, sono causa di un eccesso trasporto di acidi grassi nel fegato e sono prodotte le lipoproteine a bassa densità, LDL, che si arricchiscono di colesterolo in cambio di trigliceridi ceduti alle HDL, che a loro volta vengono eliminate dal rene. Tutto questo porta ad un aumento delle LDL e diminuzione della HDL (Reaven 1988, 2003; Yoon et al., 2014). Alcune proprietà delle LDL piccole e dense sono importanti nel determinare l'aumentato rischio cardiovascolare dei soggetti con sindrome metabolica. Tali particelle infatti hanno un tempo di permanenza in circolo aumentato, perché hanno una minore affinità con il loro recettore; sono facilmente riconosciute dai recettori dei macrofagi e attraverso questa via promuovono l'aterogenesi, in presenza di una lesion endoteliale con conseguente formazione di cellule schiumose; hanno un'azione flogogena e citolesiva, che si traduce nella disfunzione endoteliale, primum movens dell'aterogenesi. Studi dimostrano che il rapporto plasmatico tra trigliceridi (TG) e colesterolo HDL ($TG/HDL \geq 3,0 \text{ mg/dl}$) è un marker di resistenza all'insulina nelle persone in sovrappeso (Marotta et al, 2010). Non solo ma, il rapporto tra le due porzioni, può essere applicato come indice predittivo e prognostico di CVD utilizzato come marker di aterogenicità (González-Chávez et al, 2011) (Fig. 6).

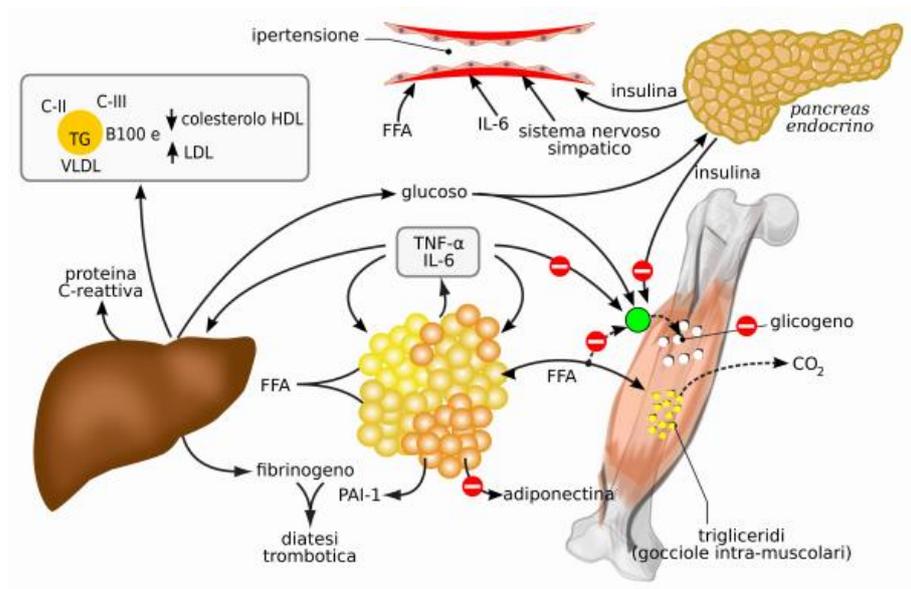


Fig. 6 Fisiopatologia della MetS. Fonte Wu and Morris, 2008

2.2.4 Ipertensione

Diversi meccanismi sono stati ipotizzati per spiegare il motivo per cui l'obesità e la MetS possono essere considerati come uno stato proipertensivo (Gupta et al., 2010) (Fig. 7). La resistenza al metabolismo del glucosio insulino-mediato determina, come descritto precedentemente, una iperinsulinemia compensatoria, che serve a mantenere l'omeostasi del glucosio. Tuttavia, questo meccanismo inizialmente adattativo può promuovere l'ipertensione e vari processi aterogenici.

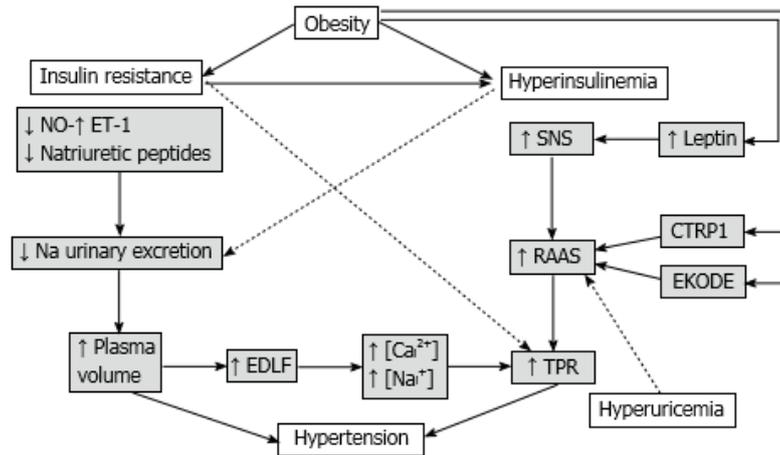


Fig. 22 Ipotetici meccanismi secondo i quali la MetS determina un aumento della pressione arteriosa. Fonte Mulè et al, 2014

Numerosi studi suggeriscono che l'iperglicemia e l'iperinsulinemia attivano il sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAS), aumentando l'espressione dell'angiotensinogeno, dell'angiotensina II (AT II), e del recettore AT1 che, complessivamente, possono contribuire allo sviluppo di ipertensione in pazienti con resistenza all'insulina. Vi sono anche prove che l'insulino resistenza e l'iperinsulinemia determinino attivazione del SNS e, di conseguenza, aumenta il riassorbimento renale di sodio, la gittata cardiaca e la vasocostrizione arteriosa con conseguente ipertensione (Morse et al., 2005).

Altri fattori possono contribuire all'attivazione simpatica che si verifica nella MetS. Essi comprendono la leptina, che aumenta nell'obesità e agisce da potente stimolatore del sistema simpatico (Chaudhary et al., 2011; Mancina et al., 2007; Landsberg et al., 2013). L'apnea notturna, che si verifica frequentemente nell'obesità, può anche svolgere un ruolo, a causa del suo effetto simpatico-eccitatorio attraverso l'attivazione ipossica del riflesso chemocettivo (Mancina et al., 2007; Landsberg et al., 2013; Konecny et al., 2014). L'attività aumentata del SNS, l'insulina e la leptina di per sé (DeFronzo et al., 1975) stimolano l'assorbimento del sodio renale che porta all'aumento del volume e all'ulteriore aumento della pressione sanguigna (Chaudhary et al., 2011; Mancina et al., 2007; Landsberg et al., 2013).

In alcuni studi, sono stati riportati aumenti delle concentrazioni plasmatiche dell'aldosterone (PAC) in soggetti obesi. Livelli di aldosterone elevati che spesso sono sproporzionati rispetto all'aumento dell'attività della renina (Landsberg et al., 2013; Calhoun et al., 2010; Byrd et al.,

2014). Infatti, è stato dimostrato che una varietà di fattori derivanti dal tessuto adiposo può stimolare la sintesi di aldosterone (Landsberg et al., 2013; Byrd et al., 2014).

L'insulino-resistenza/iperinsulinemia e l'obesità viscerale sembrano predisporre i pazienti ad un alterato utilizzo periferico del glucosio e alla produzione di ossido nitrico (NO) (Deedwania et al., 2011; Muniyappa et al., 2013). In effetti, l'insulina è un mediatore di importanti funzioni vasodilatatrici nel sistema vascolare. Nei soggetti obesi con insulino-resistenza, queste funzioni vengono perse o addirittura invertite portando ad un rilassamento vascolare alterato e ad ipertensione (Deedwania et al., 2011; Muniyappa et al., 2013).

I pazienti con MetS hanno livelli sierici di acido urico (SUA) (Grassi et al., 2014) spesso elevati. L'iperuricemia è stata generalmente attribuita ad iperinsulinemia e alla IR nella MetS e non è riconosciuta come mediatore principale della MetS e dello sviluppo delle malattie cardiovascolari (CVD). Tuttavia, le indagini condotte negli ultimi decenni hanno cambiato questa prima visione, sostenendo un collegamento indipendente tra iperuricemia e aumento del rischio di MetS, diabete, ipertensione, malattie renali e malattie cardiovascolari (Johnson et al., 2013; Bombelli et al., 2014). Iperuricemia da lieve a moderata farmacologicamente indotta, tramite la somministrazione di acido ossonico, nei ratti ha portato allo sviluppo di elevata pressione sanguigna (Feig et al., 2013; Johnson et al., 2013). Studi sperimentali suggeriscono che la SUA potrebbe svolgere un ruolo nel promuovere l'ipertensione attraverso molteplici meccanismi, tra cui l'induzione di stress ossidativo, l'attivazione della via RAAS e l'inibizione di NO (Feig et al., 2013). Un *pathway* comune plausibile per i meccanismi di cui sopra è lo sviluppo della malattia arteriolare renale con macrofagi interstiziali e infiltrazione di cellule T, portando infine alla vasocostrizione renale e ad ischemia (Feig et al., 2013).

Se la disfunzione endoteliale rappresenta una causa o un effetto dell'ipertensione è discutibile, tuttavia ci sono prove sostanziali che collegano la disfunzione endoteliale con ipertensione. In realtà, vi è evidenza di un'associazione positiva tra il grado di disfunzione endoteliale e la gravità dell'ipertensione (Benjamin et al., 2004).

Lo stato di cellule endoteliali non è più considerato come un'entità inerte ma, piuttosto svolge ruoli significativi in molti aspetti dell'omeostasi cardiovascolare. La funzione endoteliale è regolata e mantenuta da una varietà di recettori sulla superficie cellulare, alcuni dei quali inducono il rilascio di sostanze vasoattive che regolano il tono vascolare e la proliferazione delle cellule muscolari lisce (Drexler e Hornig, 1999). Mediatori locali e circolanti stimolano l'endotelio vascolare a rilasciare sostanze vasodilatanti (NO, prostaciclina e fattore iperpolarizzante endoteliale-derivato) e vasocostrittorici (endotelina, trombossano e PDGF) (Iglarz e Clozel, 2007). Quando c'è uno squilibrio tra questi agenti vasoattivi, un aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) può provocare disfunzione endoteliale e, infine, ipertensione (Viridis e Taddei, 2011; Montezano and Touyz, 2012; Silva et al., 2012). In particolare, il principale meccanismo sottostante alla disfunzione endoteliale presente nell'ipertensione è la diminuzione della disponibilità di ossido nitrico (NO), a seguito di un aumento dello stress ossidativo in questi pazienti.

L'ossido nitrico (NO) è spesso riconosciuto come un importante indicatore della salute vascolare. Esso gioca un ruolo importante nella regolazione della pressione sanguigna grazie al suo effetto vasodilatatorio (Francis et al., 2010) così come alla sua capacità di inibire l'aggregazione delle piastrine e la proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari (*Vascular smooth muscle cells*, VSMC) (Zeng et al., 2009).

NO è prodotto dalla L-arginina dalla NO sintasi (NOS), come la NOS endoteliale (eNOS) (Francis et al., 2010). Dopo il suo rilascio, NO trasloca nelle VSMC e attiva la guanilato ciclasi

solubile (sGC), che catalizza la conversione e la ciclizzazione del guanosintrifosfato (GTP) a cGMP (Francis et al., 2010). Il cGMP si lega poi alle proteine chinasi cGMP-dipendenti (PKG) che modulano i livelli di calcio e la conseguente contrazione delle VSMCs (Francis et al., 2010). In pochi secondi della sua produzione, NO reagisce con anioni superossido per produrre perossinitrito (Drummond et al, 2011.) (ONOO⁻) (Drummond et al, 2011), un ossidante selettivo che può far diminuire lo stress ossidativo come anche l'effetto vasodilatatorio di NO (Drummond et al., 2011).

Pertanto, la concentrazione delle ROS ha un impatto diretto sulla biodisponibilità di NO. È interessante notare che lo stress ossidativo può anche indurre un disaccoppiamento di eNOS, in modo tale che eNOS generi radicali liberi invece di NO. Ad esempio, la stimolazione della NADPH ossidasi porta alla generazione di anione superossido, che reagisce con NO per formare il potente agente ossidante perossinitrito. Questo perossinitrito poi degrada ossidativamente il cofattore di eNOS tetraidrobiopterina (BH₄) a diidrobiopterina inattiva (BH₂). Questo evento produce più anione superossido che alla fine esaurisce BH₄. Pertanto, ne deriva uno spostamento del baricentro dal NO alla formazione di superossido; questo viene indicato come disaccoppiamento di NOS (Michel e Vanhoutte, 2010). Pertanto, l'interazione tra NO e meccanismi di regolazione che governano la sua biodisponibilità sono intimamente intrecciati con il tono vascolare e la disfunzione endoteliale (Montezano e Touyz, 2012).

L'uso della medicina basata su composti di origine naturale come modalità di trattamento è significativamente aumentata negli ultimi decenni (Frishman et al., 2009). Ciò è dovuto a diversi fattori, il principale dei quali è che rappresenta un'alternativa più economica con un minor numero di effetti indesiderati (Frishman et al., 2009; Susalit et al., 2011; Tabassum e Ahmad, 2011). La volontà di utilizzare un trattamento a base di erbe, tuttavia, non è un riflesso della situazione economica se teniamo conto che il 70% della popolazione nelle Nazioni sviluppate ha fatto ricorso alla Medicina Complementare e Alternativa (CAM) e alla medicina a base di erbe (WHO, 2008). Soprattutto, considerando il fatto che le piante contengono migliaia di componenti bioattivi che hanno conosciuto applicazioni terapeutiche (Pan et al., 2013) che spingono un fruitore verso scelte più consapevoli.

Recentemente Figueroa e collaboratori (2017) hanno suggerito le potenzialità dell'anguria come alimento funzionale con effetti vasodilatatori in grado di prevenire la progressione della preipertensione a ipertensione, che si configura come un importante fattore di rischio per infarti e ictus.

L'anguria è la fonte naturale commestibile più ricca dell'aminoacido non-essenziale L-citrullina, che è strettamente correlata alla L-arginina. Come precedentemente descritto la L-arginina è il substrato per la produzione endoteliale di ossido nitrico (NO), un importante regolatore della pressione arteriosa tramite un potente effetto vasodilatatore. La L-arginina può essere sintetizzata dalla L-citrullina tramite il ciclo citrullina-NO con conseguente aumento della produzione endoteliale di NO (Figura 6).

La L-citrullina assunta per via orale (6 g/die) fornisce maggiori livelli in circolo di L-arginina rispetto a una dose simile di L-arginina a causa di una conversione efficiente della L-citrullina a L-arginina. Analogamente, la L-citrullina dal *Citrullus lanatus* viene efficacemente convertita in L-arginina. La supplementazione orale di L-arginine (7 g) ha dimostrato di diminuire la pressione sanguigna attraverso la produzione endoteliale di NO in adulti con pre-ipertensione e ipertensione. Tuttavia l'effetto di una singola dose sulla funzione vascolare non può essere sostenuta per un tempo superiore alle 2 ore.

È stato dimostrato che 4 settimane di supplementazione di L-citrullina attenuano l'aumento della pressione aortica indotta da esposizione al freddo in uomini giovani. Ci sono prove che la supplementazione di anguria possono ridurre la pressione sanguigna e migliorare la vasodilatazione endotelio-dipendente in ratti ipertesi e diabetici. Pertanto, Figueroa e collaboratori, hanno ipotizzato che la supplementazione di anguria, ricco di L-citrullina naturale, riduce la pressione sanguigna e migliora la funzione arteriosa negli adulti con ipertensione arteriosa con preipertensione o ipertensione di stadio 1, confermando come la somministrazione dell'estratto di anguria possa riflettere un miglioramento generale della funzione arteriosa (Figueroa et al, 2012).

La supplementazione orale di L-citrullina dall'anguria potrebbe consentire pertanto un dosaggio ridotto di farmaci antipertensivi necessari per controllare la pressione sanguigna, oltre ad avere importanti effetti preventivi.

Capitolo 3

Materiali e metodi

3.1 Materiali

M. comosum. Una prima fase della ricerca ha previsto il confronto tra estratti con etanolo (EtOH) al 100% di bulbi provenienti da diverse aree geografiche: Puglia, Basilicata, Calabria (località Acri, Sila, Paludi) e Marocco. I bulbi Basilicata e Puglia sono stati recuperati nel mese di ottobre 2014 da agricoltori locali che asserivano di averli acquistati da aziende coltivatrici e, di averne effettuato l'interramento nel mese di settembre. Per questi bulbi non è stato possibile individuarne con esattezza la zona di raccolta così come per quelli di origine calabrese, reperiti da agricoltori delle zone menzionate. I bulbi di origine marocchina, invece, sono stati acquistati nella GDO e conservati in luogo fresco e asciutto per 24h prima di essere sottoposti a pulitura ed estrazione. L'anno successivo, nel 2015, abbiamo parcellato una zona nei pressi del lago Cecita, in Sila (39°40'27.34 "N, 16° 46'79.24" E - 39°40'9.20 "N, 16°46'84.91" E) da cui sono stati raccolti, gambi e fiori nella primavera e bulbi, successivamente dopo l'estate. Un'altra sostanziosa partita, di oltre 3kg di bulbi, ci è stata fornita da agricoltori locali che, ne hanno effettuato raccolta nelle aree in prossimità del Parco nazionale della Sila (raccolta popolazioni). I campioni di bulbi sono stati conservati in ambiente fresco e asciutto per 24h prima di essere puliti e sottoposti ad estrazione, mentre, foglie e fiori sono stati essiccati a temperatura ambiente, al buio, fino a stabilizzazione del peso (tab. 3).

tab. 3 Origine, periodo di raccolta e sigla di *M. comosum* (2014 - 2015)

Campioni	Periodo di raccolta	Origine	Parte pianta	Sigla campione
Calabria (Sila)	settembre	Spontaneo	Bulbo	LcS
Calabria (Acri)	settembre	Spontaneo	Bulbo	LcA
Calabria (Paludi)	ottobre	Spontaneo	Bulbo	LcP
Basilicata	settembre	Coltivato	Bulbo	LcB
Puglia	ottobre	Coltivato	Bulbo	LcP
Marocco	*	Coltivato	Bulbo	LcM
Calabria (Sila) fiori **	aprile	Spontaneo	Fiori	FLG
Calabria (Sila) gambi**	aprile	Spontaneo	Gambi	GLG
Calabria (Sila) bulbi**	settembre	Spontaneo	Bulbo	BLG
Calabria (Sila) pop***	settembre	Spontaneo	Bulbo	Lc

*i bulbi provenienti dal Marocco sono stati acquistati nel mese di ottobre, ** i campioni sono georeferenziati 2015,

*** popolazione 2015

Citrus spp. Tutti i campioni sottoposti ad indagine, sono stati prelevati nella Piana di Sibari, nell'area compresa tra Cassano allo Ionio, Corigliano Calabro e Mirto Crosia (tab. 4). I campioni hanno avuto tutti un medesimo trattamento di irrigazione (a goccia, 4 gocciolatori per pianta, autocompensanti da 4 litri ora), le caratteristiche del suolo erano a medio impasto mediamente profondo con scheletro assente e pH compreso tra 7,9 e 8,2. I campioni sono stati raccolti nell'inverno 2014-2015, per cui, tutti sottoposti alle stesse condizioni meteorologiche. L'anno successivo, inverno 2015-2016, sono stati raccolti Clementina (*Citrus clementina* Hort. ex. Tanaka), Tarocco (*Citrus sinensis* L. Osbeck) e Tacle® (tab. 5) e, quest'ultimo, sottoposto a valutazione della shelf life (0, 6, 8 settimane a 1 °C e 90-95% H.U.) Arance, mandarini e foglie, sono stati trasportati in laboratorio all'interno di borse frigo e sottoposti ad analisi nel giro delle 24h.

Le caratteristiche dei frutti sono riportati di seguito:

- *Citrus sinensis* L. Osbeck:
 - cultivar sanguigna: *Tarocco (TR)* dalla polpa arancio intenso con sfumature rosse. La forma del frutto è sferoidale allungata con un lobo pedicellare molto sviluppato detto "muso". La buccia è compatta, fine, con vescicole poco sviluppate. La maturazione inizia verso la metà di dicembre e la raccolta termina verso i primi di aprile.
 - cultivar bionda: *Navel (NV)* è un'arancia a polpa bionda che presenta, nella parte inferiore, un ombelico da cui prende il nome e a cui corrisponde un frutticino gemello che si sviluppa all'interno del frutto principale. È apirena con buccia spessa e di colore arancio intenso. Matura da novembre ad aprile.
- *Citrus limon* L. Osbeck: Limone IGP di Rocca Imperiale (Verdello) (LL), frutto è giallo all'esterno e quasi incolore all'interno, di forma ovale e un peso medio di 100-160 grammi.
- *Citrus reticulata*, Blanco, 1837: Marzolini (Mandarino Tardivo di Ciaculli) (MZ) è un mandarino che matura tra gennaio e marzo. Presenta una buccia di colore arancio intenso medio-fine ed una polpa dolce e succosa dal peculiare profumo che lo contraddistingue da altri agrumi.
- *Citrus aurantium* L.: Arancia amara (*Citrus maxima* x *Citrus reticulata*) (AA) ha una polpa molto acida, amarognola e ricca di semi. L'epicarpo è sottile e di colore arancio intenso.
- *Citrus clementina* Hort. ex. Tanaka: Clementina "comune" (IGP) incrocio tra *Citrus reticulata*, Blanco, 1837 (var. *Avana*) x *Citrus aurantium* (arancia amara) (CL). Il frutto è più simile al mandarino, forma tondeggianti e dalla polpa decisamente più aranciato. Il gusto invece è più simile all'arancia, con un perfetto equilibrio tra l'agro e il dolce.
- Ibridi:
 - Early sicily*® (ES) ibrido triploide ottenuto da (*Clementina oroval* 2x) x (*Tarocco* 4x), il peso varia a seconda della produzione tra 150-180 g, hanno forma oblata e sono facilmente sbucciabili. La polpa ha caratteristiche intermedie tra il mandarino Clementina e l'arancia Tarocco. La resa in succo è circa il 50 %. A metà dicembre la buccia acquisisce un colore arancio intenso che aumenta in gennaio.
 - Tacle*® (TC): ibrido triploide ottenuto dall'incrocio *Monreal clementina* (*Citrus clementina* Hort. ex Tan) x *Tarocco* (*Citrus sinensis* L. Osbeck). La forma del frutto è oblata, peso medio di circa 150 g, buccia di colore arancio intenso, presenta una pigmentazione antocianica, ha una consistenza soffice ed è mediamente aderente alla polpa. Quest'ultima presenta colore arancio intenso con screziature antocianiche. la raccolta inizia a fine dicembre e si prolunga tutto gennaio.

Mandalate® (MD): ibrido triploide ottenuto dall'incrocio del mandarino *Fortune* (*Citrus reticulata* 2x) x mandarino *Avana* (*Citrus reticulata* 4x), frutto dalla forma oblata, peso medio di 100 g circa, buccia sottile di grana fine, di colore arancione e con scarsa aderenza alla polpa. Epoca di maturazione: tardiva, la raccolta inizia a fine febbraio e si prolunga sino ad aprile.

tab. 4 Origine, periodo di raccolta e sigla di *Citrus spp.* (2014-2015)

Campione	Provenienza	Periodo di raccolta	Parti utilizzate	Sigla pianta
Early sicily®	ARSAC	dicembre	Bucce, foglie e polpa	ES
Tacle®	Cassano alla Ionio	gennaio	Bucce, foglie e polpa	TC
Navel	Corigliano Calabro	novembre	Bucce, foglie e polpa	NV
Arancia amara	ARSAC	novembre	Buccia, foglie e polpa	AA
Tarocco	Corigliano Calabro	gennaio	Buccia, foglie e polpa	TR
Limone	Rocca Imperiale	ottobre	Buccia, foglie e polpa	LM
Marzolini	Corigliano Calabro	febbraio	Buccia, foglie e polpa	MZ
Mandalate®	ARSAC	febbraio	Buccia, foglie e polpa	MD

ARSAC Servizio Agrometeorologico Regionale di Mirto Crosia

tab. 5 Origine, periodo di raccolta e sigla di *Citrus spp.* (2015- 2016)

Campione	Provenienza	Periodo di raccolta	Parti utilizzate	Sigla pianta
Clementina	Cassano allo Ionio	dicembre	Bucce, foglie e polpa	CL
Tarocco	Cassano allo Ionio	gennaio	Bucce, foglie e polpa	TR
Tacle®	Cassano allo Ionio	novembre	Bucce, foglie e polpa	TC

Citrullus lanatus. I campioni di anguria sottoposti ad analisi, sono stati forniti da un rivenditore locale che, attraverso la propria rete di produttori, ne ha potuto monitorare il periodo di raccolta. I campioni sono pervenuti in laboratorio, nei mesi compresi tra gennaio e luglio 2015 (tab. 6). Per ogni campione sono state eseguite valutazioni visive e morfologiche e ne è stata controllata l'integrità del frutto. La colorazione della buccia esterna, variava dal verde chiaro al verde scuro, e le polpe dal rosato al rosso scuro fino al giallo oro.

L'origine delle angurie è stato su territorio europeo ed extraeuropeo; a confronto, infatti, sono state messe angurie italiane (Latina, Lamezia terme, Crotone), extraeuropee (Costa Rica, Brasile, Ecuador) ed europee (Romania), nonché angurie a polpa rossa e a polpa gialla.

Da un esame visivo, l'anguria proveniente dal Brasile risultava di forma tendenzialmente sferica, di colore esterno verde chiaro striato, con polpa rosa chiaro, semi giallastri dalla tipica forma a goccia, peso medio 6 kg.

L'anguria della Costa Rica presentava, invece, forma sferica, buccia di colore verde chiaro striata di verde scuro, peso medio 5-6 kg, polpa rossa, ricca di numerosi semi appiattiti.

L'anguria dell'Ecuador si presentava dalla forma ovale, buccia dal colore verde chiaro, peso 7 kg, polpa rossa anche essa ricca di semi.

Le angurie provenienti dalla Romania, che sono invece state analizzate presso l'Università de Vest Vasile Goldis di Arad, mostravano una forma tondeggiante, buccia verde scuro con striature di verde chiaro e polpa color oro più o meno intensa in base ai periodi di raccolta, è stato possibile valutarne le caratteristiche fitochimiche e biologiche in diversi periodi di maturazione.

Le angurie italiane provenienti da tre diverse località (Latina, Lamezia Terme e Crotone) presentano caratteristiche comuni quali: forma oblunga, buccia dal colore verde scuro con striature di 2 colori, peso di circa 10-12 kg, polpa rosso vivo, ricche di semi.

tab. 6 Origine, periodo di raccolta, sigla di *Citrullus lanatus* (2015 – 2016)

Provenienza	Periodo di raccolta	Parti frutto	Sigla campione
Brasile	gennaio	Polpa e buccia	CLB
Costa Rica	febbraio	Polpa e buccia	CLCR
Ecuador	marzo	Polpa e buccia	CLE
Latina	luglio	Polpa e buccia	CLL
Lamezia Terme	luglio	Polpa e buccia	CLLM
Crotone	luglio	Polpa e buccia	CLKR
Romania (giugno)	giugno	Polpa e buccia	CLRG
Romania (luglio)	luglio	Polpa e buccia	CLRL
Romania (settembre)	settembre	Polpa e buccia	CLRS

3.1.1 Reagenti per saggi chimici

Acido clorogenico, quercetina, Folin–Ciocalteu reagent, cloruro di alluminio, acido ascorbico, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), β -carotene, para nitrofenil- octanoato, acido 3,5-dinitrosalicilico, acido linoleico, licopene, L – citrullina, Tween 20, Lipase porcine pancreas, α -Amylase pig pancreas, diacetyl-monoxime, acido 3,5-dinitrosalicilico sono stati acquistati presso Sigma-Aldrich S.p.A. (Milano).

Etanolo, NaOH, HCl, H₂SO₄, H₃PO₄, invece, sono stati acquistati presso la VWR International s.r.l. (Milano), mentre tutti gli altri reagenti sono prodotti Carlo Erba (Milan, Italy).

3.2 Metodi

3.2.1 Estrazione e preparazione dei campioni

M. comosum: bulbi, privati di radici e rivestimento esterno, provenienti dalle diverse località, nonché 161,12 g di fiori e 185,96 g di gambi, sono stati estratti con una soluzione di etanolo puro (EtOH 100%) utilizzando un estrattore Naviglio® (Atlas Filtri SrL, Limena, PD, Italia): il processo completo ha richiesto due cicli di estrazione (4 litri di solvente) ogni ciclo è stato completato a 3,20 h con una temperatura di funzionamento di 20 °C e una pressione di 8 bar. Il solvente è stato evaporato sotto pressione ridotta usando Rotavapor R-220 SE (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Svizzera). Il rendimento delle estrazioni è riportato in tab. 7, 8, 9.

$$\text{Resa (\%)} = [(\text{peso estratto (g)}/\text{peso fresco (g)})] * 100$$

tab. 7 Resa di estrazione di bulbi *M. comosum* (2014)

Campioni	Peso pianta (g)	Peso estratto (g)	Resa %
Calabria (Sila)	939,06	158,02	16,83
Calabria (Acri)	535,67	85,21	15,90
Calabria (Paludi)	581,06	92,17	15,86
Basilicata	550,50	89,01	16,16
Puglia	580,65	88,6	15,26
Marocco	615,32	102,1	16,57

tab. 8 Resa di estrazione di bulbi, gambi e fiori *M. comosum* (Sila, 2015)

Campioni	Peso pianta (g)	Peso estratto (g)	Resa %
Bulbi	562,15	103,1	18,34
Gambi	185,96	15,34	8,25
Fiori	161,14	11,3	7,01
Bulbi popolazione	560,20	104,2	18,60

tab. 9 Resa di estrazione di bulbi *M. comosum* crudi e cotti (Sila, 2015)

Campioni	Peso pianta (g)	Peso estratto (g)	Resa %
Bulbi crudi	562,15	103,1	18,34
Bulbi bolliti*	425,00	89,01	16,16
Bulbi a vapore*	425,00	88,6	15,26

*I bulbi sono stati pesati previa cottura

Citrus spp.: Le foglie, sono state pulite con un panno umido per eliminarne resti in insetti e fango, successivamente sono state poste a seccare in luogo fresco e asciutto fino a stabilizzazione del peso. I frutti, sottoposti a controllo visivo per valutarne l'integrità, sono stati tagliati longitudinalmente e privati della calotta superiore ed inferiore. La buccia (flavedo) è stata ripulita da eventuali resti di albedo (parte bianca), così come la superficie della polpa. Quest'ultima, è stata liberata dalla membrana costituente lo spicchio e successivamente, pesata.

I campioni sono stati sottoposti ed estrazione con Naviglio® (Atlas Filtri SrL, Limena, PD, Italia), attraverso il metodo utilizzato per i *M. comosum* in una soluzione acqua – etanolo in rapporto 1:1.

Le rese di estrazioni sono riportate in tab. 10, 11, 12, 13, 14, 15.

tab. 10 Resa di estrazione di polpa *Citrus* (2014-2015)

Campioni	Peso pianta (g)	Peso estratto (g)	Resa (%)
Early sicily®	1545,26	75,41	4,87
Tacle®	1621,67	86,49	5,33
Navellina	3118,48	117,47	3,76
Arancio amaro	1547,8	22,48	1,45
Tarocco	1465,38	87,48	5,96
Limone	356,72	17,89	5,05
Marzolini	1446	76,31	5,27
Mandalate®	1523,57	75,49	4,95

tab. 11 Resa di estrazione di buccia *Citrus* (2014-2015)

Campioni	Peso pianta (g)	Peso estratto (g)	Resa (%)
Early sicily®	433,02	17,06	3,93
Tacle®	417,20	12,46	2,98
Navellina	390,20	16,06	4,12
Arancio amaro	391,89	15,24	3,88
Tarocco	417,27	20,47	4,90
Limone	444,01	19,84	4,47
Marzolini	446,35	22,97	5,14
Mandalate®	433,01	17,24	3,98

tab. 12 Resa di estrazione di foglie *Citrus* (2014-2015)

Campioni	Peso pianta (g)	Peso estratto (g)	Resa (%)
Early sicily®	145,34	3,94	2,71
Tacle®	78,35	1,61	2,05
Navellina	289,52	4,38	1,51
Arancio amaro	130,34	2,84	2,17
Tarocco	238,83	3,19	1,33
Limone	155,24	4,96	3,19
Marzolini	155,30	4,94	3,18
Mandalate®	348,83	3,19	0,91

tab. 13 Resa di estrazione di bucce Clementina, Tarocco, Tacle® (2015 -2016)

Campioni	Peso pianta (g)	Peso estratto (g)	Resa (%)
Clementina	678,53	28,558	4,21
Tarocco	608,0	34,47	5,67
Tacle®	500,0	24,39	4,88
Tacle® 6 settimane	701,56	34,02	4,85
Tacle® 8 settimane	1628	49,49	3,04

tab. 14 Resa di estrazione di polpa Clementina, Tarocco, Tacle® (2015 – 2016)

Campioni	Peso pianta (g)	Peso estratto (g)	Resa (%)
Clementina	349,06	7,31	2,09%
Tarocco	1255	25,91	2,06%
Tacle®	1000	105,44	10,5%
Tacle® 6 settimane	237,35	27,84	11,73%
Tacle® 8 settimane	670	41,90	6,25%

tab. 15 Resa di estrazione di foglie Clementina, Tarocco, Tacle® (2015 – 2016)

Campioni	Peso pianta (g)	Peso estratto (g)	Resa (%)
Clementina	1279,33	19,19	1,5%
Tarocco	120	1,7	1,4%
Tacle®	44	8,17	18,56%

Citrullus lanatus. (*Citrullus lanatus* thunb) I frutti sono stati tagliati trasversalmente per poter separare la polpa dalla buccia. Entrambe sono state tagliate in pezzi più piccoli ed estratte in Naviglio® in soluzione idroalcolica (acqua – etanolo, 1:1).

La resa di estrazione è riportata in tab. 16, 17:

tab. 16 Resa di estrazione di buccia *Citrullus lanatus*

Campioni	Peso Pianta (g)	Peso Estratto (g)	Resa %
Brasile	1021,58	323,79	31,69
Costa Rica	870,30	183,66	21,10
Ecuador	835,37	192,98	23,10
Latina	626,84	137,92	22,00
Lamezia Terme	949,74	210,27	22,14
Crotone	616,51	141,54	22,95
Romania (giugno)	815,30	198,23	24,31
Romania (luglio)	750,23	187,23	24,96
Romania (settembre)	834,23	198,5	23,79

tab. 17 Resa di estrazione di polpa *Citrullus lanatus*

Campioni	Peso Pianta (g)	Peso Estratto (g)	Resa %
Brasile	1589,37	290,37	18,26
Costa Rica	2237,87	323,93	14,47
Ecuador	835,37	255,03	30,53
Latina	792,05	158,02	19,95
Lamezia Terme	577,00	154,00	26,68
Crotone	580,5	161,00	27,33
Romania (giugno)	582,5	160,45	27,54
Romania (luglio)	790,14	203,14	25,71
Romania (settembre)	894,25	216,50	24,21

3.2.2 Analisi chimica

3.2.2.1 Determinazione dei polifenoli totali metodo Folin-Ciocalteu

20 mg di estratto sono stati disciolti in 10 ml di una soluzione di etanolo/HCl (95:5) e mantenuti a 60 °C (bagno d'acqua) per 1h, successivamente lasciati raffreddare a temperatura ambiente e poi omogeneizzati. A 200 µl (tre repliche) di soluzione introdotti nei tubi di prova a vite, sono stati aggiunti 1,0 ml di reagente Folin-Ciocalteu e, dopo 3 minuti, sono 1,0 ml di Na₂CO₃ (7,5%). La preparazione è stata mantenuta a 40 °C bagno d'acqua) per 30 minuti. La curva di calibrazione è stata determinata con sette standard con concentrazioni che vanno da 50 a 1200 µg/ml. L'assorbimento a 726 nm è stato misurato (Pectrophotometro Perkin-Elmer Lambda 40 UV / VIS) e il tenore totale di fenolo espresso in mg di equivalenti di acido clorogenico (CAE) per g di materiale fresco (FW). Per il calcolo del contenuto in fenoli totali, è stata necessaria la determinazione di una curva di taratura ottenuta da concentrazioni note di acido clorogenico (10-1000 µg/ml). (Fig. 8).

L'equazione della curva è la seguente: $y = 0,0015x + 0,3701$, $r^2 = 0,996$

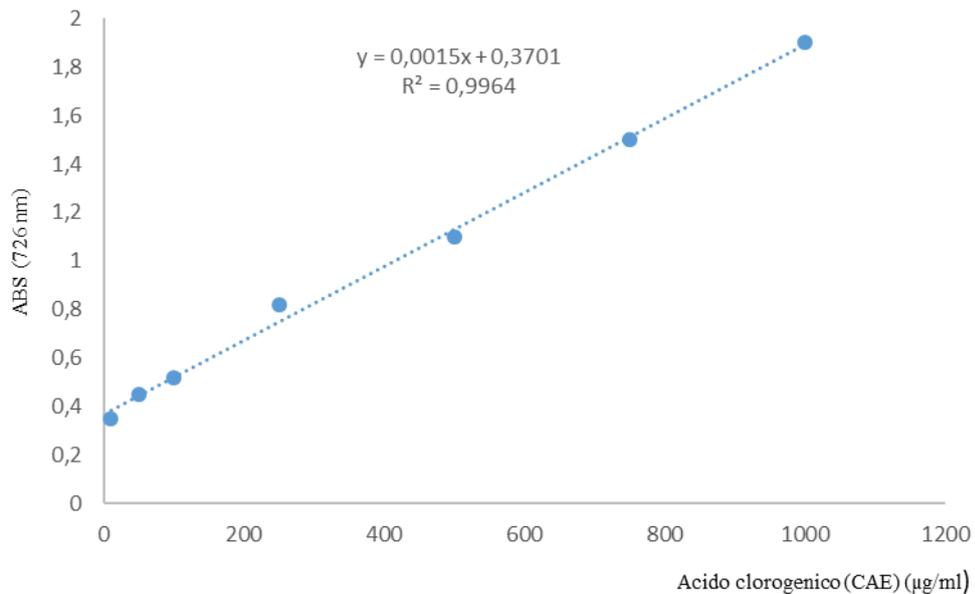


Fig. 8 Retta di taratura acido clorogenico (CAE)

3.2.2.2 Determinazione dei flavonoidi totali

Il contenuto di flavonoidi totali è stato valutato attraverso un saggio colorimetrico basato sulla formazione di un complesso flavonoide-alluminio (Quettier Deleu et al, 2000). 1 ml di EtOH è stato aggiunto a 2 mg di estratto e dopo 5 minuti di incubazione è stata aggiunta una soluzione acquosa al 2% di $AlCl_3$. La miscela è stata lasciata al buio per 15 minuti. La curva di calibrazione è stata determinata con sette concentrazioni standard, che vanno da 25 a 900 $\mu g/ml$. Il principio del metodo si basa sulla formazione di un complesso flavonoide –alluminio con massimo assorbimento proprio a 430 nm. Il contenuto totale di flavonoidi è stato espresso in mg quercetina equivalente (QE) per g di materiale fresco (FW). (Fig. 9).

L'equazione della retta per i flavonoidi è $y = 0,0018x + 0,2974$, $r^2 = 0,996$

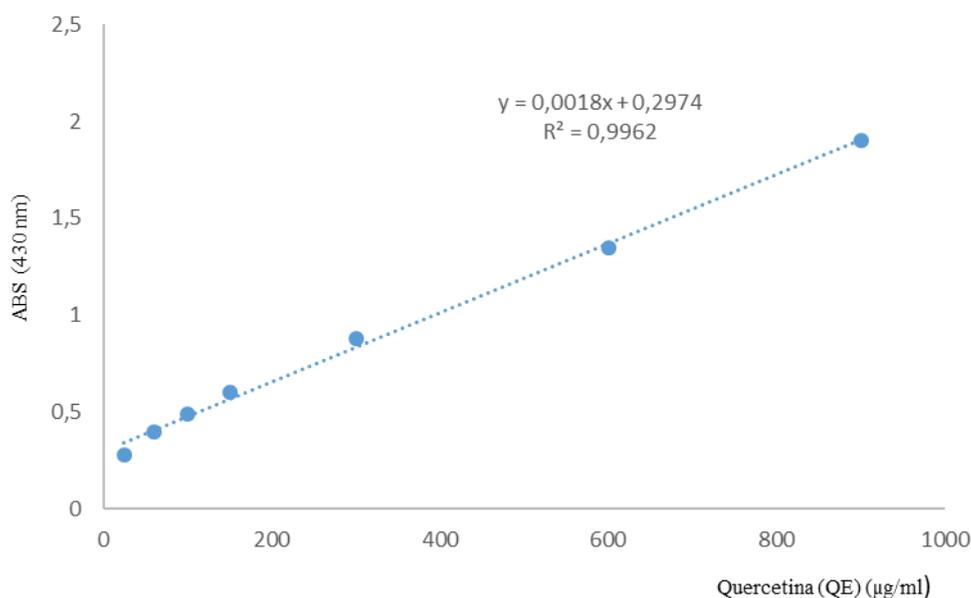


Fig. 23 Retta di taratura quercetina (QE)

3.2.2.3 Dosaggio licopene

Il contenuto del licopene è stato determinato con il metodo di Davis et al (2003) a cui sono state apportate alcune modifiche. Circa 0,6 g di campione sono stati pesati e trattati con: 5 ml di acido ascorbico 1%, 5ml di EtOH al 95% e 10 ml di esano. I campioni così preparati sono stati centrifugati a 400 giri per 15 minuti a 4 °C. Successivamente sono stati aggiunti 3 ml di acqua distillata e lasciati a temperatura ambiente per permettere la separazione delle fasi. L'assorbanza della fase superiore è stata misurata a 503 nm in cuvette di quarzo utilizzando uno spettrofotometro. La curva di taratura è riportata nella Fig. 10. La lettura del bianco è stata effettuata con l'esano. Il contenuto di licopene è stato valutato tramite la seguente equazione:

$$\text{Licopene (mg/kg polpa)} = (\text{ABS}_{503} \times 31,2) / \text{polpa (kg)}$$

dove A_{503} rappresenta assorbanza della fase superiore

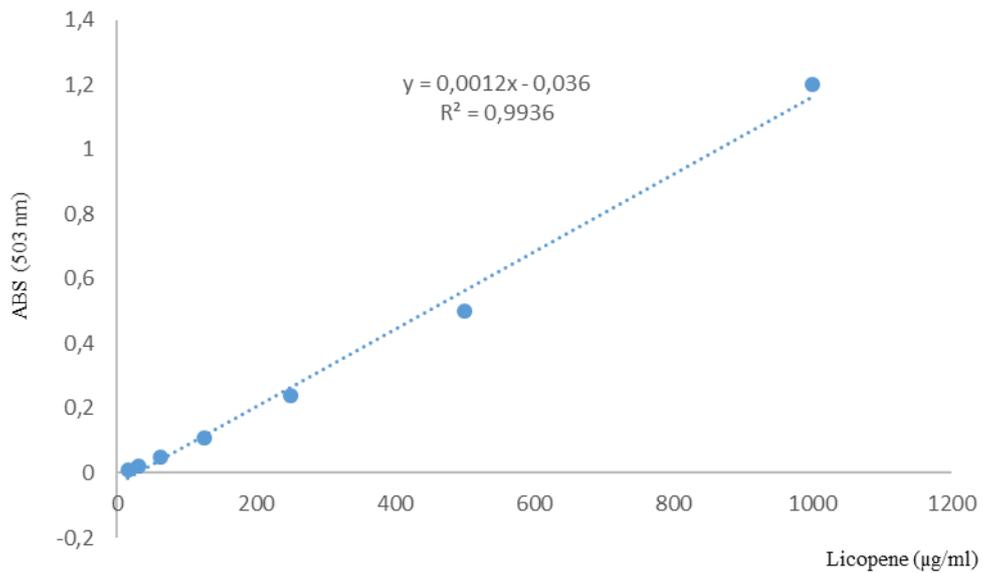


Fig. 10 Retta di taratura licopene

3.2.2.4 Determinazione della L- citrullina

Per la determinazione della L – citrullina è stato ottimizzato il protocollo di Liu et al, 2010. 3g di polpa fresca sono stati estratti con 15 ml di una soluzione di metanolo e HCl 6 M (9:1) a 55 °C per 20 minuti in un bagnetto. Il campione è stato trattato con 5 g di carbonio attivo filtrato e successivamente diluito con acqua distillata. Ad 1 ml della soluzione diluita sono stati aggiunti 4 ml di acqua distillata, 2 ml di una soluzione (3:1) di acido solforico e acido fosforico e 0,25 ml diacetil-monoxime. La soluzione ottenuta è stata agitata e riscaldata a 100 °C per 30 minuti. La concentrazione del campione finale è stata determinata a 490 nm utilizzando uno spettrofotometro. La curva di taratura è riportata nella Fig. 11. Il contenuto di citrullina è stato calcolato utilizzando una curva di calibrazione di un campione standard di citrullina, utilizzando la seguente equazione:

$$\text{citrullina (g/kg)} = (0,1288 \text{ ABS} + 0,0044) \times F$$

dove F rappresenta il fattore di diluizione.

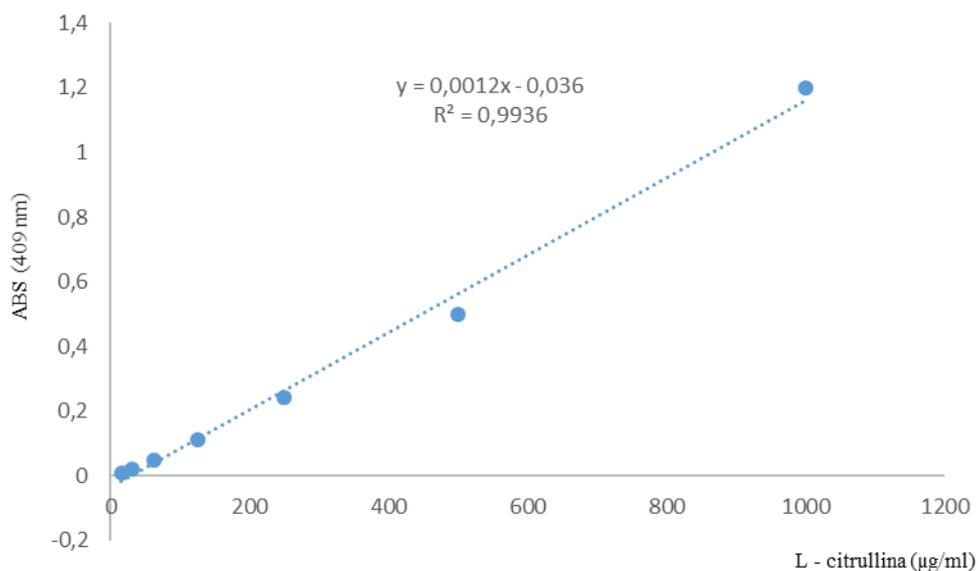


Fig. 11. Retta di taratura L-citrullina

3.2.2.5 Determinazione della Vit. C

Il contenuto in Vit. C viene stato acquisito attraverso la metodica di Nweze et al (2010). Le titolazioni sono state ripetute in triplicato. La concentrazione di acido ascorbico per 100 ml di campione è stata calcolata usando:

Concentrazione di acido ascorbico utilizzato in mg/100 ml:

$$\text{Vit C (mg/100ml)} = [\text{Concentration standard (mg/ml)} / \text{Peso campione g}] \times 1000$$

3.2.2.6 HPLC – UV- DAD

La composizione fitochimica dell'estratto idroalcolico di bulbi di lampascioni è stata studiata mediante cromatografia liquida ad alta prestazione accoppiata a rilevatore UV (HPLC-UV-DAD). Per HPLC-UV-DAD, una quantità appropriata di estratto idroalcolico è stata portata a secco sotto pressione; il residuo secco è stato disciolto in 1 ml di metanolo a gradiente HPLC, la miscela è stata centrifugata e, la risultante soluzione chiara, analizzata.

L'analisi è stata effettuata utilizzando un sistema HPLC semi-preparatorio Varian LC-940 (Varian, Leinì, Turin, Italia) dotato di un sistema binario a pompa, un campionatore automatico, un collettore di frazioni, un rilevatore UV-DAD operante a $\lambda = 290$ nm e un modulo di scala analitico / semi-preparativo (volume della testa delle pompe 10 ml). Separazioni analitiche sono state effettuate usando una colonna Kinetex PFP (100 mm \times 3 mm, pori 100 Å, dimensione delle particelle 5 μ m) (Phenomenex, Castelmaggiore, Bologna, Italia). Sistema solvente: (A) 0,05% acido formico acquoso, (B) 0,05% in acetonitrile al 100%. Programma di sfumatura: 0-5 minuti, B = 10%; 5-30 minuti B = 10-90%, 30-40 minuti B = 90%. Flusso 1,6 ml/min (colonna XRs). Volume dell'iniezione: 10 μ l.

3.2.2.7 GC-MS

Per analisi GC-MS l'estratto secco è stato sottoposto a silanizzazione usando 70 μ l di BTSFA, 30 μ l di piridina e 100 μ l di acetato di etile (T = 70 °C, 4 ore). 1 μ l di questa soluzione è stata iniettata nel sistema GC-MS. L'analisi di GC-MS è stata effettuata su un Bruker Scion SQ dotato di un singolo quadrupolo e di una colonna Varian FactorFour Varian (VF-5 ms, 30 m, 0,25 mm i.d, spessore film 0,25 μ m). La temperatura del forno è stata inizialmente impostata a 60 °C (tempo di attesa 3 minuti) con gradiente da 60 a 120 °C (8,0 °C/min, mantenimento 1 min), quindi da 120 °C a 280 °C (4 °C min, 1,5 min) e da 280 °C a 330 °C (10 °C/min, 2 min). Temperatura iniettore 250 °C, flusso di colonna a 1,00 ml/min. Il gas trasportatore era elio 5,5; energia di ionizzazione 70 eV; il rapporto *split/splitless* è stato impostato a 1:30 dopo 40 s. L'acquisizione dei dati è stata eseguita in scansione completa (m/z 50-1200) in impatto elettronico (EI) da 3 a 60 min. Volume di iniezione: 1 μ l.

3.2.2.8 HPLC

HPLC è stato eseguito con un sistema DGU-14A di Shimadzu (Kyoto, Giappone) dotato di una pompa di liquido cromatografia LC-10AT-VP modello, un autoinjector e un rilevatore di array a diodi. Il software Shimadzu è stato utilizzato per calcolare le aree di picco. I composti sono stati separati su una colonna Spherisorb ODS1 da Waters Instruments (MA, USA). La fase mobile era un gradiente preparato con acido acetico acquoso al 2%, pH 2,58 (componente A) e acetonitrile (componente B). La composizione del gradiente (tab. 18), ha permesso la separazione della maggior parte dei composti fenolici di interesse. Il volume di iniezione era di 20 µl (siringa Hamilton, Reno, NV, USA), la portata della fase mobile 1 ml/min la lunghezza d'onda di rilevamento 285 nm. Gli standard di naringina, naringenina ed esperedina sono stati misurati nelle medesime condizioni.

tab. 18 Gradiente di solventi

Tempo (min)	A %	B %
0 - 15	100	0
15 - 45	100 - 70	0 - 30
45 - 50	70 - 0	30 - 100
50 - 55	0	100
55 - 60	0 - 100	100 - 0
60 - 90	100	0

3.2.2.9 Attività antiossidante metodo DPPH

L'attività antiossidante è stata determinata attraverso il dosaggio del 1,1-difenil-2-picryl-idrazil (DPPH) utilizzando un metodo adattato da Marrelli et al., 2014. A 800 µl di una soluzione alcolica di DPPH• (1×10^{-4} M) sono aggiunti 200 µl di campione a diverse concentrazioni (5mg/ml; 2,5 mg/ml; 1,25 mg/ml; 0,5 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,125mg/ml.). Come controllo positivo è stata utilizzato un noto antiossidante di sintesi, il Trolox (Sigma-Aldrich St. Louis, USA) alle stesse concentrazioni dei campioni, mentre come controllo negativo è stata impiegata una soluzione alcolica di DPPH• 1×10^{-4} M in cui l'estratto è stato sostituito da un'aliquota corrispondente dell'opportuno solvente.

I campioni così ottenuti sono stati posti al buio per 30 minuti, in seguito la lettura è stata fatta alla lunghezza d'onda di 517 nm. L'attività antiossidante dell'estratto (e del Trolox) è stata calcolata in relazione alla diminuzione di assorbanza che si osserva in seguito alla cattura del radicale; più precisamente come percentuale di inibizione della formazione del radicale DPPH• secondo la seguente equazione:

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = [(ABSc - ABSe) / ABCc] \times 100$$

dove ABSc = assorbanza del controllo ABSe= assorbanza dell'estratto

3.2.2.10 Attività antiossidante metodo β -carotene bleaching test (BCB)

La metodica è stata effettuata aggiungendo 1,5 ml di soluzione di β -carotene (0,5 mg/ml) in cloroformio a 0,04 ml di acido linoleico e 0,4 ml di tween-20 al 100%. La miscela poi è stata posta ad evaporazione a 40 °C per dieci minuti al fine di rimuovere il cloroformio.

Il cloroformio è stato rimosso tramite evaporazione al Rotavapor R-220 SE (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Svizzera) a 40 °C per 10 minuti. circa. Successivamente sono stati aggiunti lentamente 150 ml di H₂O distillata per ottenere una emulsione omogenea. A 5 ml di quest'ultima (in triplicato) sono stati aggiunti 200 μ l di soluzione di estratto a diverse concentrazioni (120, 60, 30, 15, 8, 4, 2, 0,5 mg/ml) e per ogni campione preparato sono state effettuate tre letture allo spettrofotometro: t (0), a t = 30 minuti e t = 60 minuti (previa incubazione, in quest'ultimo caso a 50 °C alla lunghezza d'onda di 470 nm).

Come controllo positivo è stato utilizzato il Trolox solubilizzato in acqua alle concentrazioni dei campioni, mentre il controllo negativo era composto solamente dall'emulsione precedentemente descritta, in cui la frazione di estratto è stata sostituita da una pari quantità di acqua. L'attività antiossidante dell'estratto (e del Trolox) è stata espressa come percentuale di inibizione dell'ossidazione del β -carotene secondo l'equazione riportata di seguito (Kumazawa et al., 2002).

L'attività antiossidante (AA) è stata calcolata usando la seguente equazione:

$$AA\% = [(ABS_0 - ABS_e) / ABS] \times 100$$

dove ABS₀ assorbanza controllo; ABS_e assorbanza estratto

3.2.3 Saggi enzimatici *in vitro*

3.2.3.1 Determinazione dell'inibizione della lipasi pancreatica

La lipasi è secreta nel duodeno attraverso il dotto pancreatico ed è responsabile del 50-70% dell'idrolisi totale dei grassi alimentari. I principi attivi in grado di inibire le lipasi, gli enzimi deputati all'idrolisi dei grassi alimentari, assumono un ruolo di particolare importanza nell'ambito dei trattamenti farmacologici dell'obesità. Questi composti intervengono nel primo step del metabolismo degli acidi grassi, inibendo il loro assorbimento intestinale e il loro accumulo da parte dell'organismo (Birari and Bhutani, 2007). L'inibizione dell'attività della lipasi pancreatica viene valutata spettrofotometricamente utilizzando come substrato il p-nitrophenyl octanoate (p-NPO), estere cromogenico. La lipasi possiede un'elevata affinità per questo substrato ed andrà ad idrolizzare il legame estereo tra il p-nitrofenolo e la molecola di acido grasso; l'enzima mostra la massima attività in condizioni alcaline (Yeoh et al, 1986; Mrdaković et al, 2008). L'attività dell'enzima viene misurata monitorando l'idrolisi del p-NPO; il cromogeno giallo rilasciato, il p-nitrofenolo, quantificabile (Bendicho et al. 2001). Come controllo positivo viene usato l'orlistat. Orlistat, noto anche come tetraidro-lipostatina, inibisce in modo irreversibile circa il 30% dell'attività delle lipasi gastrointestinali e pancreatica presenti nel lume intestinale, prevenendo in tal modo l'assorbimento del 30 % circa dei trigliceridi introdotti con la dieta. L'orlistat ha una struttura molto simile ai trigliceridi, per i quali la lipasi ha grande affinità. Si crea pertanto un legame molto stabile tra orlistat e lipasi, tanto da non poter permettere la reversibilità del fenomeno entro i normali tempi di transito del bolo intestinale (De Cristofaro et al. 2002). I risultati positivi ottenuti con l'orlistat hanno promosso la ricerca di nuovi inibitori della lipasi pancreatica che non presentino gli effetti collaterali legati all'assunzione di questo farmaco, quali ad esempio flatulenza e incontinenza fecale (De Cristofaro, 2002).

Una soluzione acquosa (3 mg/ml) è stata preparata da pancreas suina di tipo II grezzo (Conforti et al., 2012). Si è quindi preparata una soluzione di p-NPO di 7,5 mmol/l in dimetilsolfossido (DMSO). La composizione della miscela di reazione era la seguente: 100 µl di 7,5 mmol/l di p-NPO, 4 ml di tampone Tris-HCl (pH = 8,5), 100 µl di estratto (concentrazione 400, 250, 100, 55, 30, 5, 2, 0,8, 0,20, 0,05 mg/ml) e 100 µl di soluzione enzimatica. La miscela è stata incubata a 37 °C. Nel controllo, l'estratto è stato sostituito con lo stesso volume di DMSO. Un campione vuoto senza l'enzima è stato preparato per ogni estratto. Orlistat è stato utilizzato per il confronto. L'attività inibitoria pancreatica è stata calcolata utilizzando la seguente formula:

$$\text{Lipase inhibition (\%)} = [(ABS0 - ABSe) / ABS0] \times 100$$

Dove: ABSe è definito come l'assorbanza del substrato, dell'enzima e del campione, ABS0 e l'assorbanza dell'attività enzimatica al 100% sul substrato (senza campione).

3.2.3.2 Determinazione dell'inibizione dell'attività dell'enzima α -amilasi

L'inibizione dell'enzima di α -amilasi è stata valutata usando una versione modificata del metodo utilizzato da Kwon e collaboratori (Kwon et al., 2007). 100 μ l di soluzione campione (concentrazione 400, 250, 100, 55, 30, 15, 5, 2, 0,8, 0,20, 0,05 mg/ml) sono stati aggiunti a 500 μ l di una soluzione enzimatica a concentrazione di 0,5 mg/ml in acqua distillata fredda e 500 μ l di una soluzione di amido a 1% (v/v) in tampone fosfato 0.01 M a pH 7.0. La miscela di reazione è incubata a 37 °C per 5 minuti; la reazione viene arrestata in seguito all'aggiunta di 1 ml del reagente colorante DNS (acido 3,5-dinitrosalicilico all'1% e tartrato di sodio e potassio al 2% in NaOH 0.4 M. La miscela di reazione viene incubata a 100 °C per 5 minuti e l'assorbanza misurata a 540 nm. L'attività inibitoria α -amilasi è stata calcolata utilizzando la formula seguente:

$$\alpha - \text{amylase inhibition (\%)} = [(ABS0 - ABSe) / ABS0] \times 100$$

Dove: ABS0 è definita come l'assorbanza dell'attività enzimatica del 100% (senza campione) e ABSe come l'assorbanza di un campione di prova (con enzima). La concentrazione di acarbosio e estratti vegetali necessari per inibire il 50% dell'attività di α -amilasi nelle condizioni è stata definita come il valore IC₅₀. Sono state calcolate le attività inibitorie di α -amilasi degli estratti vegetali e dell'acarbosio e i suoi valori IC₅₀ sono stati determinati.

3.2.3.3 Coltura cellulare saggio MTT (MCF-7)

La linea cellulare adenocarcinoma del seno umano (MCF-7) è stata ottenuta dalla American Type Culture Collection. Le cellule sono state coltivate in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) integrato con 10% di siero fetale fetale (FBS; Gibco BRL, USA) a 37 °C in un'atmosfera umida contenente 5% di CO₂. Gli estratti di lampascioni non cotti o cotti sono stati disciolti in DMSO e ulteriormente diluiti in DMEM senza FBS per ottenere le concentrazioni finali desiderate (1, 10, 50, 100, 200, 400 e 800 μ g/ml). Sono stati eseguiti controlli appropriati (veicolo) contenenti 0,5% di DMSO. Le cellule di trattamento del giorno sono state spostate in mezzo DMEM con 1% di FBS.

Le cellule MCF-7 sono state seminate in piastre a 48 pozzetti ad una densità di 20x10³ cellule/pozzetto e coltivate in piena media durante la notte. Prima del trattamento, il mezzo di coltura è stato inserito in DMEM F-12 integrato con 1% di FBS e le cellule sono state trattate senza trattamento (veicolo) o trattate con diverse concentrazioni di lampascioni non cotte o lampascioni cotte esplodono per 72 ore. DMSO (Sigma-Aldrich) è stato usato come controllo del veicolo. La vitalità delle cellule è stata misurata utilizzando il saggio di MTT 3(4,5dimethyliazol-2-1) - 2-5-difenil tetrazolio di bromuro (Sigma-Aldrich). Ogni esperimento è stato eseguito in triplice copia e la densità ottica è stata misurata a 570 nm in uno spettrofotometro.

3.2.4 Disegno di studio *in vivo*

La scelta della dose da somministrare a ratti è stata definita attraverso la valutazione dell'IC₅₀ calcolato da *M. comosum* (popolazione) che è risultato il più attivo: IC₅₀ = 70,5 ± 0,89 µg/ml, rispetto all'orlistat IC₅₀ = 57,20 ± 0,19 µg/ml.

Rapportando le due attività (estratto e farmaco), abbiamo presupposto l'utilizzo di una dose di estratto di 20 mg/die (LD) nel rispetto delle dosi suggerite da Ferraz et al, 2004.

È stata inoltre prevista una dose di 60 mg/die (HD) al fine di valutare l'attività in sovradosaggio (3 volte superiore a quella indicata) per individuarne una eventuale soglia di tossicità (tab. 19).

Per il *Citrus* (Tacle®), è stata determinata la dose seguendo lo stesso schema utilizzato per il *Muscari*. In tal senso, la dose suggerita è stata di 20 mg/die. Si è scelto di non effettuare la dose HD perché i dati di letteratura hanno ampiamente fornito chiarimenti sul genere *Citrus*.

tab. 19 Dosi estratto *M. comosum* e *Citrus* (Tacle®)

Ferraz et al, 2004 (orlistat)	Pancreatic lipase inhibition bulb (LD)	Pancreatic lipase inhibition bulb (HD)	Pancreatic lipase inhibition <i>Citrus</i>
16 mg/die (800 mg/kg)	20 mg/die (1000 mg/kg)	60 mg/die (3000 mg/kg)	20 mg/die (1000 mg/kg)

IC₅₀ orlistat: 57,20±0,19 µg/ml; IC₅₀ estratto bulbi: 70,5±0,89 µg/ml; IC₅₀ estratto Tacle®: 67,2±0,30 µg/ml

L'alta dose è stata calcolata a 3 volte il valore di dose attiva per escludere/valutare tossicità dell'estratto in caso di sovradosaggio.

L'estratto acquoso è stato evaporato e, il residuo secco è stato risospeso in metanolo al 100%, centrifugato (6000 rpm, d = 10 cm) e sottoposto a analisi successiva (soluzione di prova).

L'estratto idroalcolico di bulbi di *M. comosum* è stato somministrato per via orale a due diverse dosi di 20 mg/die (basse dosi, LD) o 60 mg/die (dosi elevate, HD).

Lo studio è stato eseguito su ratti Wistar (Envigo - Udine, Italia). Il peso medio degli animali prima dell'inizio del trattamento era 260 ± 11 g. Gli animali sono stati alloggiati individualmente in gabbie metaboliche, in condizioni di luce e temperatura controllate, alimentate da un libero accesso al cibo e all'acqua.

Tutti i protocolli sono stati condotti in conformità alla Dichiarazione di Helsinki, alla legge italiana (DL 26/2014), alla Guida per la cura e l'uso degli animali da laboratorio pubblicati dagli istituti nazionali di salute degli Stati Uniti (2011) e dalla direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo sulla protezione degli animali utilizzati per la scienza. Il progetto è stato approvato dal Ministero della Salute italiano, Roma e dal comitato di revisione etica.

Le diete utilizzate per lo studio sono state acquistate da Envigo (Udine, Italia).

Dieta 2018 è stato utilizzato come dieta normolipidica, (SD, dieta standard) (6,2% di grassi kcal, 18,6% di proteine kcal, e il 44,2% kcal di carboidrati), mentre Teklad dieta TD 06414 è stato utilizzato come dieta ipercalorica, (HFD, dieta ricca di grassi) (60% di grassi di kcal, 18,3% di proteine di kcal e 21,7% di carboidrati di kcal).

I ratti sono stati assegnati in modo casuale a 4 gruppi sperimentali differenti (n = 5 per ciascun gruppo):

- 1) Gruppo SD (alimentato con SD)
- 2) Gruppo HDF (alimentato con HFD)
- 3) Gruppo HFD + LD (alimentato con HFD e basse dosi dell'estratto, LD)
- 4) Gruppo HFD + HD (alimentato con HDF e dosi elevate dell'estratto, HD)

I gruppi sperimentali sono stati sottoposti alla loro dieta specifica per 12 settimane; le soluzioni estratte (LD o HD) sono state somministrate per via orale ogni giorno per 12 settimane. Al termine del trattamento è stata eseguita un'analisi del plasma.

3.2.4.1 Variabili antropometriche

Il peso corporeo, la circonferenza della vita e la lunghezza del corpo di ogni ratto sono stati misurati settimanalmente; l'assunzione di cibo e acqua è stata registrata ogni giorno. La lunghezza del ratto è stata valutata misurando la distanza del naso-base coda, secondo Okamura et al (2013). BMI è stato calcolato come riportato da Panchal et al. (2012). Dopo il sacrificio animale, il cuore, il fegato e diversi tipi di tessuto grasso (addominale, perirenale, epididimale, retroperitoneale) sono stati rimossi e ponderati separatamente. L'indice somatico cardiaco (CSI) è stato calcolato come rapporto tra il peso corporeo e il peso animale, moltiplicato per 100.

3.2.4.2 Istologia del tessuto grasso

I campioni addominali di grasso e fegato da SD, HFD, HFD + LD e HFD + HD trattati con ratti sono stati tagliati e fissati in M.A.W. (metanolo: acetone: acqua = 2: 2: 1), disidratato in etanolo graduato, schiarito in xilolo, incorporato in paraplant (Sherwood, St. Louis, USA) e sezionato in serie a 8 µm (Amelio et al, 2013). Le sezioni sono state posizionate su slitte Superfrost Plus (Menzel-Gläser, Braunschweig, Germania), verniciate e colorate con ematoxilina ed eosina (EE) per una valutazione generale dei tessuti. L'area di Adipocyte del grasso addominale è stata calcolata su 8 immagini selezionate casualmente per ciascun gruppo, utilizzando ZEN Lite 2012-ZEISS. I valori rappresentano i mezzi ± SEM delle misurazioni per l'area di ogni adipocita presente nell'immagine.

3.2.4.3 Misura biochimica del sangue

Il sangue per l'analisi del plasma è stato raccolto prima del sacrificio attraverso la vena della coda e centrifugato a 4 °C per 15 minuti a 4000 giri entro 30 minuti dalla raccolta. Una aliquota del plasma è stata refrigerata a 4 °C per l'analisi del glucosio, mentre il restante plasma è stato congelato (-80 °C) per le successive analisi biochimiche. I livelli di glucosio sono stati determinati utilizzando un glucometro (Accuchek, Roche Diagnostics, Germania). Il colesterolo totale, il colesterolo HDL, il colesterolo LDL, i livelli di colesterolo LDL, il livello dell'insulina e del ROS sono stati valutati con i kit di analisi commerciali (immunocompatibilità enzimatica, ELISA). Il colesterolo totale, il colesterolo HDL e il colesterolo LDL sono stati determinati utilizzando un kit di PKL® Pokler Italy. Il colesterolo LDL-Ox è stato determinato utilizzando un kit di Elabscience Biotechnology (WuHan, PRC); I livelli di insulina sono stati valutati attraverso un kit specifico Millipore (St. Charles, MO, USA).

3.2.4.4 Homa Index

L'indice HOMA (*Homeostasis Model Assessment*) è un'indicazione della sensibilità basale dell'insulina e quindi della resistenza all'insulina. È stato calcolato secondo Matthews et al., 1985. I ratti di controllo (gruppo SD) sono supposti per avere una HOMA-IR media di 1. Questo indice è stato calcolato dal prodotto del glucosio plasmatico a digiuno (FPG) e l'insulina al plasma di digiuno (FPI), divisi per una costante come segue: $HOMA-IR = (FPG \text{ (mUI/ml)} \times FPI \text{ (mg/dl)})/2,430$ (Chaco et al., 2008).

3.2.4.5 Western Blot: enzimi gluconeogenici/gluconeogenesi

Campioni di fegato sono stati prelevati da ciascun gruppo sperimentale, sono stati sezionati e omogeneizzati in tampone di lisi RIPA ghiacciato (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) contenente una miscela di inibitori della proteasi e fosfatasi (1 mmol/l aprotinina, 20 mmol/l fenilmetilsolfonilfluoruro, e 200 mmol/l di sodio ortovanadato). I campioni sono stati centrifugati a 15000 giri a 4 °C per 25 minuti e i surnatanti sono stati raccolti per l'analisi di immunoblotting. La concentrazione delle proteine è stata determinata utilizzando il metodo di Bradford secondo le istruzioni del produttore (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA).

Eguali concentrazioni di proteine (30 µg) sono state separate su SDS-PAGE al 10%, trasferite su una membrana PVDF (RPN303F, GE Healthcare) e successivamente bloccate con latte secco senza grassi e incubate per una notte a 4 °C con anti-fosfoenolpiruvato carbossichinasi (PEPCK) (1:1000) o anti-glucosio-6-fosfatasi- α (G6Pase- α) (1:250) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), usati come anticorpi primari. È stato usato l'anticorpo secondario anti-mouse IgG perossidasi - linked (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, Inc) e un anticorpo primario di actina anti- β (1: 1000) come controllo dello scompensamento (Santa Cruz Biotechnology, Inc).

Il segnale chemiluminescente delle macchie è stato rilevato dal sistema Enhanced Chemiluminescence (GE Healthcare, Milano, Italia). Dopo la digitalizzazione degli immunoblots, l'analisi densitometrica delle bande è stata eseguita.

Le aree e l'intensità dei pixel, rappresentata da 256 valori di grigio (0 = bianco, 256 = 282 nero), sono stati valutati. Lo sfondo è stato sottratto. È stato utilizzato NIH IMAGE 1.6 (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland).

3.2.4.6 Perfusione secondo metodica Langendorff

I ratti sono stati anestetizzati con carbamato etilico (2 g/kg di ratto, per via intraperitoneale). I cuori sono stati rapidamente recisi e trasferiti in una soluzione Krebs-Henseleit (KHs) tamponata con ghiaccio fredda. L'aorta è stata immediatamente cannulata con una cannula di vetro e collegata all'apparato Langendorff per iniziare perfusione ad una portata costante di 12 ml/min. Per evitare l'accumulo di liquidi, l'apice del ventricolo sinistro (LV) è stato trafitto. Un palloncino in lattice con acqua, collegato ad un BLPR calibro (WRI, Inc. USA), è stato inserito attraverso il mitrale valvola nel LV per consentire contrazioni isovolumiche e per registrare continuamente parametri meccanici. Il pallone è stato progressivamente riempito con acqua fino a 80 µl a ottenere una pressione diastolica iniziale ventricolare sinistra di 5-8 mmHg. La pressione coronaria è stata registrata utilizzando un altro trasduttore di pressione situato appena sopra l'aorta.

Diversi autori prevedono l'uso come mezzo di perfusione del tampone bicarbonato secondo Krebs e Henseleit (KHs) (Sutherland F.J. et al., 2000) la cui composizione: NaCl 113 nM, KCl 4,7 nM, MgSO₄ 7H₂O 1,2 nM, CaCl₂ 2H₂O 1,8 nM, NaHCO₃ 25 nM, KH₂PO₄ 1,2 nM, Na Piruvato 5 nM, Glucosio 11 nM, Mannitolo 1,1 nM.

I KHs è preparato quotidianamente e deve essere mantenuto ad un pH di 7.4 attraverso la continua ossigenazione con una miscela 95% O₂ e 5% CO₂. Per evitare la precipitazione dei sali di calcio, che potrebbero occludere le arterie coronariche, è consigliabile aggiungere il componente calcio alla fine della preparazione della soluzione. Inoltre il KHs dovrà essere opportunamente filtrato con membrane di nitrocellulosa (millipore) da 0,8 µm al fine di rimuovere le impurità che possono essere presenti anche nei più puri prodotti chimici commerciali. Dal punto di vista metabolico, il cuore perfuso è in grado di utilizzare il glucosio come unico substrato energetico per sopperire alla mancanza degli acidi grassi che, sebbene *in vivo* sono la sorgente primaria d'energia, non possono essere utilizzati nel preparato perché risultano insolubili in soluzioni acquose e danno effetti schiumogeni se sottoposti all'azione di gas (Sutherland et al, 2000).

Le sostanze da testare possono essere aggiunte al KHs alle concentrazioni desiderate, mentre nel caso di composti instabili questi possono essere infusi attraverso un braccio laterale della cannula aortica, regolandone opportunamente la concentrazione.

L'acquisizione dei dati è stata effettuata attraverso un sistema McLab, collegato ad un computer che elabora i dati attraverso il software *Chart 4.2*. Tale sistema consente di registrare i dati sull'hard disk e di visualizzarli graficamente in tempo reale sul monitor. L'interfaccia McLab utilizzata è un sistema a quattro vie, collegato a due trasduttori di pressione, ad una sonda di temperatura e ad un ossimetro. Il primo trasduttore, collegato al palloncino, permette di registrare la pressione del ventricolo sinistro, mentre il secondo misura la pressione coronarica; il terzo canale è connesso ad una termocoppia che consente di monitorare la temperatura durante tutto il corso dell'esperimento; il quarto canale potrebbe essere utilizzato per la misurazione del consumo d'ossigeno mediante un ossimetro i cui elettrodi vanno posizionati a livello della cannula aortica (via d'ingresso al cuore) e dell'arteria polmonare (via d'uscita del perfusato). I trasduttori di pressione vengono calibrati prima dell'inizio di ogni esperimento utilizzando un manometro a mercurio, che permette di impostare sul computer un range fisiologico di valori pressori in mmHg. Il sistema di acquisizione simula un registratore su carta che, secondo la velocità di scorrimento impostata, permette di visualizzare singoli momenti dell'esperimento o il percorso sperimentale per intero.

Il sistema di acquisizione ed elaborazione è impostato in modo tale da calcolare in tempo reale i parametri emodinamici che vengono salvati su un foglio di supporto *Data Pad*. Alla fine della registrazione i dati immagazzinati sul *Data Pad* possono essere trasferiti su un file *Microsoft Excel* per l'elaborazione statistica. I parametri emodinamici rilevanti nel corso di un esperimento sul cuore isolato e perfuso, possono essere distinti in tre classi in relazione alla fase dell'attività cardiaca interessata.

Parametri relativi all'attività sistolica:

- LVP (*Left Ventricular Pressure*), espressa in mmHg, rappresenta un indice della pressione sviluppata dal ventricolo sinistro in condizioni di lavoro isovolumetrico;
- (LVdP/dt) max, espressa in mmHg per s⁻¹ (indicata come Vmax), indica la massima velocità di contrazione sistolica isovolumetrica;
- TTP (*Time To Peak*), espresso in msec, rappresenta il tempo necessario a raggiungere il picco di contrazione sistolica isovolumetrica;
- HR (*Heart Rate*), espressa in battiti/min, rappresenta la frequenza cardiaca;
- RPP (*Rate Pressure Product*), pari al prodotto tra LVP ed HR ed espresso in 10⁻⁴ mmHg/battiti/min, rappresenta un indice del lavoro cardiaco.

Parametri relativi al recupero diastolico:

- LVEDP (*Left Ventricular end Diastolic Pressure*), espressa in mmHg per s^{-1} , è la pressione telediastolica sviluppata dal ventricolo sinistro;
- $(LVdP/dt)_{max}$, espressa in mmHg per s^{-1} (indicata come V_{min}), indica la massima velocità di rilasciamento ventricolare;
- HTR (*Half Time Relaxation*), espresso in msec, indica la metà del tempo necessario al ventricolo sinistro per il completo recupero diastolico;

Il parametro T/t si ottiene dal rapporto tra $+(LVdP/dt)_{max}$ e $-(LVdP/dt)_{max}$ (Fig. 12)

Parametri relativi alla funzionalità coronarica:

- CP (*Coronary Pressure*), espressa in mmHg, è la pressione di perfusione coronarica.

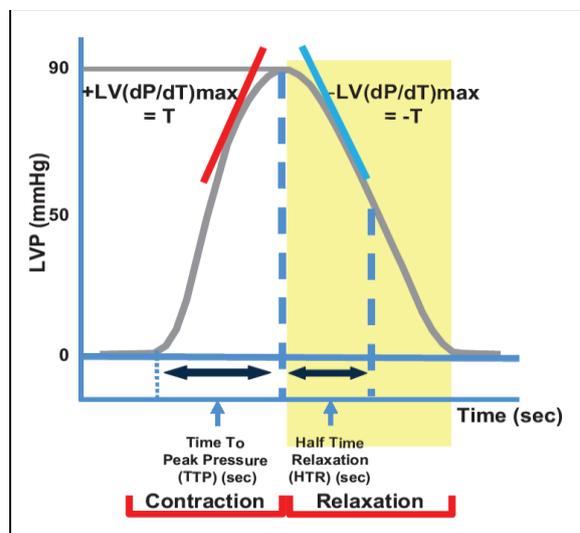


Fig. 1224 Rappresentazione grafica dei parametri emodinamici valutabili mediante il sistema di acquisizione dati *PowerLab* nella metodica Langendorff.

Gli esperimenti, in accordo con i dati riportati in letteratura (Legssyer et al, 1997), sono stati condotti con perfusione retrograda a flusso costante compreso fra 10 e 13,5 $ml/min g^{-1}$ (grammo di cuore fresco). La *performance* cardiaca è stata stabilizzata in circa 15-20 minuti, mentre la durata dell'esperimento è stata determinata dal tipo di protocollo eseguito. Tutti gli esperimenti sono stati realizzati a valori costanti di pH (7,4) e di temperatura ($37^{\circ}C$) e su ciascun cuore è stato testato un singolo protocollo per evitare fenomeni di desensitizzazione.

3.2.4.7 Statistica

Per l'analisi sui dati chimici è stato utilizzato un Tukey's test mentre, per i saggi *in vivo*, l'analisi statistica è stata eseguita usando GraphPad Prism Software® (versione 5.0; Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). I dati sono stati espressi come media \pm SEM (errore standard di media). Sono stati utilizzati, se del caso, un test ANOVA (analisi di varianza) e analisi non-parametrica Kruskal-Wallis di varianza unidirezionale seguito dal test di confronto multiplo di Dunn (per i confronti post-ANOVA). Newman Keuls e Bonferroni sono stati usati per confrontare le curve. Differenze statisticamente significative: $P < 0,05$.

Capitolo 4

Risultati e discussioni

4.1 Premessa

Tra i diversi metaboliti secondari, i polifenoli, che sono generalmente i maggiori componenti nei prodotti vegetali rispetto a tutti gli altri antiossidanti fitochimici (Manach et al, 2004), hanno mostrato di possedere diverse capacità nel modulare meccanismi fisiologici e molecolari, nonché attività biologiche legate al metabolismo energetico per il controllo delle adiposità, obesità e composizione corporea (Meydani and Hasan, 2010; Park et al, 2013, Makarem et al, 2017). Le oramai note proprietà redox, permettono loro di agire come antiossidanti (Conforti et al, 2008; Marrelli et al, 2014; Morales et al, 2014, Hussain et al, 2016), riducendo così, il rischio di concretizzarsi una infiammazione cronica e proteggere i costituenti cellulari dal danno ossidativo coinvolto nella patogenesi di diverse malattie come la resistenza all'insulina, il diabete di tipo 2, le malattie cardiovascolari e neurodegenerative (Cines et al, 1998; Czczot, 2000; Hussain et al 2016; Uttara et al, 2009; Amiot et al, 2016).

In particolare, è stato dimostrato come, il consumo di vegetali ricchi in polifenoli, di cui se ne consiglia un'assunzione alimentare, pari a 1g/die (Hussain et al, 2016), contribuisca a limitare lo sviluppo di lesioni ateromatose, attraverso l'inibizione dell'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità che è alla base del meccanismo chiave nelle lesioni endoteliali che si verificano in aterosclerosi (Cook and Samman, 1996; Loke et al, 2010; Bahramsoltani et al, 2017). Stessa attenzione andrebbe riservata nell'assunzione media giornaliera di flavonoidi che, nei Paesi Bassi è stimata, già dagli anni '90, in 23 mg/die (Hertog et al, 1993), in Finlandia $\approx 2,6$ mg/die e in Giappone 68,2 mg/die (Hertog et al, 1995, Friesenecker et al, 1995, Haenen and Bast, 1999). Diversi autori, tra l'altro, hanno condotto studi sull'intake di flavonoidi, e da quanto emerge dal lavoro di Vogiatzoglou A. et al (2015) l'assunzione media (\pm SEM) di flavonoidi totali in Europa era di 428 ± 49 mg/die, mentre, l'assunzione di flavonoidi più bassa è stata osservata nei paesi mediterranei (95 ± 11 mg/die). La distribuzione del consumo è stata distorta in molti paesi, soprattutto in Germania (assunzione media: 181 mg/die, assunzione mediana: 3 mg/die).

Pertanto, è possibile intuire come, la valutazione del contenuto in polifenoli e flavonoidi all'interno di un alimento o di un suo estratto vegetale, diventi importante, se non fondamentale, quando somministrato ad un paziente con particolari fattori di rischio.

Per tale ragione, la necessità di individuare composti dotati di specifiche attività biologiche da utilizzare ai fini dell'integrazione alimentare o farmaceutica.

A questo proposito l'obiettivo generale del progetto dottorale è stato la realizzazione di un prototipo di integratore alimentare multifunzionale al fine di controllare simultaneamente i principali fattori di rischio della Sindrome Cardiometabolica (SCM) ed essere comunque impiegabile anche in presenza di alcuni di questi.

Nel nostro studio, abbiamo analizzato specie di *M. comosum*, genere *Citrus* e *Citrullus lanatus*. È stato evidenziato la valutazione del contenuto in polifenoli e flavonoidi totali al fine di individuare specie vegetali dotate di massima potenzialità biologica, esplicita, attraverso anche la valutazione dell'attività antiossidante, in termini di significativa attività *in vitro* e *in vivo*.

4.2 *M. comosum*

4.2.1 Analisi chimica

4.2.1.1 Polifenoli, flavonoidi totali, attività antiossidante

Per il genere *Muscari* la scelta prevalente è stata quella di fissare la specie *comosum* e di fare delle valutazioni circa la composizione fitochimica e relativa attività biologica del fitocomplesso in funzione della variabilità ambientale e dell'origine (crescita spontanea o specie coltivata) della droga vegetale scelta: i bulbi. Per i bulbi di lampascioni provenienti da Puglia, Basilicata, Calabria e Marocco, è stato confrontato il contenuto in polifenoli e flavonoidi totali e relativa attività antiossidante attraverso il metodo del DPPH, al fine di selezionare la specie con maggiore attività antiossidante che normalmente è correlata a maggiore attività biologica.

Dai risultati ottenuti, emerge che il contenuto in polifenoli e flavonoidi totali in bulbi provenienti dalla Sila è significativamente maggiore di quello contenuto nei bulbi di altre zone della Calabria e da quelli provenienti dalla Basilicata, seguita dalla Puglia e poi dal Marocco (tab. 20). Per i bulbi silani, i fattori ambientali hanno giocato un ruolo importante nella composizione fitochimica risultante, soprattutto perché di origine spontanea a differenza degli altri che sono stati reperiti in aziende coltivatrici.

Le condizioni climatiche e pedologiche hanno giocato un ruolo importante, sia nel rispetto della maturazione fisiologica del bulbo (tempo balsamico) che nella definizione del metabolismo secondario e relativa composizione fitochimica (Abd EL-Azim and Ahmed, 2009; Bourgou et al, 2010; Queslati et al, 2010; Boscaiu et al, 2010; Al Ahl, 2011; Guedes et al, 2012; Ramakrishna and Ravishankar, 2011; Kroř et al, 2014; Mikulic-Petkovsek et al, 2015). Diversi studi, infatti, hanno dimostrato come le condizioni ambientali possono spingere la pianta verso la produzione di metaboliti secondari specifici o verso una inibizione di questi (Cooper-Driver and Bhattacharya, 1998; Bieza and Lois, 2001; Caldwell et al, 2007) così come, possono influire sulla componente fitochimica, anche le modalità di conservazione e la precoce raccolta dei bulbi (Podsdek, 2007).

La composizione in polifenoli e flavonoidi è stata determinata al fine di correlarla all'attività antiossidante nel fitocomplesso ottenuto. Già altri autori ne avevano rilevato le differenti attività, tutte, significativamente diverse le une dalle altre (Pieroni et al, 2002, Loizzo et al, 2010; Marrelli et al, 2017) e confermato l'estrema variabilità all'interno della stessa specie e la relazione tra contenuto in polifenoli e relativa capacità antiradicalica (tab. 20).

Dai nostri dati emerge che la maggiore attività è esplicita dai bulbi spontanei reperiti in Sila, seguiti da quelli raccolti nella zona presilana di Acri (CS), con valori $IC_{50} = 89,0 \pm 0,10 \mu\text{g/ml}$ ($r^2=0,976$) e $98,0 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$ ($r^2= 0,988$) rispettivamente. Mentre, minore attività è stata rilevata nell'estratto di bulbi provenienti dal Marocco (tab. 20).

tab. 20 Contenuto in polifenoli, flavonoidi totali e attività antiossidante (DPPH test) di bulbi di *M. comosum* di diversa provenienza (anno 2014)

Bulbi	Polifenoli (mgCAE/gFW)	Flavonoidi (mgQE/gFW)	DPPH (IC₅₀) (µg/ml)
Calabria LcS	90,68 ± 0,50 ^a	5,07 ± 0,05 ^a	89,0 ± 0,10 ^a
Calabria LcA	87,52 ± 0,61 ^b	3,45 ± 0,18 ^b	98,0 ± 0,02 ^b
Calabria LcP	87,02 ± 0,28 ^b	3,31 ± 0,26 ^b	118,4 ± 0,04 ^c
Basilicata	78,80 ± 0,45 ^c	3,69 ± 0,09 ^b	202,5 ± 0,05 ^d
Puglia	76,77 ± 0,25 ^d	3,94 ± 0,04 ^c	203,6 ± 0,02 ^e
Marocco	68,32 ± 0,50 ^d	2,01 ± 0,02 ^d	209,6 ± 0,44 ^f

Polifenoli totali sono espressi come mg equivalenti di acido clorogenico (mgCAE) per g di materiale fresco (FW). Flavonoidi totali sono espressi come mg di quercetina equivalente (mgQE) per g di materiale fresco (FW). I dati ($n = 3$) ± SD con lettere diverse all'interno della stessa colonna sono significativamente diverse per $p < 0,05$. Per il controllo positivo del DPPH test, è stato utilizzato il Trolox.

Questi dati hanno indicato la specie silana come quella destinata ad ulteriori approfondimenti fitochimici e biologici. È stata studiata la composizione delle altre parti della pianta (fiori e gambi) al fine di valutare eventuali utilizzi di questi. Dal confronto emerge come il bulbo rispetto a fiori e gambi rappresenta il sito di accumulo e presenta maggiore concentrazione di polifenoli e flavonoidi (tab. 21) e questo, come evidenziato in tabella, porta ad una attività antiossidante espressa in IC₅₀ (µg/ml), significativamente maggiore rispetto a gambi e fiori.

tab. 21 Contenuto in polifenoli, flavonoidi totali e attività antiossidante (DPPH test) di bulbi, fiori e gambi di *M. comosum* di origine calabrese (Sila, 2015)

Bulbi	Polifenoli (mgCAE/gFW)	Flavonoidi (mgQE/gFW)	DPPH (IC₅₀) (µg/ml)
Bulbi	92,47 ± 0,02 ^a	4,57 ± 0,03 ^a	103,4 ± 0,19 ^a
Gambi	11,19 ± 0,05 ^b	7,16 ± 0,08 ^b	139,9 ± 0,27 ^b
Fiori	6,44 ± 0,03 ^c	4,75 ± 0,05 ^c	574,4 ± 0,32 ^c

Polifenoli totali sono espressi come mg equivalenti di acido clorogenico (mgCAE) per g di materiale fresco (FW). Flavonoidi totali sono espressi come mg di quercetina equivalente (mgQE) per g di materiale fresco (FW). I dati ($n = 3$) ± SD con lettere diverse all'interno della stessa colonna sono significativamente diverse per $p < 0,05$. Per il controllo positivo del DPPH test, è stato utilizzato il Trolox.

L'attività redox dei polifenoli, è ulteriormente confermata con il test antiperossidico del β -carotene bleaching test (BCB), in cui, il potere antiossidante è significativamente alto nel bulbo e tende a decrescere lentamente, rispetto ai gambi e ai fiori, dopo ulteriore esposizione di 30' a stress termico (tab. 22).

tab. 22 Contenuto in polifenoli e attività antiossidante (β -carotene bleaching test) di bulbi, fiori e gambi di *M. comosum* di origine calabrese (Sila, 2015)

Campioni	Polifenoli (mgCAE/gFW)	β -carotene 30' (IC ₅₀) (μ g/ml)	β -carotene 60' (IC ₅₀) (μ g/ml)
Bulbi	92,47 \pm 0,02 ^a	91,33 \pm 1,31 ^a	127,83 \pm 1,55 ^a
Gambi	11,19 \pm 0,05 ^b	125,43 \pm 2,18 ^c	285,49 \pm 1,62 ^b
Fiori	6,44 \pm 0,03 ^c	152,66 \pm 2,79 ^b	405,06 \pm 2,10 ^c

Polifenoli totali sono espressi come mg equivalenti di acido clorogenico (mgCAE) per g di materiale fresco (FW). I dati ($n = 3$) \pm SD con lettere diverse all'interno della stessa colonna sono significativamente diverse per $p < 0,05$. Per il controllo positivo del β -carotene bleaching test, è stato utilizzato il Trolox.

Al fine di valutare eventuali trattamenti tecnologici per migliorare la produzione dell'estratto abbiamo valutato la termostabilità del contenuto fitochimico già indagato, dopo trattamento termico. A tal fine abbiamo impiegato i tradizionali processi di trasformazione alimentare (bollitura e cottura a vapore) e determinato contenuto polifenolico, flavonoidico e attività antiossidante post trattamento.

Come è possibile osservare dai dati riportati in tab. 23, il trattamento termico ha comportato una diminuzione nel contenuto fitochimico cercato. I dati di letteratura confermano come il contenuto in polifenoli, e relativa attività antiossidante, diminuisca in modo significativo dopo una normale operazione di cottura (Barros et al, 2007; Vallejo et al, 2003; Vallejo et al., 2005; Locatelli et al., 2017; Armesto et al., 2017) e come le pratiche tecnologiche siano in grado di modificare irreversibilmente la qualità intrinseca di un alimento.

I nostri studi su estratto, hanno provato che i bulbi dopo cottura sono soggetti ad una perdita in contenuto in polifenoli totali significativamente alta, soprattutto nei bulbi sottoposti a (tab 23).

tab. 23 Contenuto in polifenoli e flavonoidi totali e attività antiossidante (DPPH test) in bulbi di *M. comosum* crudi, bolliti e cotti a vapore

Bulbi	Polifenoli (mgCAE/gFW)	Flavonoidi (mgQE/gFW)	DPPH (IC ₅₀) (µg/ml)
Bulbi crudi (RB)	92,47 ± 0,02 ^a	4,57 ± 0,003 ^a	103,4 ± 0,19 ^c
Bulbi a vapore (SB)	49,80 ± 0,01 ^b	1,63 ± 0,01 ^a	359,0 ± 0,9 ^b
Bulbi bolliti (BB)	39,53 ± 0,03 ^c	0,64 ± 0,03 ^b	>500 ^a

Polifenoli totali sono espressi come mg equivalenti di acido clorogenico (mgCAE) per g di materiale fresco (FW). Flavonoidi totali sono espressi come mg di quercetina equivalente (mg QE) per g di materiale fresco (FW). I dati ($n = 3$) ± SD con lettere diverse all'interno della stessa colonna sono significativamente diverse per $p < 0,05$ (T-stu). Per il controllo positivo del DPPH test, è stato utilizzato il Trolox.

Conseguentemente, anche l'attività radical scavenging è significativamente compromessa dopo le procedure tecnologiche di cottura. (tab. 24).

Infatti, dai dati emerge che, i bulbi crudi mostrano un valore di IC₅₀ = 134,0 ± 1,9 mg/ml ($r^2 = 0,992$) significativamente migliore rispetto ai bulbi cotti a vapore (IC₅₀ = 359,0 ± 0,9 mg/ml; $r^2 = 0,982$) e bolliti (IC₅₀ = 963,2 ± 0,4 mg/ml; $r^2 = 0,978$) e che, una correlazione significativa è stata osservata tra il contenuto di fenoli e l'attività antiradicalica (bulbi crudi $r^2 = 0,991$, $p < 0,05$), indicando, quando ampiamente riconosciuto dalla comunità scientifica, la diretta relazione tra alto contenuto polifenolico ed alta attività antiossidante.

I risultati sull'inibizione della perossidazione lipidica con il BCB, mostrati nella tabella 24, si basa sull'ossidazione accoppiata del β-carotene e dell'acido linoleico consentendo di misurare la decolorazione (bleaching) del composto causata dai prodotti di degradazione dell'acido linoleico (inibizione della perossidazione lipidica). Dai risultati ottenuti è confermato quanto precedentemente affermato per il DPPH test, ovvero che i bulbi crudi mostrano attività antiossidante maggiore (IC₅₀ = 91,30 ± 13,1 µg/ml; $r^2 = 0,917$) rispetto a quelli sottoposti a trattamento termico (IC₅₀ = 173,71 ± 9,1 e 148,13 ± 11,4 µg/ml in SB e BB, con $r^2 = 0,985$ e 0,980, rispettivamente).

tab. 24 Contenuto in polifenoli e flavonoidi totali e attività antiossidante (β-carotene bleaching test) in bulbi di *M. comosum* crudi, bolliti e cotti a vapore

Bulbi	Polifenoli (mgCAE/gFW)	β-carotene 30' (IC ₅₀) (µg/ml)	β-carotene 60' (IC ₅₀) (µg/ml)
Bulbi crudi (RB)	92,47 ± 0,02 ^a	91,30 ± 1,31 ^a	77,15 ± 2,99
Bulbi a vapore (SB)	49,80 ± 0,01 ^b	173,71 ± 9,1 ^b	>500
Bulbi bolliti (BB)	39,53 ± 0,03 ^c	148,13 ± 11,4 ^c	>500

Polifenoli totali sono espressi come mg equivalenti di acido clorogenico (mgCAE) per g di materiale fresco (FW). I dati ($n = 5$) ± SD con lettere diverse all'interno della stessa colonna sono significativamente diverse per $p < 0,05$ (t-stu). Per il controllo positivo del β-carotene bleaching test, è stato utilizzato il Trolox.

I bulbi forniti dagli agricoltori locali silani, sono stati raccolti in aree sottoposte a caratteristiche ambientali ben precise, dalle quali è, in definitiva, condizionata la popolazione di bulbi selezionata; i dati in tabella 25 convalidano quanto stimato per i bulbi georeferenziati nella zona del lago Cecita (e mostrati in tab. 23).

L'attività radical scavenging del DPPH test ha mostrato un'azione di inibizione del radicale significativamente più alta rispetto agli altri campioni analizzati ($IC_{50} = 10,2 \pm 2,0 \mu\text{g/ml}$; $r^2 = 0,992$), confermata anche dall'attività antiperossilica BCB, che mostra un valore di inibizione con un IC_{50} pari a $10,80 \pm 7,4 \mu\text{g/ml}$ ($r^2 = 0,921$) a 30 minuti e $81,38 \pm 12,8 \text{ mg/ml}$ ($r^2 = 0,938$) dopo 60 minuti a bagno a 60°C (tab. 25, 26).

I risultati correlano, come precedentemente detto, linearmente il contenuto dei polifenoli e dei flavonoidi all'attività antiossidante misurata sia con il test DPPH sia con il BCB.

Il contenuto totale di fenoli in bulbi di *M. comosum* era $102,89 \pm 0,21 \text{ mgCAE/gFW}$, mentre il contenuto di flavonoidi totale riscontrato è stato di $28,07 \pm 0,88 \text{ mg QE/gFW}$ (tab. 25).

tab. 25 Contenuto in polifenoli e flavonoidi totali e attività antiossidante (DPPH test) in bulbi di *M. comosum* silani (2015, popolazione).

bulbi	Polifenoli (mgCAE/gFW)	Flavonoidi (mgQE/gFW)	DPPH (IC_{50})
Bulbi popolazione	$102,89 \pm 0,21$	$70,5 \pm 0,89$	$46,3 \pm 0,23$

Polifenoli totali sono espressi come mg equivalenti di acido clorogenico (mgCAE) per g di materiale fresco (FW). Flavonoidi totali sono espressi come mg di quercetina equivalente (mg QE) per g di materiale fresco (FW). I dati ($n = 5$) \pm SD con lettere diverse all'interno della stessa colonna sono significativamente diverse per $p < 0,05$ (t-stu). Per il controllo positivo del DPPH test, è stato utilizzato il Trolox.

tab. 26 Contenuto in polifenoli e flavonoidi totali e attività antiossidante (β -carotene bleaching test) in bulbi di *M. comosum* silani (2015, popolazione).

bulbi	Polifenoli (mgCAE/gFW)	β -carotene 30' (IC_{50}) ($\mu\text{g/ml}$)	β -carotene 60' (IC_{50}) ($\mu\text{g/ml}$)
Bulbi popolazione	$102,89 \pm 0,21$	$10,8 \pm 7,4$	$81,4 \pm 12,8$

Polifenoli totali sono espressi come mg equivalenti di acido clorogenico (mgCAE) per g di materiale fresco (FW). I dati ($n = 3$) \pm SD con lettere diverse all'interno della stessa colonna sono significativamente diverse per $p < 0,05$ (T-stu). Per il controllo positivo del β -carotene bleaching test, è stato utilizzato il Trolox.

4.2.1.2 HPLC e GC-MS

I dati relativi alla generica composizione in polifenoli e flavonoidi del fitocomplesso, hanno trovato approfondimento nella componente omoisoflavonoidica che diviene markers fitochimico dell'estratto stesso. Precedenti indagini sui bulbi di *M. comosum* hanno identificato due differenti classi di *homoisoflavonoids*: quelli con una struttura a 3-benzil-4-cromone e quelli appartenenti al tipo scillascillina (Fig. 13) (Mulholland et al, 2013). Tuttavia, in letteratura non sono stati riportati dati relativi alla distribuzione di questi derivati inusuali.

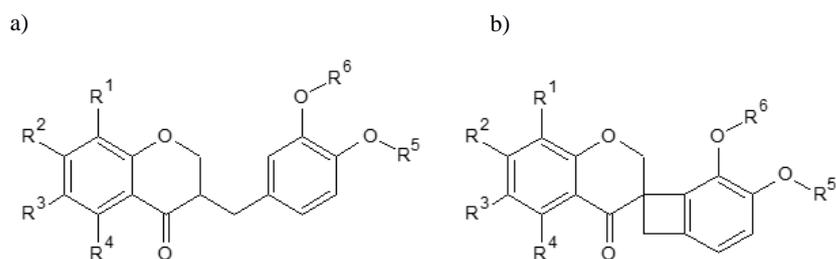


Fig. 13 Struttura base di *homoisoflavonoids* a) 3-benzil-4-cromone b) scillascillina precedentemente identificati in bulbi di *M. comosum*. R1 - R6 = H-, OH-, oppure CH₃O. Fonte Mulholland D.A. et al, 2013 per dettagli

Il profilo fitochimico dell'estratto idroalcolico dei bulbi di *M. comosum* è stato studiato utilizzando una combinazione di differenti tecniche analitiche. Il profilo HPLC-UV-DAD ha presentato più picchi cromatografici generati da sostanze con spettri UV con massimi di assorbimento a circa $\lambda_{max} = 290$ nm, coerente con la presenza di anelli aromatici poli-idrossilati come principali cromofori. (Fig. 14). L'assenza di picchi con massimi di assorbimento a valori λ maggiori ha indicato il contributo minimo delle strutture di flavoni e flavonoli ($\lambda_{max} = 330$ - 390 nm) nella composizione totale di bulbi.

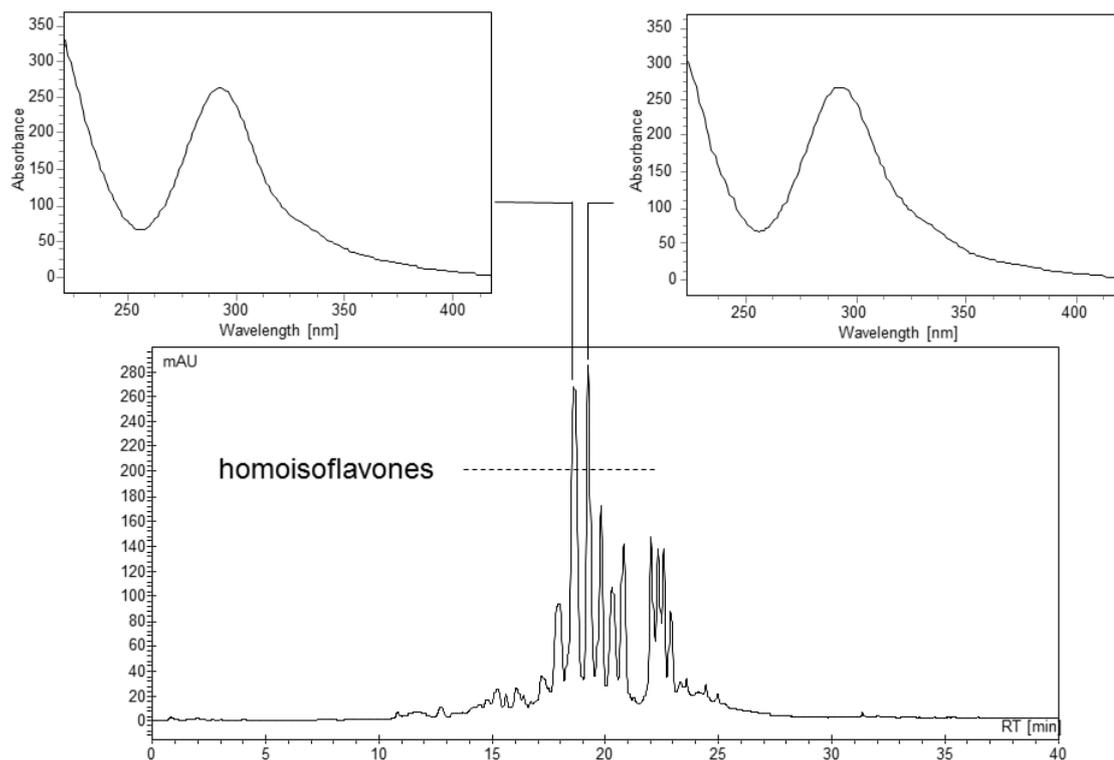


Fig. 14 HPLC-UV-DAD profilo cromatografico di estratto idroalcolico di bulbi di *M. comosum* (osservazione a $\lambda=290$ nm)

Questi risultati sono coerenti con quelli dell'analisi GC-MS (Fig. 15), in cui una serie di picchi è generata da sostanze che condividono un frammento ionico a m/z 179 [$C_{10}H_{15}OSi$]⁺, rilevato nell'intervallo RT 49,7 < RT < 45 minuti.

Questo ione frammento è generato tipicamente da specie contenenti gruppi di cresol O-sililati (Fig. 15b), come quelli presenti negli omoisoflavoni 3o-benzil-4-chromone precedentemente riportati in bulbi di *M. comosum*.

Il picco a $RT = 49,94$ minuti, ha mostrato la presenza dello ione frammento a m/z 179 (picco base) con altri ioni di frammenti minori ma diagnostici a m/z 307 e m/z 337 (-30 uma, perdita di CH_2O). Questi risultati, fusi con quelli precedentemente riportati in letteratura, sono coerenti con la struttura proposta del composto 1 (vedi Fig. 15c).

Il frammento del composto 2, che genera il picco principale a $RT = 51,53$ minuti, ha mostrato la presenza di un frammento diagnostico a m/z 209 [$C_{11}H_{17}O_2Si$]⁺ coerente con la presenza di un ulteriore gruppo metossilico delle suddette parti del trimetil-sililato riportate sopra (Fig. 15c).

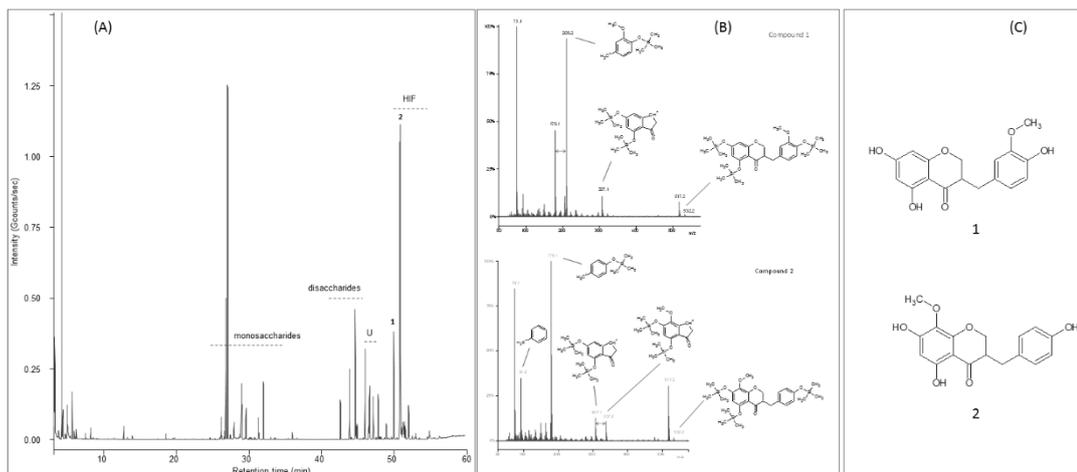


Fig. 15 Analisi GC-MS di estratto idroalcolico di bulbi di *M. comosum* a) profilo cromatografico (total ion current, TIC), b) frammentogramma relativi ai due picchi generati dagli *homioisoflavonoids* 1 (upper panel) e 2 (lower panel) presenti in bulbi c)

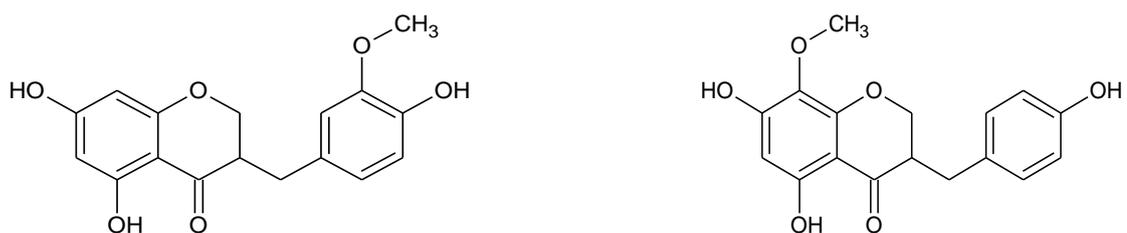


Fig.15c molecole *homioisoflavonoids* identificate

4.2.2 Saggi enzimatici *in vitro*

4.2.2.1 Inibizione di lipasi e amilasi pancreatica di bulbi *M. comsum*

Diversi autori hanno dimostrato come molteplici prodotti di origine naturale possano fornire una vasta opportunità per realizzare estratti dotati di capacità di inibizione dell'enzima lipasi pancreatica. Molti gli autori che indagano sulle potenzialità di estratti di piante spontanee e di piante coltivate da poter utilizzare ai fini clinici (Conforti et al 2012; Marrelli et al, 2014; Sellami et al, 2017) per il controllo del peso corporeo.

La lipasi pancreatica, la cui attività è favorita dalla presenza di bile in duodeno e dai suoi sali biliari con azione emulsionante, scinde i legami dei trigliceridi tra gli acidi grassi in posizione 1 e 3 e il glicerolo permettendo una completa digestione dei grassi. Nel nostro esperimento, gli estratti di bulbi crudi mostravano una significativa azione inibitoria sulla lipasi pancreatica (tab. 27).

tab.27 Inibizione di lipasi e amilasi pancreatica di estratti di bulbi crudi e cotti di *M. comosum*

Bulbi	Polifenoli (mgCAE/gFW)	α -amilase (IC ₅₀)*	lipase (IC ₅₀)**
Bulbi crudi (RB)	92,47 ± 0,020 ^a	58,00 ± 7,0 ^a	73,00 ± 3,01 ^a
Bulbi a vapore (SB)	49,80 ± 0,012 ^b	214,15 ± 1,10 ^b	83,04 ± 3,07 ^b
Bulbi bolliti (BB)	39,53 ± 0,027 ^c	322,03 ± 3,12 ^c	99,54 ± 1,09 ^b

*Acarbose IC₅₀ (positive control) = 36,50 ± 0,32 µg/ml; **Orlistat IC₅₀ (positive control) = 57,20 ± 0,19 µg/ml

Stessa ed interessante attività inibitoria è stata riscontrata per l'amilasi pancreatica responsabile della scissione dei legami α 1-4 glucosidici delle catene di amilosio e amilopectina con conseguente rilascio di monosaccaridi nel lume intestinale. Com'è possibile evidenziare dalla tab.27, l'inibizione di α -amilasi pancreatica da estratti di bulbi cotti e crudi è significativamente a favore dei crudi e all'interno dei cotti, a favore di quelli a vapore con valori IC₅₀ di 16,00 ± 3,01 ($r^2 = 0,939$); 73,04 ± 3,07 ($r^2 = 0,976$) e 69,54 ± 1,09 ($r^2 = 0,970$) µg/ml in RB, SB e BB, rispettivamente. Questi risultati hanno evidenziato l'importanza di *M. comosum* in una dieta ricca di carboidrati, in cui l'azione dell'estratto potrebbe ridurre i livelli di glucosio ematico influenzando positivamente i livelli di glicemia in soggetti diabetici o con alterata intolleranza al glucosio. Per quanto riguarda il campione di *M. comosum* popolazione, recuperato dagli agricoltori silani, gli effetti inibitori della lipasi sono indicati dai valori IC₅₀ di 70,5 ± 0,89 µg/ml ($r^2 = 0,997$). Questo risultato, riportato in tab. 28, dimostra come l'estratto di bulbi abbia un'attività paragonabile al farmaco di riferimento (orlistat) e che, per tale motivo, è stato scelto per determinare la dose di somministrazione *in vivo* nel rispetto delle dosi consigliate da Ferraz et al (2004). Sullo stesso estratto, è stato determinato un valore in IC₅₀ di 46,3 ± 0,23 µg/ml ($r^2 = 0,989$) di effetto inibitore *in vitro* di amilasi pancreatiche suina. Il valore di inibizione (tab. 28) è paragonabile al farmaco di riferimento (acarbose= 36,50 ± 0,32 µg/ml).

tab. 28 Inibizione di lipasi e amilasi pancreatica di estratti di bulbi crudi di *M. comosum* (Sila, 2015, popolazione).

Bulbi	Polifenoli (mgCAE/gFW)	α -amilase (IC ₅₀)*	lipase (IC ₅₀)**
Bulbi (popolazione)	102,89 ± 0,21	46,3 ± 0,23	70,5 ± 0,89

*Acarbose IC₅₀ (positive control) = 36,50 ± 0,32 µg/ml; **Orlistat IC₅₀ (positive control) = 57,20 ± 0,19 µg/ml

4.2.2.2 Attività antiproliferativa su cellule MCF-7 (MTT test) *M. comosum*

Abbiamo valutato gli effetti di diverse concentrazioni di lampascioni non cotti e di lampascioni bolliti (abbiamo scelto di dosare, tra quelli cotti, il campione con più bassa attività) sulla crescita cellulare delle cellule MCF-7 (adenocarcinoma mammario). La partita interessata è stata quella della raccolta del 2015 nella zona parcellata. I risultati del test MTT hanno rivelato che il trattamento con estratti di bulbi non cotti ha esercitato un'inibizione dose-dipendente sulla proliferazione cellulare MCF-7 rispetto alle cellule trattate con veicoli (Fig. 16). Al contrario, gli estratti di lampascioni cotti hanno anche ridotto la viabilità delle cellule MCF-7 ma solo a concentrazioni più elevate. Questi risultati indicano chiaramente che la pratica di cottura influenza chiaramente l'effetto antiproliferativo di lampascioni, riducendo la loro efficacia. Questa considerazione è sostenuta anche dalla differenza chiara tra il valore IC50 degli estratti di lampascioni non cotti (10,27 $\mu\text{g/ml}$, intervallo di confidenza 95%: 9,214-11,25) rispetto a quello degli estratti cucinati (669,3 $\mu\text{g/ml}$, intervallo di confidenza 95%: 517,6 - 865,6).

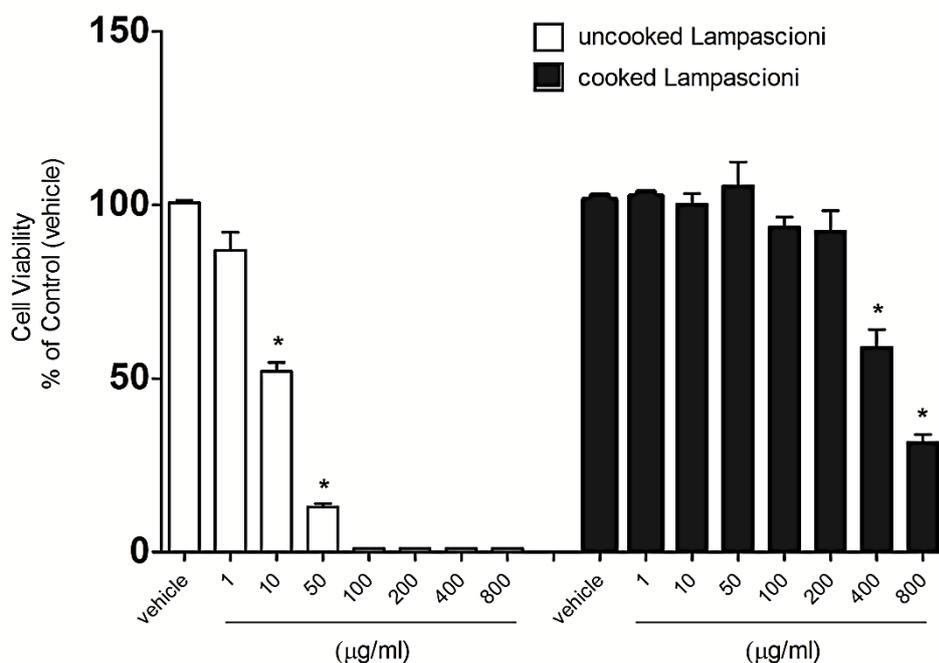


Fig. 16. La vitalità cellulare delle cellule tumorali MCF-7 trattate con estratti di bulbi crudi e cotti (bolliti) di *M. comosum*. Gli asterischi indicano una differenza significativa a $p < 0,05$, rispetto al controllo (veicolo)

4.2.3 Saggi in vivo

4.2.3.1 Animali, parametri antropometrici e metabolici

Il peso corporeo di tutti gli animali all'inizio del trattamento era di 250 ± 2 g. Dopo 12 settimane di trattamento con le diverse diete, il peso corporeo medio dei ratti alimentato con HFD era superiore alla SD, ma significativamente diminuito quando Lc (20 mg) o Lc (60 mg) sono stati somministrati insieme all'HFD (Fig. 17a; Fig. 17b). La circonferenza della vita di tutti gli animali all'inizio del protocollo sperimentale era di $16,6 \pm 0,2$ cm.

Dopo 12 settimane la circonferenza della vita del gruppo HFD era significativamente superiore a quella di Lc (20 mg) e di Lc (60 mg) (Fig. 17b).

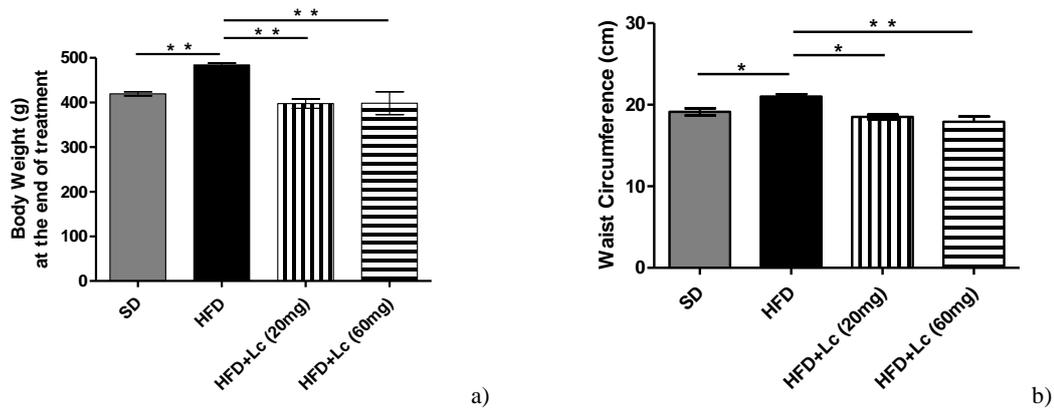


Fig. 25 a) peso corporeo dei ratti con SD (dieta standard), HFD (dieta alto contenuto grassi), o HFD+Lc (20 mg), or HFD+Lc (60 mg) (dieta ad alto contenuto di grassi + estratti a due dosi) alla fine del trattamento. $n=5$ per ogni gruppo, differenza è significativa per: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$, *** = $p < 0,001$ b) circonferenza vita dei ratti con SD, HFD, o HFD+Lc (20 mg), or HFD+Lc (60 mg) alla fine del trattamento. $n=5$ per ogni gruppo, differenza è significativa per: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$

Il grasso di deposito a livello addominale (Fig. 18a), perirenale (Fig. 18b), epididimale (Fig. 18c), e retroperitoneale (Fig. 18d) era significativamente elevato nei gruppi HFD a confronto con SD, Lc (20 mg) and Lc (60 mg).

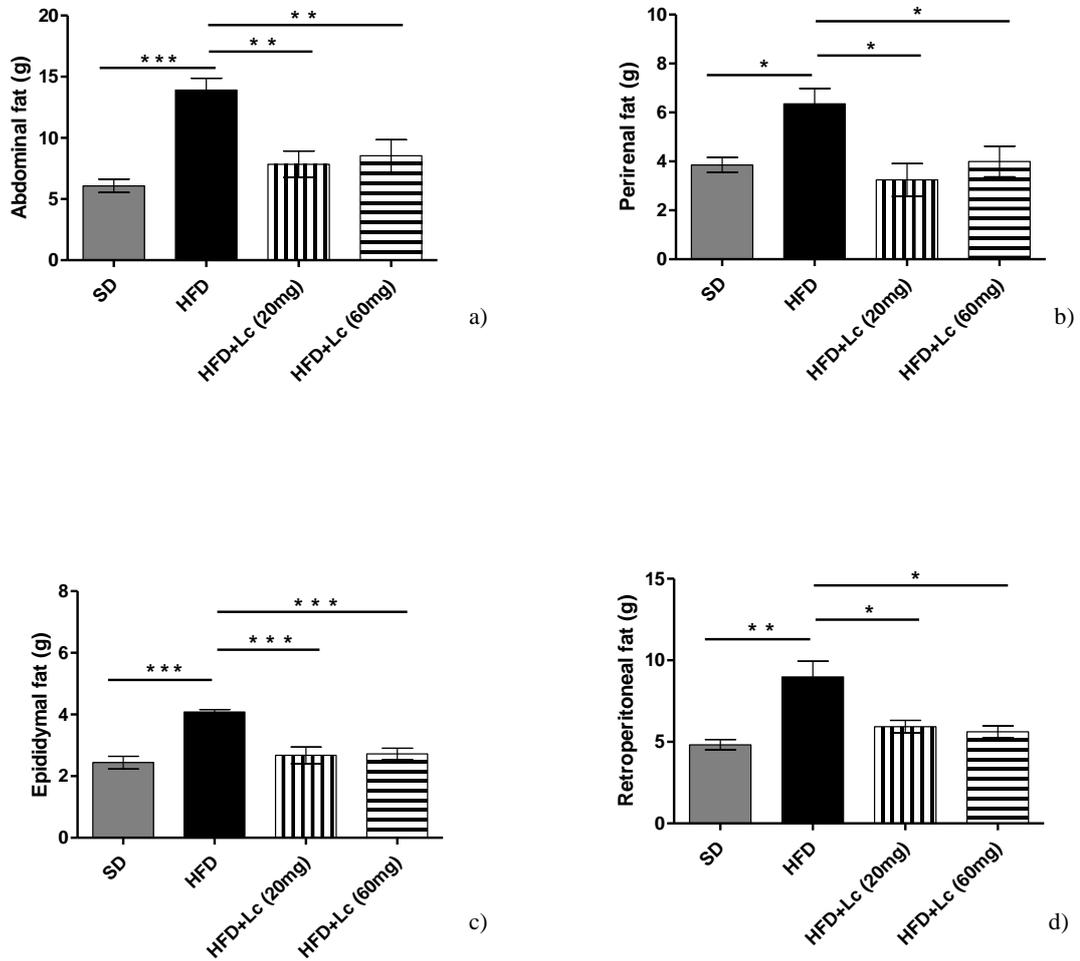


Fig. 18 a) addominale, b) perirenale, c) epididimale, d) retroperirenale in ratti con SD, HFD o HFD+Lc (20 mg) or HFD+Lc (60 mg) per 12 settimane. n= 5 per ogni gruppo, la differenza è significativa: *= p < 0,05, **= p < 0,005, ***= p < 0,001

Il peso del cuore (Fig. 19a) e del fegato (Fig. 19b) e il valore CSI (Fig. 19c) risultavano aumentati in animali HFD rispetto a SD; mentre, la somministrazione di Lc (20 mg) e Lc (60 mg) ha invertito questa alterazione.

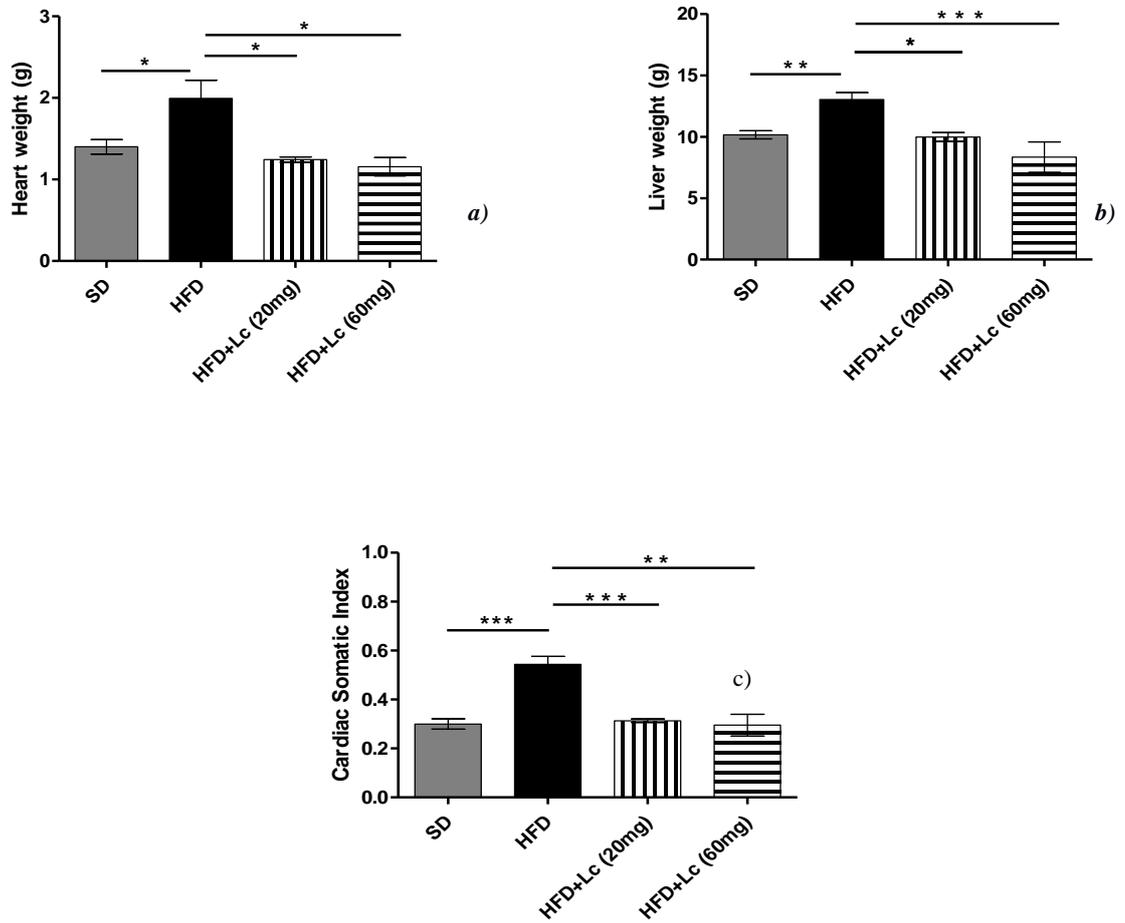


Fig. 19 a) Peso cuore b) peso fegato c) Cardiac Somatic Index (CSI) in ratti con SD, HFD o HFD+Lc (20 mg) o HFD+Lc (60 mg) per 12 settimane, la differenza è significativa: *= $p < 0,05$, **= $p < 0,005$, ***= $p < 0,001$

Non sono state osservate, invece, differenze statisticamente significative in tutti i gruppi sperimentali sull'intake di acqua, di cibo e di lunghezza del corpo durante le 12 settimane di trattamento (tab. 29). Il BMI risulta statisticamente incrementato nel gruppo HFD rispetto al SD, mentre è ridotto nel caso dei gruppi HFD + Lc (20 mg) e HFD + Lc (60 mg) (tab. 29). Nelle tabelle Valori medi \pm SEM, n = 5 per ciascun gruppo; significativo per $p < 0.05$ * = HFD contro SD; \$ = HFD + Lc (20 mg) o HFD + Lc (60 mg) contro HFD.

tab. 29 Variabili antropometriche nei ratti alimentati con SD (dieta standard) o HFD (dieta ad alta percentuale di grassi) o HFD + Lc (20 mg) o HFD + Lc (60 mg) per 12 settimane

Variabili antropometriche	SD	HFD	HFD+Lc (20mg)	HFD+Lc (60mg)
Food intake (g/die)g/die	19,82 \pm 0,08	16,82 \pm 0,12*	15,50 \pm 0,36\$	14,97 \pm 0,41\$
Intake acqua(ml/die)	40,38 \pm 0,97	36,04 \pm 1,59	41,84 \pm 1,69	40,29 \pm 1,55
Lunghezza corpo, (cm)	26,8 \pm 0,3	26,1 \pm 0,19	26,00 \pm 0,16	26,4 \pm 0,37
BMI(Kg/m) ²	5,95 \pm 0,4	6,92 \pm 0,04*	5,95 \pm 0,08\$	5,81 \pm 0,15\$

Dopo 12 settimane, il gruppo HFD mostra un significativo aumento della glicemia basale, dei livelli di insulina plasmatici e dell'indice HOMA rispetto al gruppo SD. Il trattamento con Lc (20mg) e Lc (60 mg) riduce la glicemia basale, l'insulina plasmatica e l'Homa Index (tab. 30).

tab. 30 Variabili metaboliche in ratti alimentati con SD (dieta standard) o HFD (dieta ad alta percentuale di grassi) o HFD + Lc (20 mg) o HFD + Lc (60 mg) per 12 settimane

Variabili metaboliche	SD	HFD	HFD+Lc (20mg)	HFD+Lc (60mg)
Glucosio basale (mg/dl)	112 \pm 9,48	163,8 \pm 3,09*	116,8 \pm 4,37\$	120 \pm 4,82\$
Insulina plasmatica (ng/ml)	2,18 \pm 0,13	7,67 \pm 0,62*	4,40 \pm 0,32\$	3,62 \pm 0,37\$
Homa Index	1	5,18	2,11	1,60

Il colesterolo totale (Fig. 20a), il colesterolo LDL (Fig. 20c), il colesterolo LDL (Fig. 20d) e la produzione ROS (Figura 20e) sono più elevati nel HFD rispetto a tutti gli altri gruppi sperimentali. Il colesterolo HDL presenta una tendenza inversa (Fig. 20b). L'integrazione con sia bassa dose (LD, 20 mg) ed alta dose (HD, 60 mg) è in grado di abolire completamente questi effetti indotti dalla dieta.

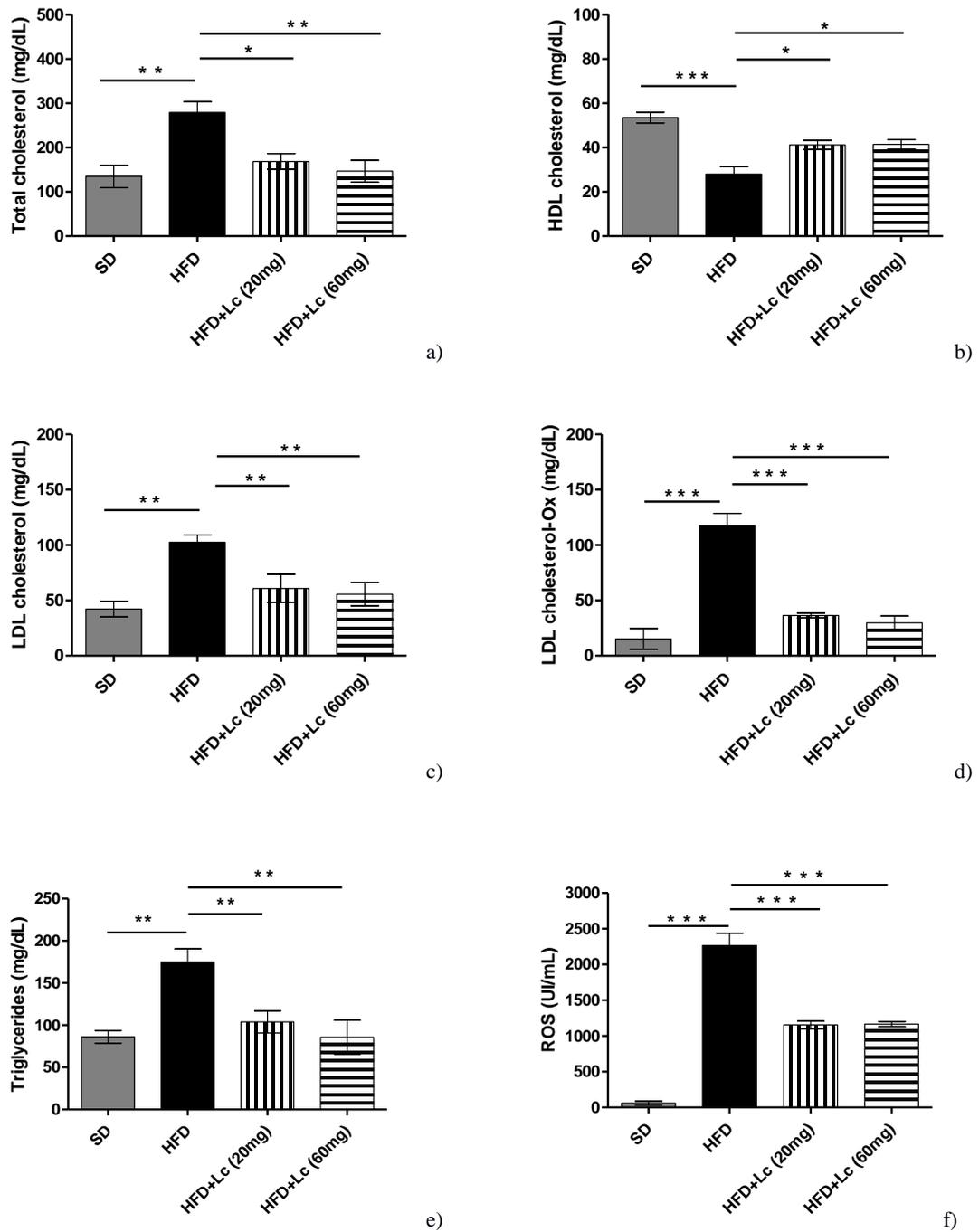


Fig. 20.26 Determinazione plasmatica di: a) colesterolo totale, b) colesterolo HDL c) Colesterolo LDL, d) colesterolo LDL -ox e) trigliceridi, f) ROS in ratti con SD, HFD o HFD+Lc (20 mg) o HFD+Lc (60 mg) per 12 settimane, la differenza è significativa: *= $p < 0,05$, **= $p < 0,005$, ***= $p < 0,001$

4.2.3.2 Istologia dei tessuti adiposi

Da sezioni di adipociti addominali, è evidenziato, in tutte le condizioni, l'aspetto tipico degli adipociti che appaiono come grandi cellule con nuclei periferici e una membrana plasmatica che circonda uno spazio vuoto/chiaro (Fig. 21a). Il confronto tra l'area adipocitaria dei diversi gruppi mostra differenze rilevanti. In particolare, si può osservare un aumento dell'area dopo somministrazione di HFD rispetto all'SD (Fig. 21a). Questo incremento persiste anche nella dieta HFD + LD, ma subisce un significativo decremento dopo la dieta HD + HFD (Figura 21a). Le differenze statistiche sono state mostrate nel grafico (Figura 21a).

I campioni di fegato di ratti SD, HFD, HFD + LD e HFD + HD mostrano differenze nella presenza di vacuoli ricchi di grasso (Fig. 22b). In particolare, dopo la somministrazione di HFD si osserva un forte aumento dei vacuoli grassi (Fig. 22b). La steatosi persiste anche negli animali trattati con LD senza differenze rispetto all'HFD (Fig. 22b). Tuttavia, dopo la somministrazione di HD, i vacuoli di grasso appaiono fortemente ridotti (Fig. 22b).

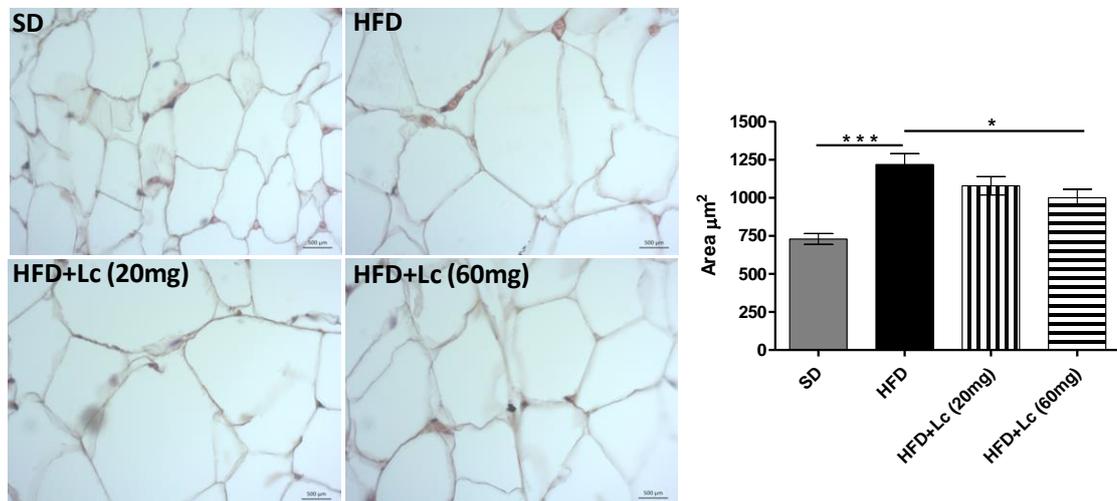


Fig. 21 Caratteristiche istologiche di base di grasso addominale di ratto alimentato con SD o HFD, o HFD + Lc (20 mg), o HFD + Lc (60 mg) colorato con ematossilina-eosina. Nel grafico sono state mostrate le differenze statisticamente significative tra le diete, (n= 5 per ogni gruppo)

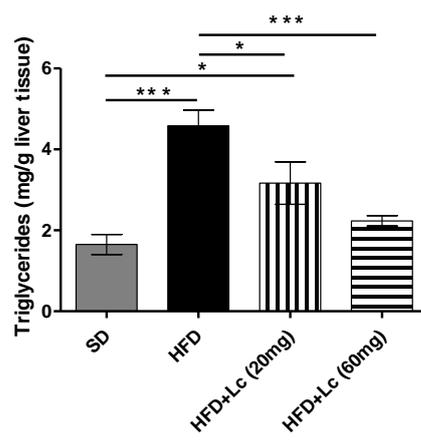
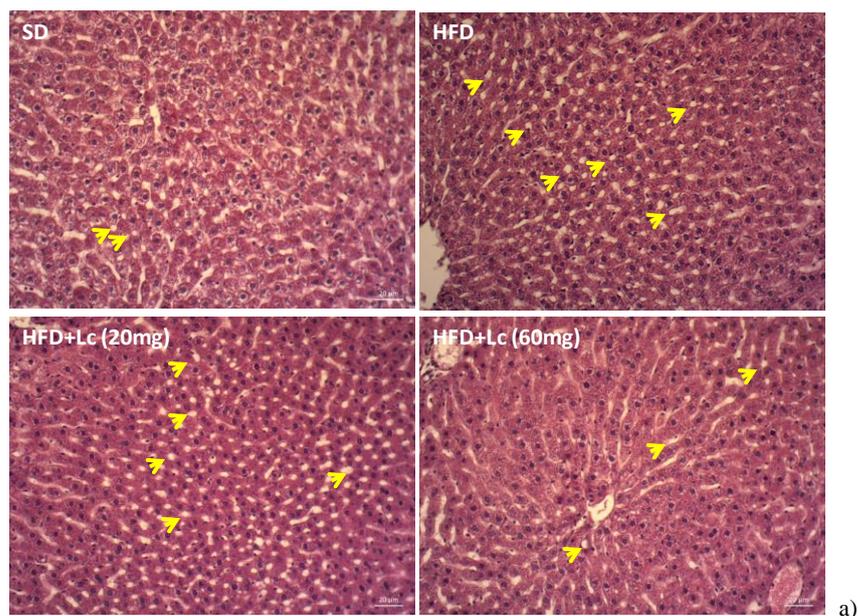


Fig. 22 a) Illustrazione di steatosi nel fegato di ratti alimentati con SD o HFD, o HFD + Lc (20 mg) o HFD + Lc (60 mg) (n = 3 per ciascun gruppo). b) Determinazione epatica dei trigliceridi nei ratti alimentati con gruppi SD, o HFD o HFD + Lc (20 mg) o HFD + Lc (60 mg); differenza significativa: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$, *** = $p < 0,001$

Sono stati valutati i cambiamenti epatici di due enzimi regolatori chiave della gluconeogenesi, come PEPCK e G6Pasi- α e che una compromissione della gluconeogenesi promuove la produzione di glucosio epatico aggravando la resistenza all'insulina (Sharabi et al, 2015) contribuendo fortemente alla patogenesi di iperglicemia e intolleranza al glucosio (Barthel and Schmoll, 2003). Nei nostri dati, come è possibile evidenziare dalla Fig. 23, estratti di bulbi di *M. comosum* hanno ridotto i livelli di espressione della proteina di PEPCK e G6Pase- α . Questi possono rafforzare i risultati che indicano la capacità di *M. comosum* di migliorare la sensibilità all'insulina e la gluconeogenesi epatica che modula la tolleranza al glucosio.

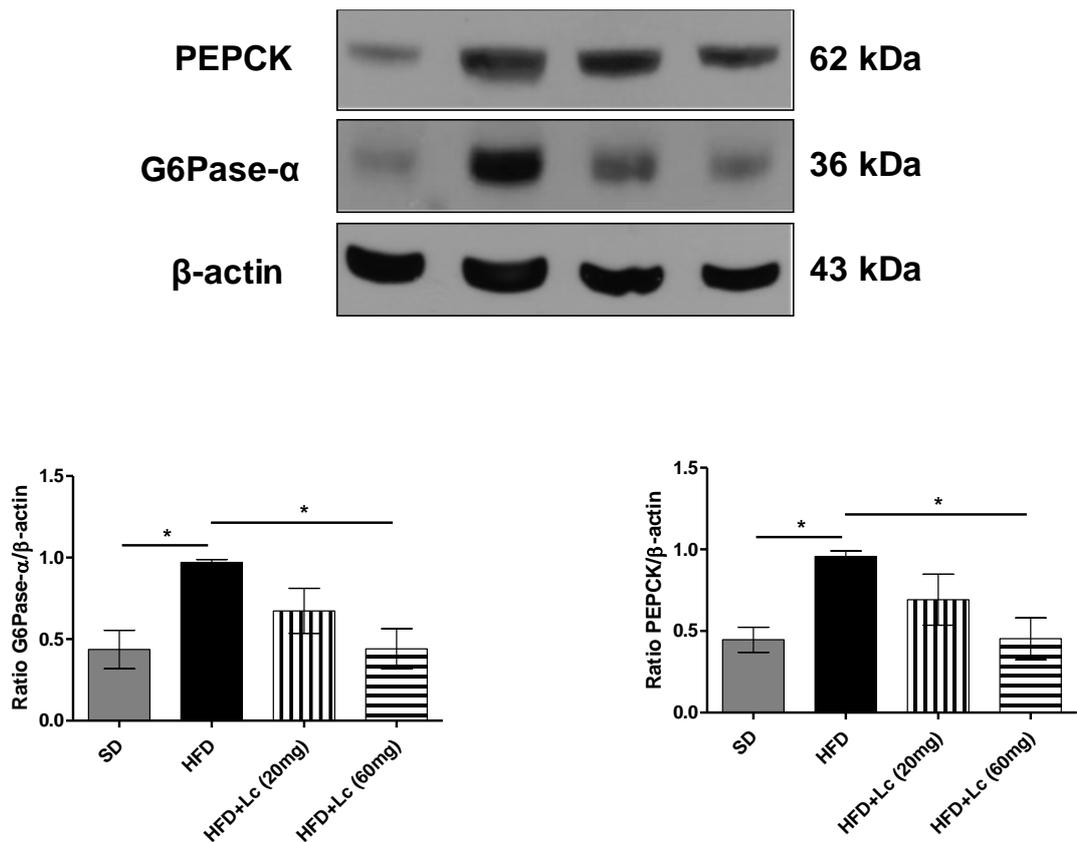


Fig. 23 Western Blots e analisi densitometrica relativa espressa per rapporto di PEPCK / β -actina e G6Pase-691 α / β -actina su estratti epatici di SD, o HFD, o HFD + Lc (20 mg), o HFD + Lc (60 mg). Le modifiche sono state valutate come media \pm SE (n = 3). Differenza significativa dai valori di controllo (ANOVA unidirezionale, test Newman-Keuls): * = $p < 0,05$

4.2.3.3 Cuore isolato e perfuso secondo Langendorff

Il protocollo applicato (Fig. 24) prevede di valutare la curva concentrazione risposta da 10^{-12} M a 10^{-6} M. Ogni concentrazione è stata somministrata per 10 minuti e presi i parametri cardiaci. Quindi prima di stabilizza cuore con soluzione fisiologica, quando i parametri cardiaci sono stabili si procede con la somministrazione delle concentrazioni.

Il primo parametro è la pressione ventricolare sinistra [LVP) e dal trattamento si deduce che l'estratto induce un iniziale aumento della contrattilità cardiaca significativa alla prima dose testata ed a un effetto di riduzione della contrattilità alle dosi più alte (10^{-7} e 10^{-6} M).

Questo effetto bifasico è tipico dei polifenoli. Questo effetto sulla contrattilità è evidenziato anche dal parametro LVdP/dt max che calcola la massima velocità di contrazione.

Il parametro LVdP/dt min ci indica che anche il parametro relativo al rilassamento cardiaco ha effetti bifasici cioè positivo a dosi basse e negativo a dosi alte suggerendo che l'estratto determina una maggiore rilassamento del cuore. La pressione coronarica (CP) non subisce variazioni significative a nessuna dose testata, mentre è evidente un cronotropismo (HR) negativo significativo a tutte le documentazioni.

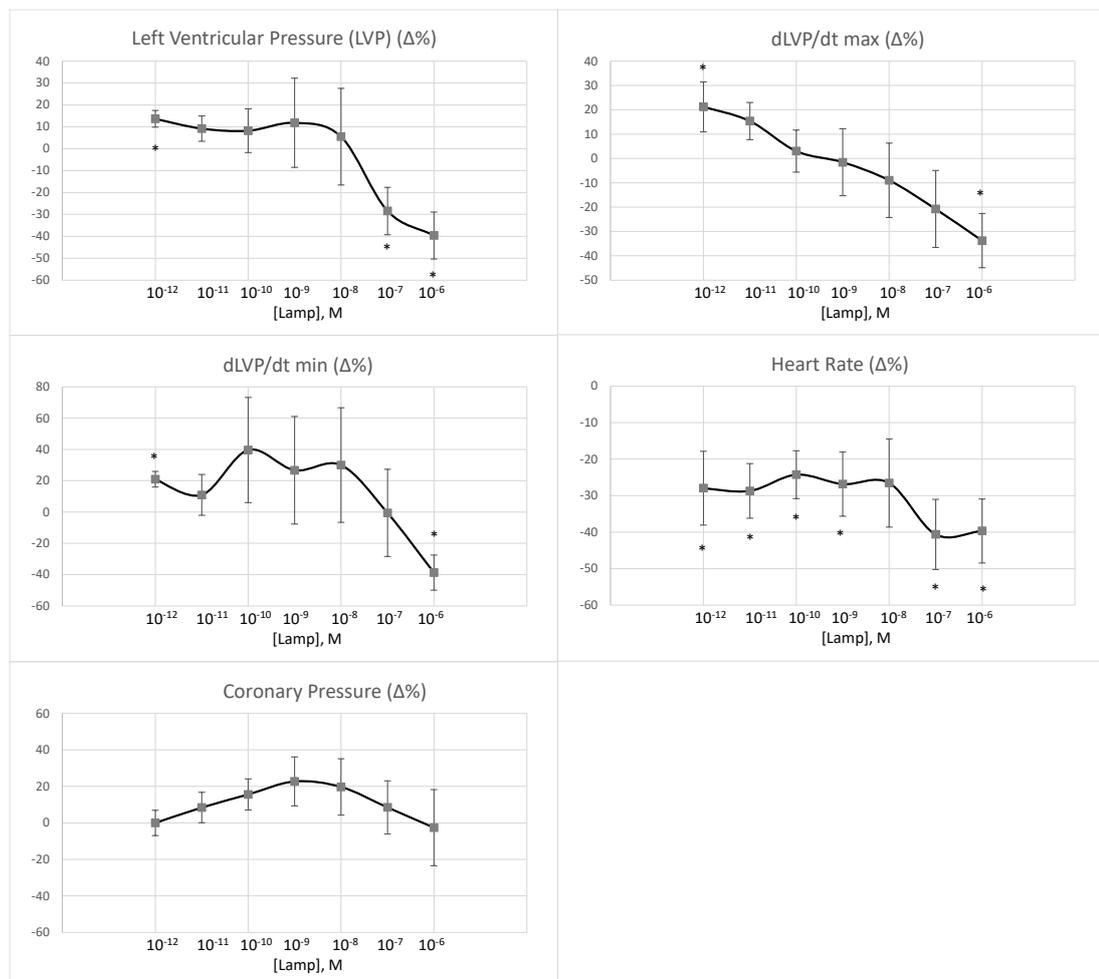


Fig. 24 Risposta curva dose – dipendente di estratto di bulbi di *M. comosum* (10^{-12} M – 10^{-6} M) (Lamp) su LVP, HR, (LVdP/dT) max, (LVdP/dT) min, e CP, su cuore di ratto perfuso. Le variazioni percentuali sono state valutate come medie \pm SEM di 6 esperimenti. La differenza è significativa (ANOVA) * $p < 0,05$

Il protocollo relativo alla Fig. 25 prevede lo studio dell'effetto antiadrenergico dell'estratto. Si stabilizza il cuore con soluzione fisiologica e poi si somministra isoproterenolo, agonista beta adrenergico, alla dose di 10^{-9} M per 5 min. L'isoproterenolo determina i suoi effetti già a 1 minuto dalla somministrazione e restano significativi fino a 5 minuti per poi diminuire. Per tale motivo abbiamo misurato i parametri a 5 minuti. Dopo la somministrazione dell'isoproterenolo abbiamo somministrato soluzione fisiologica per riportare i parametri al controllo e poi abbiamo somministrato la stessa dose di isoproterenolo più l'estratto alla dose alta (10^{-6} M) cioè alla dose che nella figura sottoriportata, determina effetti negativi sulla contrattilità.

I dati indicano che l'effetto positivo dell'isoproterenolo sulla contrattilità e sulla frequenza viene antagonizzato dal l'estratto. Questo suggerisce che l'estratto è in grado di antagonizzare una eccessiva stimolazione adrenergica.

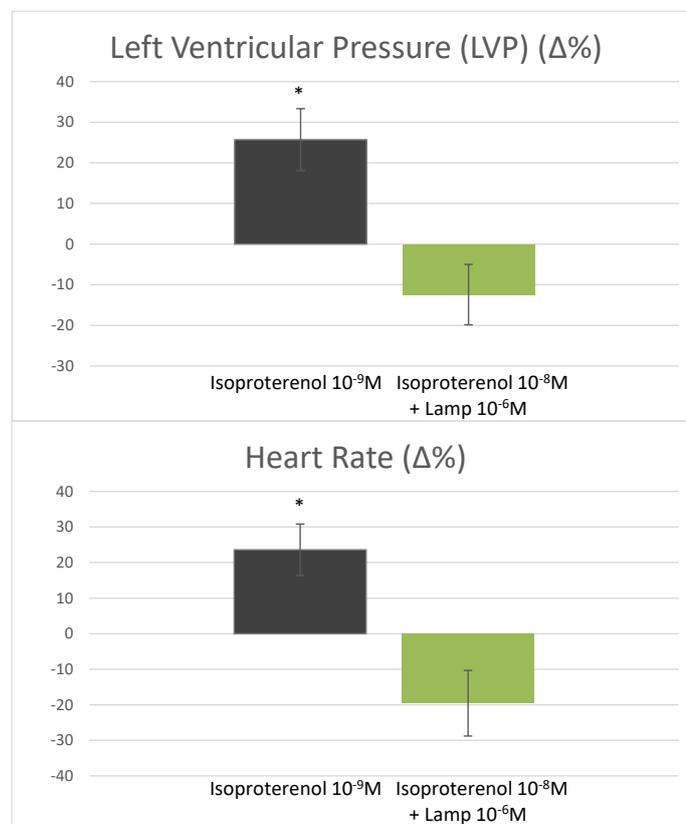


Fig. 25 Effetti dell'ISO prima e dopo il trattamento con Lamp (10^{-6} M) su LVP (pressione ventricolare sinistra) e HR (Frequenza cardiaca) sul cuore isolato e perfuso di ratto con metodo Langendorff. Le variazioni percentuali sono state valutate come medie \pm SEM di 5 esperimenti per ciascun gruppo. La differenza è significativa per dai valori di controllo; * = $p < 0,05$

4.3 *Citrus* L.

I frutti del genere *Citrus* L. contengono, come convenuto dalla comunità scientifica, oltre a vitamina C, acido folico, potassio e pectine, un interessante profilo fenolico e rilevanti proprietà antiossidanti (Proteggente et al, 2003; Gorinstein et al, 2004; Anagnostopoulou et al, 2006; Guimara et al, 2009; Khettal et al 2017) che modulano diversi fattori alla base di complessi meccanismi fisiopatologici (Pepe et al, 2017; Kawakami et al, 2017). Altresì, da sempre riconosciuti come utili rimedi contro lo scorbuto (Magiorkinis et al., 2011), arance e mandarini, sono i frutti invernali principalmente consumati nella stagione fredda. Negli ultimi anni, le tendenze confrontate con le scoperte provenienti dal mondo scientifico, stanno spingendo ad un consumo molto elevato di succhi: quello di limone riconosciuto essere un utile rimedio per la prevenzione di calcoli renali (Pak, 2004), quello di pompelmo per controllare l'ipertensione arteriosa (Sica, 2006) e per gli effetti anti-genotossici (Alvarez-Gonzales et al., 2010) nonché per modulare il metabolismo epatico dei lipidi (Cha et al., 2001) e il succo d'arancia (*Citrus sinensis*) per prevenire e modulare processi infiammatori (Assis et al, 2013).

Dai vari incroci e dalle manipolazioni genetiche, si è ricorso sempre più all'ottimizzazione dei frutti che potessero garantire un soddisfacimento a livello di gusto, di profilo sensoriale, di resa in succo e di componenti nutrizionali indispensabili. Per tale motivo, questo studio ha voluto indagare le differenze tra specie di agrumi ampiamente coltivati e commercializzati nella Piana di Sibari (tab. 31). Di questi sono state scelte come droga la polpa, la buccia e le foglie.

Tale scelta è stata generata dalla volontà di valutare la frazione commestibile polpa e succo, ma anche i prodotti di scarto sia della trasformazione alimentare (bucce) sia delle abituali tecniche agronomiche (potatura, foglie). L'attenzione è stata tuttavia incentrata su un nuovo ibrido, Tacle® (TC) allo scopo di verificare se le potenzialità attribuibili al prodotto soddisfacessero solo specifiche richieste di mercato (migliori caratteristiche nutrizionali e praticità di consumo) o se il prodotto risultante avesse potenzialità biologiche migliori dei "genitori".

tab. 31 Campioni e sigle di *Citrus*

Campione	Sigla pianta
Early sicily®	ES
Tacle®	TC
Navel	NV
Arancia amara	AA
Tarocco	TR
Limone	LM
Marzolini	MZ
Mandalate®	MD
Clementina	CL

4.3.1 Analisi chimica

4.3.1.1 Polifenoli, flavonoidi totali, attività antiossidante

Tra i campioni di bucce sottoposti a saggi per la determinazione del contenuto in polifenoli e flavonoidi totali, il limone (LL) mostra valori significativamente maggiori rispetto alle altre varietà testate, $139,6 \pm 0,18$ mgCAE/g di peso fresco e $107,3 \pm 0,20$ mgQE/g, assolutamente in linea con quanto affermato da Fejzić and Čavar (2014).

Interessanti sono i risultati riscontrati sulla specie ibrida, Tacle® (TC) il cui contenuto in polifenoli e flavonoidi in buccia, è risultato il più alto tra le arance e i mandarini in esame, con valore pari a $109,1 \pm 0,48$ mgCAE/g e di $87,5 \pm 0,55$ mgQE/g di peso fresco rispettivamente (tab. 32). Particolare interesse è stato rivolto ad altre due varietà di ibridi, Mandalate® (MD) ed Early sicily® (ES) il cui più alto contenuto polifenolico è stato riscontrato nei primi rispetto ai secondi $91,2 \pm 0,16$ mgCAE/g e $62,1 \pm 0,13$ mgCAE/g. Significativo rimane il contributo in polifenoli e flavonoidi in estratto di bucce di Arancia amara (AA) e Tarocco (TR) (tab. 32) in linea con quanto affermato da diversi autori (Ersus and Cam, 2007; Ghasemi 2009).

Nello studio di Ghasemi et al. (2009), in cui il solvente di estrazione è stato metanolo puro, il più alto contenuto in componente fenolica è stato rinvenuto nella buccia d'arancia, espressa in mg di acido gallico (GAE) per grammo di prodotto pari a 232,5 (mgGAE/g), mentre il contenuto più basso è stato trovato in quella di limone (102,2 mgGAE/g). Petchlert et. al. (2013) riportano invece, valori che vanno da $5,71 \pm 0,01$ mgGAE/ml a $10,57 \pm 0,17$ mgGAE/ml per mandarino e arancio, rispettivamente. La ragione di queste differenze potrebbe dipendere dal solvente di estrazione, dalle modalità e chiaramente, dalla diversa origine dei campioni.

tab. 32 Contenuto in polifenoli e flavonoidi totali in estratto di bucce *Citrus*

<i>Citrus</i>	Polifenoli (mgCAE/gFW)	Flavonoidi (mgQE/gFW)
ES	$62,1 \pm 0,13^e$	$21,4 \pm 0,91^g$
NV	$73,2 \pm 0,33^d$	$46,1 \pm 0,32^e$
AA	$89,8 \pm 0,92^c$	$31,9 \pm 0,11^d$
TC	$109,1 \pm 0,48^b$	$87,5 \pm 0,55^b$
TR	$89,4 \pm 0,31^c$	$48,3 \pm 0,57^d$
LL	$139,6 \pm 0,18^a$	$107,3 \pm 0,20^a$
MD	$91,2 \pm 0,16^c$	$66,7 \pm 0,28^c$
MZ	$62,9 \pm 0,23^e$	$31,3 \pm 0,42^f$

Polifenoli totali sono espressi come mg equivalenti di acido clorogenico (mgCAE) per g di materiale fresco (FW). Flavonoidi totali sono espressi come mg di quercetina equivalente (mgQE) per g di materiale fresco. I dati ($n = 3$) \pm SD con lettere diverse all'interno della stessa colonna sono significativamente diverse a $p < 0,05$.

Da quanto emerge dai risultati eseguiti su polpa per il contenuto in polifenoli e flavonoidi, oltre ai campioni di LL, anche TC, TR e AA mostrano significative differenze rispetto alle altre specie di *Citrus*. Anche in questo caso, il MD mostra risultati significativamente migliori rispetto all'ES sia in termini di polifenoli che flavonoidi (tab. 33). Differente il contenuto in flavonoidi per AA che risulta significativamente più alto rispetto al TR ma inferiore al TC e MD, $47,2 \pm 0,28$ mgQE/g e $55,3 \pm 0,21$ mgQE/g e $51,5 \pm 0,27$ mgQE/g di peso fresco, rispettivamente.

tab. 33 Contenuto in polifenoli e flavonoidi totali in estratto di polpa *Citrus*

<i>Citrus</i>	Polifenoli (mgCAE/gFW)	Flavonoidi (mgQE/gFW)
ES	61,1 ± 0,99 ^f	40,8 ± 0,32 ^e
NV	88,5 ± 0,98 ^d	31,9 ± 0,11 ^f
AA	99,6 ± 0,71 ^c	47,2 ± 0,28 ^d
TC	101,9 ± 0,15 ^b	55,3 ± 0,21 ^b
TR	99,9 ± 0,11 ^c	34,3 ± 0,77 ^f
LL	121,3 ± 0,10 ^a	91,4 ± 0,40 ^a
MD	82,3 ± 0,10 ^e	51,5 ± 0,27 ^c
MZ	59,6 ± 0,19 ^g	31,8 ± 0,72 ^f

Polifenoli totali sono espressi come mg equivalenti di acido clorogenico (mgCAE) per g di materiale fresco (FW). Flavonoidi totali sono espressi come mg di quercetina equivalente (mgQE) per g di materiale fresco. I dati ($n = 3$) ± SD con lettere diverse all'interno della stessa colonna sono significativamente diverse a $p < 0,05$.

Gli studi condotti su foglie, mostrano che il più alto contenuto in polifenoli è apprezzabile in campioni di AA, LL, TC senza alcuna differenza significativa tra le specie. Il TR mostra un contenuto in polifenoli e flavonoidi significativamente più basso rispetto al TC. Anche il contenuto in flavonoidi è più basso, significativamente rispetto all'estratto di AA e molto più simile al contenuto in TR (tab. 34). I dati ottenuti sono in linea con quanto affermato da Al- Anbari and Hasan, 2015; Khettal et al, 2017.

tab. 34 Contenuto in polifenoli e flavonoidi totali in estratto di foglie *Citrus*

<i>Citrus</i>	Polifenoli (mgCAE/gFW)	Flavonoidi (mgQE/gFW)
ES	94,9 ± 0,99 ^f	44,1 ± 0,82 ^f
NV	95,5 ± 0,71 ^e	32,9 ± 0,80 ^g
AA	101,3 ± 0,98 ^b	58,1 ± 0,99 ^a
TC	100,9 ± 0,79 ^c	48,3 ± 0,23 ^e
TR	99,9 ± 0,99 ^d	49,9 ± 0,65 ^c
LL	101,8 ± 0,22 ^a	51,3 ± 0,56 ^b
MD	95,4 ± 0,21 ^e	49,8 ± 0,10 ^c
MZ	86,7 ± 0,95 ^g	48,9 ± 0,91 ^d

Polifenoli totali sono espressi come mg equivalenti di acido clorogenico (mgCAE) per g di materiale fresco (FW). Flavonoidi totali sono espressi come mg di quercetina equivalente (mgQE) per g di materiale fresco. I dati ($n = 3$) ± SD con lettere diverse all'interno della stessa colonna sono significativamente diverse a $p < 0,05$.

Oltretutto, è noto che la spiccata attività antiossidante sia in stretta relazione con il contenuto e con le caratteristiche chimiche dei fenoli presenti, data, chiaramente, la capacità del sistema aromatico di delocalizzare l'elettrone spaiato e donare facilmente un radicale idrogeno (Floegel et al, 2011; Zhang and Wang, 2001) ma, è anche vero che per la complessità degli estratti isolati,

nonché per la diversa origine e provenienza della materia prima, molto spesso, l'attività antiossidante non può essere definita in modo assoluto, né sulla base di un metodo utilizzato.

Dai dati ottenuti si evidenzia, innanzitutto, un maggiore potenziale antiossidante in estratto di buccia di LL, espresso in IC₅₀ (µg/ml), e in estratto di buccia di TC, con valori pari 2,8 ± 0,08 µg/ml (r² = 0,989) e 7,5 ± 0,15 µg/ml (r²=0,983), rispettivamente, rispetto alle restanti varietà. Meno potere, ma statisticamente significativo, mostrano i campioni di MD e AA con IC₅₀ (µg/ml) pari a 9,9 ± 0,02 (r² = 0,991) e 10,1 ± 0,27 (r²= 0,988) rispettivamente (tab. 35). Particolare riguardo alle due specie ibride TC e MD in cui, il potere antiossidante risulta fortemente correlato all'elevato contenuto in flavonoidi in entrambe le specie (tab. 35).

tab. 35 Contenuto in polifenoli, flavonoidi totali ed attività antiossidante (DPPH) in estratto di bucce *Citrus*

<i>Citrus</i>	Polifenoli (mgCAE/gFW)	Flavonoidi (mgQE/gFW)	DPPH (IC ₅₀) (µg/ml)
ES	62,1 ± 0,13 ^e	21,4 ± 0,91 ^g	48,0 ± 0,19 ^g
NV	73,2 ± 0,33 ^d	46,1 ± 0,32 ^e	28,2 ± 0,22 ^f
AA	89,8 ± 0,92 ^c	31,9 ± 0,11 ^d	10,1 ± 0,27 ^d
TC	109,1 ± 0,48 ^b	87,5 ± 0,55 ^b	7,5 ± 0,15 ^b
TR	89,4 ± 0,31 ^c	48,3 ± 0,57 ^d	19,2 ± 0,09 ^e
LL	139,6 ± 0,18 ^a	107,3 ± 0,20 ^a	2,8 ± 0,08 ^a
MD	91,2 ± 0,16 ^c	66,7 ± 0,28 ^c	9,9 ± 0,02 ^c
MZ	62,9 ± 0,23 ^e	31,3 ± 0,42 ^f	38,1 ± 0,06 ^g

Polifenoli totali sono espressi come mg equivalenti di acido clorogenico (mgCAE) per g di materiale fresco (FW). Flavonoidi totali sono espressi come mg di quercetina equivalente (mgQE) per g di materiale fresco. I dati (n = 3) ± SD con lettere diverse all'interno della stessa colonna sono significativamente diverse a p < 0,05. Per il controllo positivo del DPPH test, è stato utilizzato il Trolox.

Per quanto riguarda, invece, l'attività antiperossilica testata con il β-carotene *bleaching* test, LL e TC risultano i campioni con maggiore attività a 30', seguita dai campioni di MD, MZ e AA (tab. 36) che si mantiene stabilmente attiva dopo ulteriori 30 minuti (tot 60 minuti) di stress termico (tab.36) e coerentemente con quanto riportato in letteratura inerente le bucce di *Citrus*.

tab 36 Contenuto in flavonoidi totali ed attività antiossidante (β -carotene bleaching test) in estratto di bucce *Citrus*

<i>Citrus</i>	Flavonoidi (mg CAE/gFW)	β -carotene 30' (IC ₅₀) (μ g/ml)	β -carotene 60' (IC ₅₀) (μ g/ml)
ES	21,4 \pm 0,91 ^g	14,90 \pm 0,91 ^g	32,12 \pm 0,50 ^e
NV	46,1 \pm 0,32 ^e	12,60 \pm 0,26 ^f	28,90 \pm 0,69 ^d
AA	31,9 \pm 0,11 ^d	11,14 \pm 0,89 ^e	36,88 \pm 0,92 ^f
TC	87,5 \pm 0,55 ^b	1,86 \pm 0,07 ^b	12,90 \pm 0,92 ^b
TR	48,3 \pm 0,57 ^d	7,28 \pm 0,29 ^d	25,09 \pm 0,23 ^c
LL	107,3 \pm 0,20 ^a	1,43 \pm 0,28 ^a	8,12 \pm 0,11 ^a
MD	66,7 \pm 0,28 ^c	1,98 \pm 0,09 ^c	13,00 \pm 0,45 ^b
MZ	31,3 \pm 0,42 ^f	1,99 \pm 0,05 ^c	12,99 \pm 0,3 ^b

Flavonoidi totali sono espressi come mg di quercetina equivalente (mgQE) per g di materiale fresco. I dati ($n = 3$) \pm SD con lettere diverse all'interno della stessa colonna sono significativamente diverse a $p < 0,05$. Per il controllo positivo del β -carotene bleaching test, è stato utilizzato il Trolox.

Dal confronto tra le polpe delle varietà di *Citrus* emerge che, tutte mostrano una attività antiossidante particolarmente alta, ma LL e TC presentano una attività significativamente elevata rispetto alle altre cultivar analizzate (tab. 37). Nello specifico, il LL conferisce una attività *radical scavenging* di $5,4 \pm 0,05$ μ g/ml mentre il TC $9,8 \pm 0,40$ μ g/ml tale da potersi ritenere delle cultivar particolarmente utili nell'ambito fitoterapico. Significativa è l'attività fornita dal MD, da AA, TR e da ES.

tab. 37 Contenuto in polifenoli, flavonoidi totali ed attività antiossidante (DPPH test) in estratto di polpa *Citrus*

<i>Citrus</i>	Polifenoli (mgCAE/gFW)	Flavonoidi (mgQE/gFW)	DPPH (IC ₅₀) (μ g/ml)
ES	61,1 \pm 0,99 ^f	40,8 \pm 0,32 ^e	19,9 \pm 0,08 ^e
NV	88,5 \pm 0,98 ^d	31,9 \pm 0,11 ^f	32,2 \pm 0,19 ^g
AA	99,6 \pm 0,71 ^c	47,2 \pm 0,28 ^d	15,7 \pm 0,50 ^d
TC	101,9 \pm 0,15 ^b	55,3 \pm 0,21 ^b	9,8 \pm 0,40 ^b
TR	99,9 \pm 0,11 ^c	34,3 \pm 0,77 ^f	17,9 \pm 0,20 ^d
LL	121,3 \pm 0,10 ^a	91,4 \pm 0,40 ^a	5,4 \pm 0,05 ^a
MD	82,3 \pm 0,10 ^e	51,5 \pm 0,27 ^c	10,3 \pm 0,22 ^c
MZ	59,6 \pm 0,19 ^g	31,8 \pm 0,72 ^f	30,1 \pm 0,54 ^f

Polifenoli totali sono espressi come mg equivalenti di acido clorogenico (mgCAE) per g di materiale fresco (FW). Flavonoidi totali sono espressi come mg di quercetina equivalente (mgQE) per g di materiale fresco. I dati ($n = 3$) \pm SD con lettere diverse all'interno della stessa colonna sono significativamente diverse a $p < 0,05$. Per il controllo positivo del DPPH test, è stato utilizzato il Trolox.

MD e AA, a differenza del TR e di ES, presentano significative attività nel test di attività antiperossilica proposto col β -carotene bleaching test. Come è possibile evidenziare dalla tabella 38, ES, TR e NV sono le cultivar che mostrano una significativa perdita di attività dopo trattamento termico. Dai dati evidenziati, risulta che LL è il campione che mantiene maggiormente la stabilità antiperossilica dopo i 60 minuti (tab. 38).

tab. 38 Contenuto in flavonoidi totali ed attività antiossidante (β -carotene bleaching test) in estratto di polpa *Citrus*

<i>Citrus</i>	Flavonoidi (mgCAE/gFW)	β -carotene 30' (IC ₅₀) (μ g/ml)	β -carotene 60' (IC ₅₀) (μ g/ml)
ES	40,8 \pm 0,32 ^e	13,89 \pm 0,60 ^g	51,28 \pm 0,37 ^g
NV	31,9 \pm 0,11 ^f	11,69 \pm 0,20 ^f	45,75 \pm 0,64 ^f
AA	47,2 \pm 0,28 ^d	3,48 \pm 0,77 ^b	12,95 \pm 0,55 ^c
TC	55,3 \pm 0,21 ^b	3,49 \pm 0,55 ^b	13,06 \pm 0,60 ^b
TR	34,3 \pm 0,77 ^f	11,30 \pm 0,12 ^e	43,99 \pm 0,88 ^e
LL	91,4 \pm 0,40 ^a	3,33 \pm 0,28 ^a	12,08 \pm 0,52 ^a
MD	51,5 \pm 0,27 ^c	3,62 \pm 0,93 ^d	13,07 \pm 0,50 ^b
MZ	31,8 \pm 0,72 ^f	3,53 \pm 0,82 ^c	13,13 \pm 0,65 ^d

Flavonoidi totali sono espressi come mg equivalenti di quercetina (mgQE) per g di materiale fresco (FW). I dati ($n = 3$) \pm SD con lettere diverse all'interno della stessa colonna sono significativamente diverse a $p < 0,05$. Per il controllo positivo del β -carotene bleaching test, è stato utilizzato il Trolox.

Abbiamo dimostrato che, gli estratti di foglie delle varie cultivar di *Citrus*, manifestano una significativa attività antiossidante e, anche da quanto emerge in letteratura, dipendente dall'attività dei flavonoidi il cui contenuto è particolarmente elevato. Varie indagini hanno mostrato il coinvolgimento di composti flavonoidici nell'attività radical scavenging e antiperossilica di *Citrus*, sia in foglie che in bucce. Naczki e Shahidi (2004) hanno mostrato che i flavonoidi agliconi sono più attivi delle forme glicosilate, in quanto libere dall'ingombro sterico dei monosaccaridi. D'altra parte, anche Zhang e Wang (2001) e successivamente, Floegel et al. (2011) hanno riferito che l'attività antiossidante dei composti fenolici è principalmente dovuta al numero di gruppi idrossilici e le loro posizioni sull'anello aromatico. (tab. 39, 40). Inoltre, come è possibile osservare dalla tab. 39, l'attività antiossidante rilevata nelle foglie è significativamente superior rispetto a quella rilevata nelle alter porzioni di frutto.

Per quanto riguarda l'attività antiperossilica rilevata nelle foglie, il TC, il LL, AA seguite da MD e MZ sono le varietà che mostrano maggiore attività e al contempo, ottima termostabilità (tab. 40). Questo dato dimostra che, foglie e bucce, considerati materiale di scarto delle aziende agrumicole per le foglie e produttrici di succo per le bucce, potrebbero essere utilizzati come material di recupero per la produzione di integratori alimentari o prodotti base da sfruttare nell'ambito cosmetico.

tab.39 Contenuto in polifenoli, flavonoidi totali ed attività antiossidante (DPPH test) in estratto di foglie *Citrus*

Campioni	Polifenoli (mgCAE/gFW)	Flavonoidi (mgQE/gFW)	DPPH (IC₅₀) (µg/ml)
ES	94,9 ± 0,99 ^f	44,1 ± 0,82 ^f	18,6 ± 0,80 ^e
NV	95,5 ± 0,71 ^e	32,9 ± 0,80 ^g	15,1 ± 0,99 ^c
AA	101,3 ± 0,98 ^b	58,1 ± 0,99 ^a	15,5 ± 0,55 ^c
TC	100,9 ± 0,79 ^c	48,3 ± 0,23 ^e	9,6 ± 0,00 ^b
TR	99,9 ± 0,99 ^d	49,9 ± 0,65 ^c	19,7 ± 0,30 ^d
LL	101,8 ± 0,22 ^a	51,3 ± 0,56 ^b	5,3 ± 0,05 ^a
MD	95,4 ± 0,21 ^e	49,8 ± 0,10 ^c	10,4 ± 0,52 ^b
MZ	86,7 ± 0,95 ^g	48,9 ± 0,91 ^d	20,4 ± 0,55 ^f

Polifenoli totali sono espressi come mg equivalenti di acido clorogenico (mgCAE) per g di materiale fresco (FW). Flavonoidi totali sono espressi come mg di quercetina equivalente (mgQE) per g di materiale fresco. I dati ($n = 3$) ± SD con lettere diverse all'interno della stessa colonna sono significativamente diverse a $p < 0,05$. Per il controllo positivo del DPPH test, è stato utilizzato il Trolox.

tab. 40 Contenuto in flavonoidi totali ed attività antiossidante (β-carotene bleaching test) in estratto di foglie *Citrus*

Campioni	Flavonoidi (mgCAE/gFW)	β-carotene 30' (IC₅₀) (µg/ml)	β-carotene 60' (IC₅₀) (µg/ml)
ES	44,1 ± 0,82 ^f	6,12 ± 0,99 ^c	12,97 ± 0,55 ^e
NV	32,9 ± 0,80 ^g	12,60 ± 0,32 ^e	25,77 ± 0,12 ^f
AA	58,1 ± 0,99 ^a	1,64 ± 0,50 ^a	3,05 ± 0,20 ^a
TC	48,3 ± 0,23 ^e	1,69 ± 0,69 ^b	3,77 ± 0,19 ^b
TR	49,9 ± 0,65 ^c	9,78 ± 0,28 ^d	13,01 ± 0,22 ³
LL	51,3 ± 0,56 ^b	1,62 ± 0,73 ^a	3,01 ± 0,2 ^a
MD	49,8 ± 0,10 ^c	4,02 ± 0,11 ^e	6,33 ± 0,32 ^c
MZ	48,9 ± 0,91 ^d	4,15 ± 0,3 ^f	7,60 ± 0,25 ^d

Flavonoidi totali sono espressi come mg di quercetina equivalente (mgQE) per g di materiale fresco. I dati ($n = 3$) ± SD con lettere diverse all'interno della stessa colonna sono significativamente diverse a $p < 0,05$. Per il controllo positivo del β-carotene bleaching test, è stato utilizzato il Trolox.

Dato il notevole interesse commerciale verso il Tacle®, si è quindi proceduto alla valutazione della componente fitochimica del frutto a confronto con i “genitori”, Clementina a Tarocco. Dai dati preliminari, emerge che, il TC ha un contenuto in flavonoidi pari a $77,2 \pm 0,49$ mgQE/g e un potere radical scavenging espresso in IC₅₀ (µg/ml) pari a $5,57 \pm 0,88$ verso $8,69 \pm 0,75$ e $9,67 \pm 0,31$ di TR e CL rispettivamente (tab. 41).

tab. 41 Contenuto in polifenoli, flavonoidi totali ed attività antiossidante (DPPH test) in estratto di buccia Clementina, Tarocco, Tacle®

<i>Citrus</i>	Polifenoli (mgCAE/gFW)	Flavonoidi (mgQE/gFW)	DPPH (IC₅₀) (µg/ml)
CL	109,86 ± 0, 72 ^c	61,3 ± 0,60 ^c	96,7 ± 0,31 ^c
TR	177,16 ± 0, 46 ^b	65,9 ± 0,50 ^b	86,9 ± 0,75 ^b
TC	201,23 ± 0, 95 ^a	77,2 ± 0,49 ^a	55,7 ± 0,88 ^a

Polifenoli totali sono espressi come mg equivalenti di acido clorogenico (mgCAE) per g di materiale fresco (FW). Flavonoidi totali sono espressi come mg di quercetina equivalente (mgQE) per g di materiale fresco. I dati ($n = 3$) ± SD con lettere diverse all'interno della stessa colonna sono significativamente diverse a $p < 0,05$. Per il controllo positivo del DPPH test, è stato utilizzato il Trolox.

Dall'esame condotto sulla polpa, invece, emerge che il contenuto in polifenoli e flavonoidi, risulta significativamente più elevato nel TR rispetto al TC. e anche i sia in termini di contenuto in polifenoli che flavonoidi totali. Tuttavia, dai saggi antiossidanti, l'attività radical scavenging, nonostante il più basso contenuto in flavonoidi, risulta statisticamente significativo nel TC rispetto al TR (tab. 42, 43).

tab. 42 Contenuto in polifenoli, flavonoidi totali ed attività antiossidante (DPPH test) in estratto di polpa Clementina, Tarocco, Tacle® (2015)

<i>Citrus</i>	Polifenoli (mgCAE/gFW)	Flavonoidi (mgQE/gFW)	DPPH (IC₅₀) (µg/ml)
CL	90,01 ± 0,65 ^c	41,3 ± 0,52 ^c	100,3 ± 0,08 ^c
TR	207,69 ± 0,13 ^a	85,9 ± 0,21 ^a	85,1 ± 0,18 ^b
TC	174,67 ± 0,61 ^b	67,2 ± 0,99 ^b	94,6 ± 0,02 ^a

Polifenoli totali sono espressi come mg equivalenti di acido clorogenico (mgCAE) per g di materiale fresco (FW). Flavonoidi totali sono espressi come mg di quercetina equivalente (mgQE) per g di materiale fresco. I dati ($n = 3$) ± SD con lettere diverse all'interno della stessa colonna sono significativamente diverse a $p < 0,05$. Per il controllo positivo del DPPH test, è stato utilizzato il Trolox.

tab. 43 Contenuto in polifenoli, flavonoidi totali ed attività antiossidante (DPPH test) in estratto di foglie Clementina, Tarocco, Tacle®

<i>Citrus</i>	Polifenoli (mgCAE/gFW)	Flavonoidi (mgQE/gFW)	DPPH (IC₅₀) (mg/ml)
CL	137,29 ± 0,89 ^c	58,6 ± 0,65 ^c	56,6 ± 0,09 ^a
TR	209,27 ± 0,56 ^b	65,2 ± 0,50 ^b	76,8 ± 0,05 ^c
TC	214,17 ± 0,88 ^a	67,2 ± 0,49 ^a	67,2 ± 0,08 ^b

Polifenoli totali sono espressi come mg equivalenti di acido clorogenico (mgCAE) per g di materiale fresco (FW). Flavonoidi totali sono espressi come mg di quercetina equivalente (mgQE) per g di materiale fresco. I dati ($n = 3$) ± SD con lettere diverse all'interno della stessa colonna sono significativamente diverse a $p < 0,05$. Per il controllo positivo del DPPH test, è stato utilizzato il Trolox.

Dagli studi condotti su TC sottoposto a periodo di stoccaggio a 1 °C e 90 – 95% HR, si evidenzia un significativo aumento in polifenoli e flavonoidi totali e una non significativa variazione dell'attività antiossidante a dimostrazione della conservazione del potere antiossidante del frutto durante il periodo di stoccaggio (tab. 44, 45).

tab. 44 Contenuto in polifenoli, flavonoidi totali ed attività antiossidante (DPPH test) in buccia Tacle® (*storage*)

<i>Citrus</i>	Polifenoli (mgCAE/gFW)	Flavonoidi (mgQE/gFW)	DPPH (IC₅₀) (mg/ml)
TC (0)	201,23 ± 0,95 ^c	77,2 ± 0,49 ^c	57,5 ± 0,08 ^b
TC (6)	367,31 ± 0,36 ^b	85,1 ± 0,20 ^b	57,4 ± 0,02 ^b
TC (8)	372,11 ± 0,28 ^a	87,3 ± 0,99 ^a	56,3 ± 0,05 ^a

Polifenoli totali sono espressi come mg equivalenti di acido clorogenico (mgCAE) per g di materiale fresco (FW). Flavonoidi totali sono espressi come mg di quercetina equivalente (mgQE) per g di materiale fresco. I dati ($n = 3$) ± SD con lettere diverse all'interno della stessa colonna sono significativamente diverse a $p < 0,05$. Per il controllo positivo del DPPH test, è stato utilizzato il Trolox.

tab. 45 Contenuto in polifenoli, flavonoidi totali ed attività antiossidante (DPPH test) in polpa Tacle® (*storage*)

<i>Citrus</i>	Polifenoli (mgCAE/gFW)	Flavonoidi (mgQE/gFW)	DPPH (IC₅₀) (µg/ml)
TC (0)	174,67 ± 0,61 ^c	67,2 ± 0,99 ^c	48,8 ± 0,05 ^b
TC (6)	205,64 ± 0,56 ^b	75,2 ± 0,50 ^b	49,4 ± 0,05 ^a
TC (8)	228,95 ± 0,88 ^a	87,2 ± 0,49 ^a	49,3 ± 0,08 ^a

Polifenoli totali sono espressi come mg equivalenti di acido clorogenico (mgCAE) per g di materiale fresco (FW). Flavonoidi totali sono espressi come mg di quercetina equivalente (mgQE) per g di materiale fresco. I dati ($n = 3$) ± SD con lettere diverse all'interno della stessa colonna sono significativamente diverse a $p < 0,05$. Per il controllo positivo del DPPH test, è stato utilizzato il Trolox.

4.3.1.2 HPLC determinazione naringina, naringenina ed esperedina

Dall'esame in HPLC di TC sottoposto a stoccaggio per 8 settimane (1° C e 90-95% RH) è stato possibile evidenziare come il contenuto in esperedina, naringina e naringenina sia aumentato in modo significativo durante il periodo di stoccaggio sia per buccia che per polpa (tab. 46, 47). Non sono stati osservati cambiamenti rilevanti nel contenuto di vitamina C durante la conservazione e alla fine del trattamento i livelli evidenziati erano pari a $40,23 \pm 0,02$ mg/100 ml; $40,03 \pm 0,05$ mg/100 m; $40,01 \pm 0,01$ mg/100 ml, rispettivamente a 0, 6 e 8 settimane, tanto da poter affermare che non si sia manifestata una riduzione eccessiva della difesa antiossidante della frutta (Devasagayam et al, 2004; Padayatty et al, 2003; Holt et al, 2009).

tab. 46 Contenuto in esperedina, naringenina, naringina in buccia Tacle® (1 °C e 90 - 95% RH)

<i>Citrus</i>	Flavonoidi (mgQE/gFW)	Esperedina (ppm)	Naringenina (ppm)	Naringina (ppm)
TC (0)	$77,2 \pm 0,49^c$	$193,3 \pm 0,05^c$	$89 \pm 0,03^c$	$63,69 \pm 0,05^c$
TC (6)	$85,1 \pm 0,20^b$	$631,9 \pm 0,03^b$	$298 \pm 0,025^b$	$112,00 \pm 0,05^b$
TC (8)	$87,3 \pm 0,99^a$	$775,1 \pm 0,08^a$	$323 \pm 0,05^a$	$209,5 \pm 0,06^a$

I dati ($n = 3$) \pm SD con lettere diverse all'interno della stessa colonna sono significativamente diverse a $p < 0,05$. Per il controllo positivo del DPPH test, è stato utilizzato il Trolox.

tab. 47 Contenuto in esperedina, naringenina, naringina in polpa Tacle® (1 °C e 90 - 95% RH)

<i>Citrus</i>	Flavonoidi (mgQE/gFW)	Esperedina (ppm)	Naringenina (ppm)	Naringina (ppm)
TC (0)	$67,2 \pm 0,99^b$	$86,8 \pm 0,05^c$	$107 \pm 0,05^c$	$87,69 \pm 0,04^c$
TC (6)	$75,2 \pm 0,50^a$	$162,8 \pm 0,09^b$	$306 \pm 0,05^b$	$185,0 \pm 0,05^b$
TC (8)	$87,2 \pm 0,49^b$	$141,1 \pm 0,08^a$	$307 \pm 0,06^a$	$205,8 \pm 0,03^a$

I dati ($n = 3$) \pm SD con lettere diverse all'interno della stessa colonna sono significativamente diverse a $p < 0,05$. Per il controllo positivo del DPPH test, è stato utilizzato il Trolox.

4.3.2 Saggi enzimatici

4.3.2.1 Inibizione di lipasi e amilasi pancreatica

Tale studio ha voluto validare l'azione inibitoria enzimatica di estratti di agrumi calabresi (bucce, polpa e foglie), nonché di specie ibride impiantate nel nostro territorio (Piana di Sibari) per realizzare un mix dalle potenziali attività protettive nei riguardi del peso corporeo e dei livelli glicemici ematici (Cazarolli et al, 2008; Shen et al, 2012). Dai test *in vitro* di inibizione enzimatica emerge che all'interno delle diverse varietà di *Citrus* sono presenti differenti attività in base alle porzioni di pianta utilizzate (tab. 48, 49) così come dimostrato da altri autori (Uddin et al, 2014; Shen et al, 2012).

Stesso discorso riguarda l'attività inibitoria delle lipasi pancreatiche, in cui, AA, TC e LL, sono le varietà con maggiore attività inibitoria se confrontati con il controllo positivo orlistat ($IC_{50} = 57,20 \pm 0,19 \mu\text{g/ml}$; $r^2=0,997$), seguite da varietà con attività inibitoria moderata MD e TR. Altri autori avevano indagato in merito all'attività inibitoria di estratti di *Citrus* nei riguardi delle lipasi ottenendo risultati pressoché comparabili (Gironés-Vilaplana et al, 2014; Basli et al, 2016; Gyo-Nam et al, 2016) ai nostri. Particolare interesse è stato destinato al frutto ibrido TC che, rispetto agli altri ibridi, MD ed ES è quello che mostra maggiore attività inibitoria nei riguardi della lipasi e dell'amilasi pancreatica, come è possibile osservare dalle tabelle 48 e 49.

Dai risultati ottenuti, si evidenzia la moderata attività inibitoria per lipasi pancreatica in tutti gli estratti di bucce e polpa di *Citrus* spp., testati (tab. 48). I risultati confermano l'interesse scientifico e farmacologico del *Citrus* spp per la gestione delle iperlipidemie e del peso corporeo, già ampiamente trattato da altri autori Kawaguchi et al, 1997; Danış et al, 2015; Kim et al, 2016) e valutabili come potenziali alimenti o integratori ad alta attività biologica utilizzabili ai fini clinici.

Dal confronto tra polpa, buccia e foglie di piante di *Citrus* (tab. 48,49,50) è stato possibile evidenziare come significativa sia l'attività di inibizione, presente anche in foglie (tab. 50) e questo, in relazione all'alto contenuto in flavonoidi.

Nello specifico, significativi valori sono stati ottenuti in estratto di foglie di TC, LL e AA in cui IC_{50} di inibizione di amilasi e lipasi pancreatica.

tab. 48 Inibizione di amilasi e lipasi pancreatici in bucce *Citrus*

Campione	Flavonoidi (mgQE/gFW)	α -amilasi (IC ₅₀)*	lipasi (IC ₅₀)**
ES	11,4 ± 0,91 ^e	102,9 ± 0,61 ^d	255,5 ± 0,22 ^e
NV	46,1 ± 0,32 ^c	200,0 ± 0,10 ^f	276,0 ± 0,18 ^f
AA	31,9 ± 0,11 ^d	98,2 ± 0,37 ^b	94,6 ± 0,20 ^a
TC	87,5 ± 0,55 ^b	98,1 ± 0,12 ^b	94,7 ± 0,10 ^a
TR	48,3 ± 0,57 ^f	102,2 ± 0,14 ^d	109,9 ± 0,13 ^c
LL	107,3 ± 0,20 ^a	96,2 ± 0,51 ^a	94,4 ± 0,3 ^a
MD	46,7 ± 0,28 ^c	100,5 ± 0,29 ^c	113,1 ± 0,10 ^b
MZ	31,3 ± 0,42 ^d	109,9 ± 0,63 ^e	211,3 ± 0,18 ^d

* α -amilasi espressa come concentrazione IC₅₀, ovvero la concentrazione di estratto in $\mu\text{g/ml}$ che inibisce del 50% l'attività enzimatica; Controllo positivo amilasi: acarbose IC₅₀ = 36,50 ± 0,32 $\mu\text{g/ml}$.

**lipasi espressa come concentrazione IC₅₀, ovvero la concentrazione di estratto in $\mu\text{g/ml}$ che inibisce del 50% l'attività enzimatica; Controllo positivo lipasi: orlistat IC₅₀ = 57,20 ± 0,19 $\mu\text{g/ml}$.

tab. 49 Inibizione di amilasi e lipasi pancreatici in polpa *Citrus*

Campione	Flavonoidi (mgQE/gFW)	α -amilasi (IC ₅₀)*	lipasi (IC ₅₀)**
ES	40,8 ± 0,32 ^f	95,0 ± 0,4 ^c	136,1 ± 0,23 ^e
NV	31,9 ± 0,11 ^e	146,8 ± 0,10 ^g	209,4 ± 0,30 ^f
AA	47,2 ± 0,28 ^c	90,5 ± 0,2 ^b	88,1 ± 0,28 ^a
TC	35,3 ± 0,21 ^e	107,0 ± 0,3 ^e	100,1 ± 0,13 ^b
TR	34,3 ± 0,77 ^e	105,3 ± 0,9 ^d	107,1 ± 0,15 ^d
LL	91,4 ± 0,40 ^a	86,02 ± 0,8 ^a	87,7 ± 0,10 ^a
MD	51,5 ± 0,27 ^b	105,1 ± 0,5 ^d	103,4 ± 0,18 ^c
MZ	31,8 ± 0,72 ^e	121,2 ± 0,56 ^f	216,4 ± 0,16 ^g

* α -amilasi espressa come concentrazione IC₅₀, ovvero la concentrazione di estratto in $\mu\text{g/ml}$ che inibisce del 50% l'attività enzimatica; Controllo positivo amilasi: acarbose IC₅₀ = 36,50 ± 0,32 $\mu\text{g/ml}$.

**lipasi espressa come concentrazione IC₅₀, ovvero la concentrazione di estratto in $\mu\text{g/ml}$ che inibisce del 50% l'attività enzimatica; Controllo positivo lipasi: orlistat IC₅₀ = 57,20 ± 0,19 $\mu\text{g/ml}$.

tab. 50 Inibizione di lipasi e amilasi pancreatica in foglie *Citrus*

Campione	Flavonoidi (mgQE/gFW)	α-amilasi (IC₅₀)*	lipasi (IC₅₀)**
ES	94,9 ± 0,99 ^b	141,0 ± 0,1 ^g	101,6 ± 0,33 ^d
NV	105,8 ± 0,71 ^c	76,6 ± 0,6 ^a	87,1 ± 0,8 ^c
AA	101,3 ± 0,98 ^a	78,5 ± 0,3 ^b	84,08 ± 0,40 ^b
TC	100,9 ± 0,79 ^a	84,01 ± 0,3 ^c	81,91 ± 0,62 ^a
TR	99,9 ± 0,99 ^d	105,4 ± 0,4 ^d	106,5 ± 0,36 ^e
LL	101,8 ± 0,22 ^a	76,2 ± 0,2 ^a	82,1 ± 0,3 ^a
MD	95,4 ± 0,21 ^e	112,1 ± 0,3 ^c	118,78 ± 0,7 ^f
MZ	86,7 ± 0,95 ^f	134,9 ± 0,2 ^f	202,0 ± 0,1 ^g

* α -amilasi espressa come concentrazione IC₅₀, ovvero la concentrazione di estratto in $\mu\text{g/ml}$ che inibisce del 50% l'attività enzimatica; Controllo positivo amilasi: acarbose IC₅₀ = 36,50 ± 0,32 $\mu\text{g/ml}$.

**lipasi espressa come concentrazione IC₅₀, ovvero la concentrazione di estratto in $\mu\text{g/ml}$ che inibisce del 50% l'attività enzimatica; Controllo positivo lipasi: orlistat IC₅₀ = 57,20 ± 0,19 $\mu\text{g/ml}$.

Ulteriori studi sono stati eseguiti su campioni di CL, TR e TC (tab. 51, 52 e 53) con l'obiettivo di confrontare l'attività inibitoria dell'ibrido TC rispetto ai "genitori".

Dai dati emerge che, l'attività inibitoria di lipasi pancreatica in estratto di bucce è statisticamente significativa in CL rispetto a TC e TR (tab. 51), rispettivamente, mentre, l'inibizione dell'amilasi è maggiore in estratto di bucce di TC che in CL.

tab. 51 Inibizione di lipasi e amilasi pancreatica in buccia Clementina, Tarocco, Tacle®

Campione	Flavonoidi (mgQE/gFW)	α-amilasi (IC₅₀)*	lipasi (IC₅₀)**
CL	61,3 ± 0,60 ^c	49,86 ± 0,02 ^c	61,3 ± 0,50 ^c
TR	65,9 ± 0,50 ^b	77,16 ± 0,16 ^b	85,9 ± 0,20 ^b
TC	77,2 ± 0,49 ^a	41,23 ± 0,25 ^a	67,2 ± 0,29 ^a

* α -amilasi espressa come concentrazione IC₅₀, ovvero la concentrazione di estratto in $\mu\text{g/ml}$ che inibisce del 50% l'attività enzimatica; Controllo positivo amilasi: acarbose IC₅₀ = 36,50 ± 0,32 $\mu\text{g/ml}$.

**lipasi espressa come concentrazione IC₅₀, ovvero la concentrazione di estratto in $\mu\text{g/ml}$ che inibisce del 50% l'attività enzimatica; Controllo positivo lipasi: orlistat IC₅₀ = 57,20 ± 0,19 $\mu\text{g/ml}$.

Confrontando l'attività inibitoria di polpa di CL, TR e TC, anche in questo caso si evidenzia una significativa attività di inibizione nei riguardi dell'amilasi in TC rispetto a CL e TR (tab. 52). Si evidenzia, oltretutto, una migliore attività di inibizione nei riguardi della lipasi pancreatica da parte di TC e CL: $67,2 \pm 0,30 \mu\text{g/ml}$ ($r^2 = 0,997$) e di $86,3 \pm 0,45 \mu\text{g/ml}$ ($r^2 = 0,996$). Questo può essere giustificato dall'attività specifica della componente flavonoidica, maggiore in TR rispetto al CL, che mostra maggiore e specifica attività sui siti di azione degli enzimi interessati alla digestione (tab. 52).

tab. 52 Inibizione di lipasi e amilasi pancreatica in polpa Clementina, Tarocco, Tacle®

Campione	Flavonoidi (mgQE/gFW)	α -amilasi (IC ₅₀)*	lipasi (IC ₅₀)**
CL	$41,3 \pm 0,52^c$	$99,66 \pm 0,36^c$	$86,3 \pm 0,45^b$
TR	$85,9 \pm 0,21^a$	$57,12 \pm 0,63^b$	$105,9 \pm 0,20^c$
TC	$67,2 \pm 0,99^b$	$44,28 \pm 0,65^a$	$67,2 \pm 0,30^a$

* α -amilasi espressa come concentrazione IC₅₀, ovvero la concentrazione di estratto in $\mu\text{g/ml}$ che inibisce del 50% l'attività enzimatica; Controllo positivo amilasi: acarbose IC₅₀ = $36,50 \pm 0,32 \mu\text{g/ml}$.

**lipasi espressa come concentrazione IC₅₀, ovvero la concentrazione di estratto in $\mu\text{g/ml}$ che inibisce del 50% l'attività enzimatica; Controllo positivo lipasi: orlistat IC₅₀ = $57,20 \pm 0,19 \mu\text{g/ml}$.

Dal confronto tra gli estratti dei tre generi, si evidenzia significativa attività nel TC sia per lipasi che amilasi pancreatica, rispetto a TR e CL, rispettivamente (tab. 53).

tab. 53 Inibizione di lipasi e amilasi pancreatica in estratto di foglie Clementina, Tarocco, Tacle®

Campione	Flavonoidi (mgQE/gFW)	α -amilasi (IC ₅₀)*	lipasi (IC ₅₀)**
CL	$58,6 \pm 0,65^c$	$97,29 \pm 0,89^c$	$98,6 \pm 0,55^c$
TR	$65,2 \pm 0,50^b$	$89,21 \pm 0,06^b$	$85,2 \pm 0,05^b$
TC	$67,2 \pm 0,49^a$	$54,27 \pm 0,28^a$	$63,3 \pm 0,09^a$

* α -amilasi espressa come concentrazione IC₅₀, ovvero la concentrazione di estratto in $\mu\text{g/ml}$ che inibisce del 50% l'attività enzimatica; Controllo positivo amilasi: acarbose IC₅₀ = $36,50 \pm 0,32 \mu\text{g/ml}$.

**lipasi espressa come concentrazione IC₅₀, ovvero la concentrazione di estratto in $\mu\text{g/ml}$ che inibisce del 50% l'attività enzimatica; Controllo positivo lipasi: orlistat IC₅₀ = $57,20 \pm 0,19 \mu\text{g/ml}$.

Da questo si evince che la maggiore attività è senza dubbio conferita all'ibrido TC in tutte e tre le porzioni studiate, rispetto ai genitori.

Inoltre, l'azione inibitoria per amilasi, in porzioni di bucce segue quest'ordine: TC > CL > TR, mentre per polpa e foglie, l'attività è TC > TR > CL.

Per quanto riguarda l'attività inibitoria nei riguardi della lipasi, in estratto di bucce e polpa: TC > CL > TR mentre in foglie l'attività segue quest'ordine: TC > TR > CL.

Per l'inibizione dell'amilasi, invece, estratto di bucce: TC > CL > TR e in estratto di polpa e foglie l'attività tra CL e TR privilegia il secondo TR > CL.

Dato il notevole interesse commerciale nei riguardi di succhi e frutti dotati di spiccate attività salutistiche, il nostro studio ha voluto indagare sull'attività antiossidante di TC sottoposto a stoccaggio in condizioni controllate (1 °C e 90 – 95% HR) per 8 settimane.

Nel nostro studio abbiamo monitorato la componente flavonoidica e la relativa attività biologica esplicitata dalle due porzioni di frutto (bucca e polpa) (tab. 54, 55).

Dai dati si evidenzia come, l'inibizione di lipasi sia aumentata nel corso della conservazione del frutto, questo sicuramente dovuto all'espressione di geni indotti da condizioni di stress (da freddo) che controllano le vie di "difesa" della pianta (ampia bibliografia in merito) e, l'aumento dei metaboliti secondari con relativa attività biologica.

Per quanto riguarda l'attività biologica di inibizione dell'amilasi, si riscontra un significativo aumento dell'attività nel TC a 6 settimane di conservazione nonostante la componente flavonoidica sia continuato ad aumentare nel corso dello stoccaggio (tab. 55).

Tra le due porzioni sono le bucce ad avere maggiore attività biologica nei riguardi dell'amilasi e lipasi rispetto alle polpe. Questo risultato è stato letto nella visione utilitaristica legato al recupero degli scarti di produzione (in questo caso l'invenduto) che permette il recupero di prodotti ad alto valore aggiunto essenziale per le aziende di produzione.

tab. 54 Inibizione di lipasi e amilasi pancreatici in estratto buccia di Tacle® (*storage*)

Campione	Flavonoidi (mgQE/gFW)	α -amilasi (IC ₅₀)*	lipasi (IC ₅₀)**
TC (0)	77,2 ± 0,49 ^c	41,23 ± 0,25 ^b	57,2 ± 0,29 ^c
TC (6)	85,1 ± 0,20 ^b	36,6 ± 0,50 ^a	45,1 ± 0,20 ^a
TC (8)	87,3 ± 0,99 ^a	45,1 ± 0,20 ^c	47,3 ± 0,99 ^b

* α -amilasi espressa come concentrazione IC₅₀, ovvero la concentrazione di estratto in µg/ml che inibisce del 50% l'attività enzimatica; Controllo positivo amilasi: acarbose IC₅₀ = 36,50 ± 0,32 µg/ml.

**lipasi espressa come concentrazione IC₅₀, ovvero la concentrazione di estratto in µg/ml che inibisce del 50% l'attività enzimatica; Controllo positivo lipasi: orlistat IC₅₀ = 57,20 ± 0,19 µg/ml.

tab. 55 Inibizione di lipasi e amilasi pancreatici in estratto polpa di Tacle® durante (*storage*)

Campione	Flavonoidi (mgQE/gFW)	α -amilasi (IC ₅₀)*	lipasi (IC ₅₀)**
TC (0)	67,2 ± 0,99 ^b	68,88 ± 0,25 ^a	87,2 ± 0,25 ^a
TC (6)	75,2 ± 0,50 ^a	57,16 ± 0,90 ^c	65,7 ± 0,50 ^b
TC (8)	87,2 ± 0,49 ^b	55,1 ± 0,03 ^b	67,9 ± 0,25 ^a

* α -amilasi espressa come concentrazione IC₅₀, ovvero la concentrazione di estratto in µg/ml che inibisce del 50% l'attività enzimatica; Controllo positivo amilasi: acarbose IC₅₀ = 36,50 ± 0,32 µg/ml.

**lipasi espressa come concentrazione IC₅₀, ovvero la concentrazione di estratto in µg/ml che inibisce del 50% l'attività enzimatica; Controllo positivo lipasi: orlistat IC₅₀ = 57,20 ± 0,19 µg/ml.

4.3.3 Animali, parametri antropometrici e metabolici

Ratti Wistar sono stati sottoposti a somministrazione di una dieta SD, HDF e HDF + *Citrus* (20 mg) (polpa di TC), all'inizio del trattamento avevano un peso corporeo 250 ± 2 g. Dopo 12 settimane di trattamento con le diverse diete, il peso corporeo medio dei ratti alimentato con HDF era superiore alla SD, ma significativamente diminuito quando è stata somministrato in associazione con estratto di *Citrus* (TC) (Fig. 26). Il BMI degli animali, dopo le 12 settimane non ha mostrato differenze significative tra il gruppo alimentato con HDF e il gruppo a cui è stato somministrato *Citrus*.

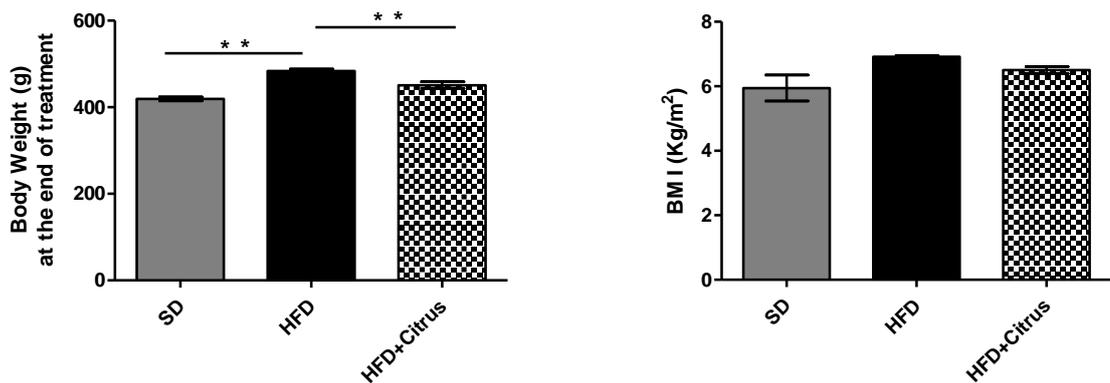


Fig. 26 Peso corporeo e BMI dei ratti alimentati con SD, o HFD o HFD + *Citrus* alla fine del trattamento. n = 5 per ogni gruppo; differenza significativa: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$, *** = $p < 0,001$

La circonferenza della vita di tutti gli animali all'inizio del protocollo sperimentale era di $16,6 \pm 0,2$ cm. Dopo 12 settimane la circonferenza della vita del gruppo HFD era superiore a quella di SD e *Citrus* ma non in maniera significativa (Fig. 27)

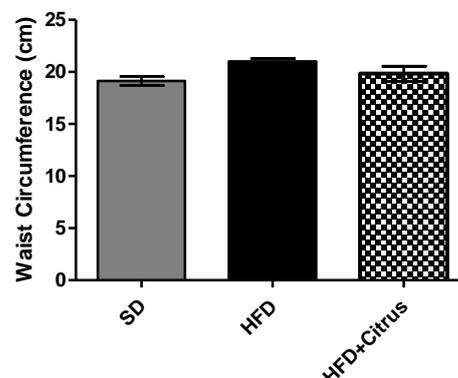


Fig. 27 Circonferenza vita di ratti alimentati con SD, o HFD o HFD + *Citrus* alla fine del trattamento. n = 5 per ogni gruppo; differenza significativa: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$

Il grasso di deposito a livello addominale (Fig. 28a), perirenale (Fig. 28b), epididimale (Fig. 29c), e retroperitoneale (Fig. 28d) era significativamente elevato nei gruppi HFD a confronto con SD, e TC. Topi alimentati con HDF + *Citrus* presentano una significativa riduzione di grasso epididimale e perirenale, mentre non significativa è la riduzione di quello addominale e retroperitoneale.

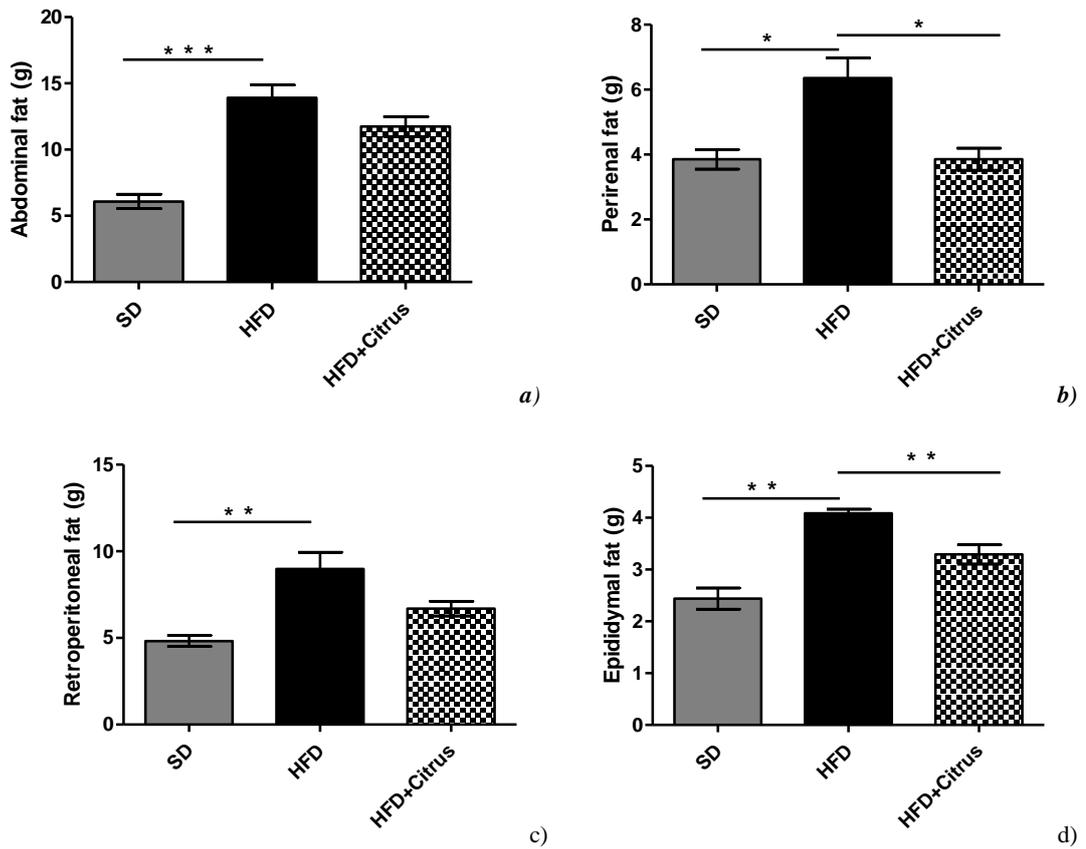


Fig. 28 a) Grasso addominale in ratti alimentati con SD, HDF, HDF + *Citrus* (20mg). b) Grasso perirenale in ratti alimentati con SD, HDF, HDF + *Citrus* (20mg). c) Grasso retroperitoneale ratti alimentati con SD, HDF, HDF + *Citrus* (20mg). d) Grasso epididimale in ratti alimentati con SD, HDF, HDF + *Citrus* (20mg). La differenza è significativa per * = p < 0,05, ** = p < 0,005, *** = p < 0,001

Il peso di cuore (Fig. 29a) e fegato (Fig. 29b) è aumentato nei ratti sottoposti a dieta HDF e HDF + *Citrus*. Risulta significativo l'aumento di fegato nei topi alimentati con dieta HDF e il valore CSI (Fig. 29c) risultava aumentato in animali HFD rispetto a SD; mentre, la somministrazione di *Citrus* ha invertito questa alterazione.

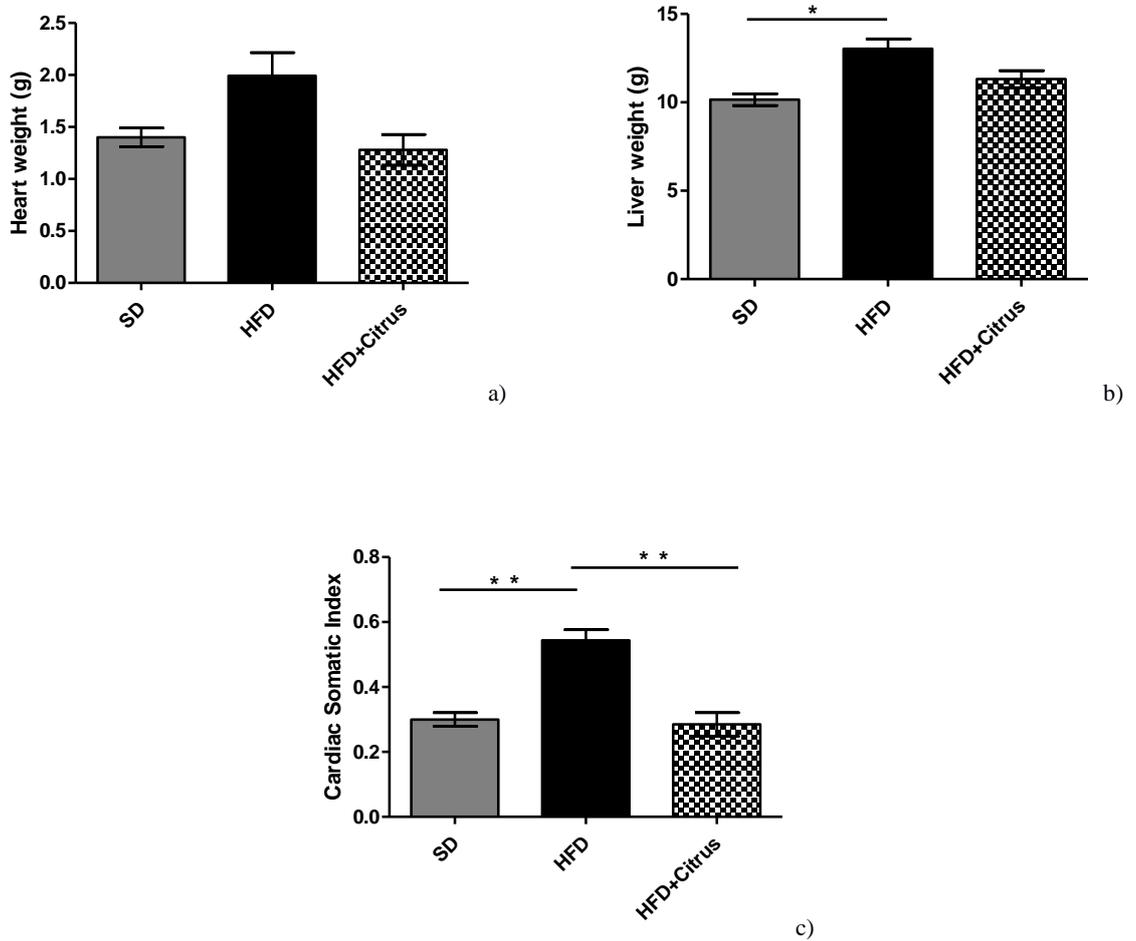


Fig. 29 a) Peso cuore di ratti alimentati con SD, HDF, HDF + *Citrus* (20mg); b) Peso fegato di ratti alimentati con SD, HDF, HDF + *Citrus* (20mg); c) Cardiac Homa Index ratti alimentati con alimentati con SD, HDF, HDF + *Citrus* (20mg). La differenza significativa: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$, *** = $p < 0,001$

Non sono state osservate, invece, differenze statisticamente significative in tutti i gruppi sperimentali sull'intake di acqua, di cibo e di lunghezza del corpo durante le 12 settimane di trattamento.

Dopo 12 settimane, il gruppo HFD mostra un significativo aumento della glicemia basale, dei livelli di insulina plasmatici mentre, per l'HOMA Index non è stata verificata una differenza significativa rispetto al gruppo SD (Fig. 30a). Il trattamento con *Citrus* riduce l'insulina plasmatica e la glicemia basale (Fig. 30b, 30c).

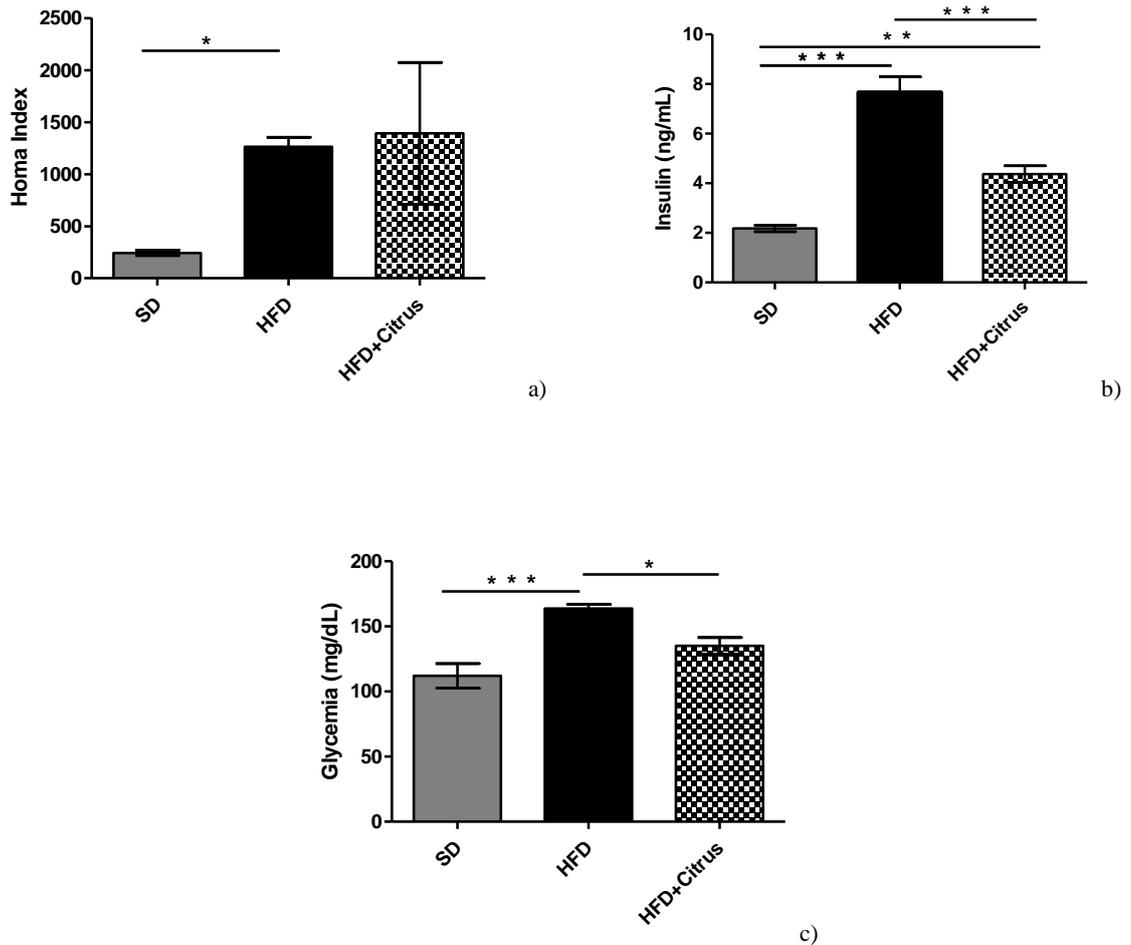


Fig. 30 a) Homa Index ratti alimentati con SD, HDF, HDF + *Citrus* (20mg); b) Livelli di Insulina plasmatica alla fine del trattamento in ratti alimentati con SD, HDF, HDF + *Citrus* (20mg). c) Glicemia plasmatica alla fine del trattamento in ratti alimentati con SD, HDF, HDF + *Citrus* (20mg). La differenza è significativa per *= p < 0,05; **= p < 0,005; ***= p < 0,001

In seguito a somministrazione di dieta HDF, si è assistito ad un aumento dei livelli di colesterolo totale; i ratti con dieta HDF+*Citrus* hanno presentato una riduzione dei livelli di colesterolo n modo significativo (Fig. 31).

I livelli di colesterolo HDL risultano significativamente diminuiti anche nei gruppi con supplementazione (Fig. 31b). Mentre i livelli di colesterolo LDL risultano diminuiti significativamente nel gruppo HDF+*Citrus* rispetto ai gruppi HDF. Interessanti sono stati i parametri riguardanti i livelli di LDL ossidati, in cui, come è possibile osservare dalla Fig. 31c e 31d, risultano significativamente ridotti nel gruppo HDF + *Citrus*.

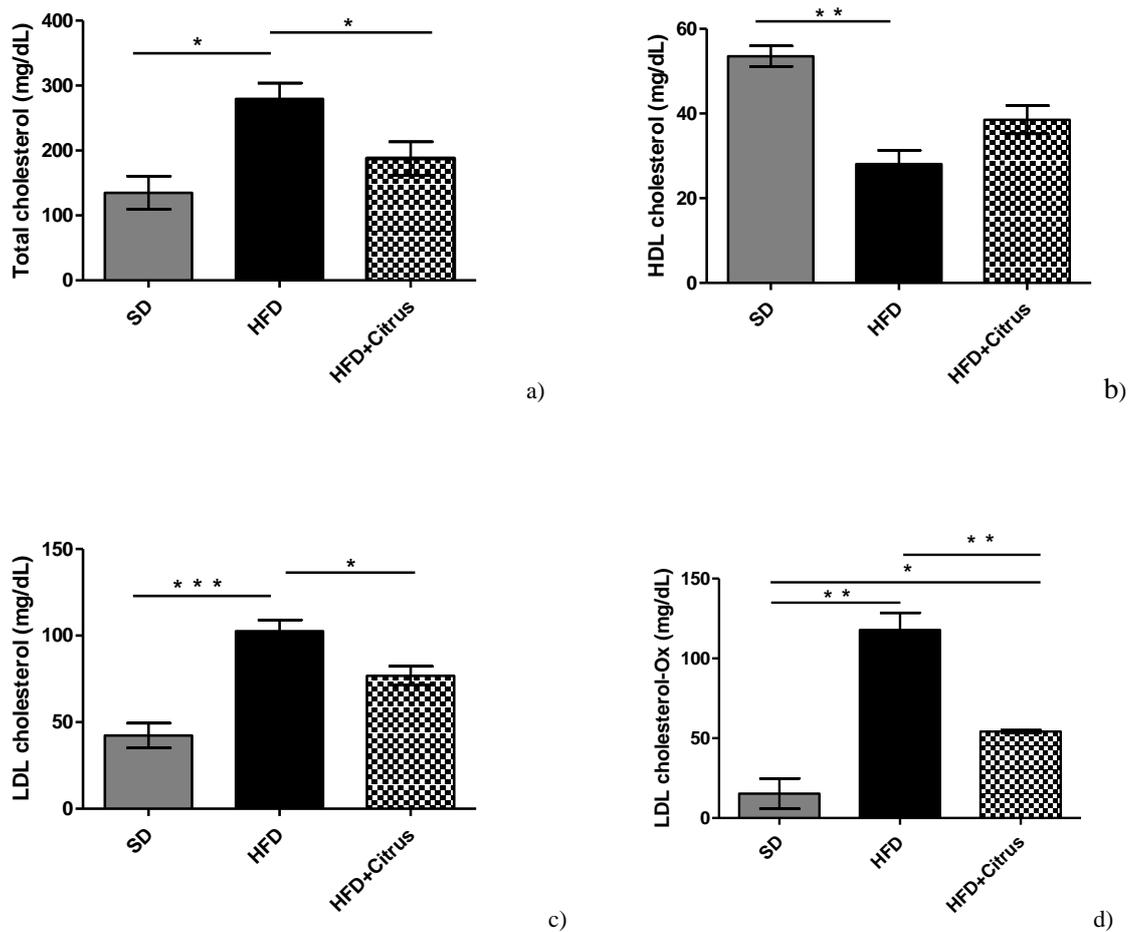


Fig. 31 a) Colesterolo totale plasmatico alla fine del trattamento in ratti alimentati con SD, HDF, HDF + *Citrus* (20mg); b) Colesterolo HDL plasmatico alla fine del trattamento in ratti alimentati con SD, HDF, HDF + *Citrus* (20mg). c) Colesterolo LDL plasmatico alla fine del trattamento in ratti alimentati con SD, HDF, HDF + *Citrus* (20mg). d) Colesterolo LDL - ox plasmatico alla fine del trattamento in ratti alimentati con SD, HDF, HDF + *Citrus* (20mg). La differenza è significativa per *= p < 0,05; **= p < 0,005; ***= p < 0,001

Dai dati emerge, in relazione all'attività esplicata *in vitro* una significativa attività antiossidante plasmatica. Infatti, l'obesità, associata ad un alterato stress ossidativo, rappresenta, come ampiamente discusso, la base fisiopatologica di molte patologie degenerative.

I ratti, sottoposti a dieta HDF hanno manifestato obesità e, conseguentemente, alti livelli di stress ossidativo. In caso di somministrazione di *Citrus* i livelli plasmatici di ROS si riducono significativamente (Fig. 32).

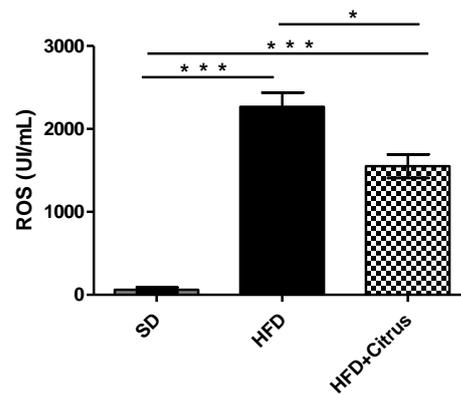


Fig. 32 Pruduzione ROS alla fine del trattamento in ratti alimentati con SD, HDF, HDF + *Citrus* (20mg). La differenza è significativa per *= $p < 0,05$; **= $p < 0,005$; ***= $p < 0,001$

4.4 *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. et Nakai

Considerando il profilo nutrizionale, il consumo di 100 grammi di anguria fornisce 16 kcal (Dati INRAN). Contiene quasi il 94% di acqua e 3,7% di carboidrati disponibili con 0,4% di fibra (0,02% solubile), 280mg/100g di potassio e sempre da dati INRAN, un contenuto in vit C 8mg/100g (Nweze et al, 2015), non contiene lipidi e per tanto, è definito un frutto a basso contenuto calorico (Leskovar et al, 2004; Bruton et al, 2009).

Per il nostro studio si è deciso di indagare le peculiarità della polpa perché è la parte destinata al consumo umano e perché ricca di antiossidanti (licopene) e molecole bioattive (citrullina) tanto da renderlo un buon alimento per atleti in quanto contribuisce al miglioramento dell'endurance (Tarazona-Díaz et al, 2013; Cutrufello et al, 2015) e per soggetti con preipertensione o ipertensione allo stadio I (Wood, 2008; Figueroa et al, 2012; Figueroa et al, 2014; Figueroa et al, 2017).

Nonostante la letteratura ne abbia vantato le proprietà salutistiche, la pratica clinica continua a sconsigliarne in consumo ai soggetti diabetici perché ritenuta un alimento dall'alto indice glicemico (IG). La letteratura, tuttavia, dimostra che l'anguria è un frutto a basso indice (Robert et al, 2008) e tale spiegazione è attribuibile, al fatto che l'anguria contenga una maggiore percentuale di fruttosio (16,4g/100g) che ha un IG (19 ± 2) più basso rispetto al glucosio (9,3 g/100g e IG = 99 ± 3) e che, prima di entrare nella circolazione sanguigna deve essere convertito in glucosio dal fegato (Foster-Powell et al, 2002). Per questo motivo abbiamo valutato il potenziale antiossidante di polpe di angurie di varia provenienza, il contenuto in licopene e in citrullina.

4.4.1 Analisi chimica

4.4.1.1 Polifenoli, flavonoidi e attività antiossidante

Dall'indagine eseguita su polpa di anguria di diversa provenienza, emerge che il contenuto in polifenoli totali è significativamente più alto in frutti provenienti dal territorio di KR (CLKR) seguiti da quelle ecuadoriane (CLE) e costaricane (CLCR). Differente il contenuto in flavonoidi totali, in cui, è possibile apprezzare come siano significativamente maggiori in CLCR, rispetto a quelle CLKR. I risultati sono in linea con quanto dimostrato precedentemente da altri autori (Olabinri et al, 2013; Dieng et al, 2017) (tab. 56).

Per le angurie rumene a polpa gialla (CLRG, CLRL, CLRS, rispettivamente raccolte a giugno, luglio, settembre) per le quali è stato possibile monitorare la fenofase, e quindi il tempo balsamico, è evidenziabile il crescente contenuto in polifenoli e flavonoidi (tab. 56).

Tuttavia, gli effetti terapeutici riconosciuti dalla comunità scientifica al *Citrullus lanatus* sono attribuibili sicuramente all'attività antiossidante conferita dalla componente fitochimica ma soprattutto al licopene (Charoensiri et al, 2009; Yadav and Agarwala, 2011; Lewinsohn et al, 2005) che ha dimostrato di svolgere un ruolo fondamentale nel trattamento delle patologie cardiovascolari (Bohm, 2012, Thies et al, 2017) e nella gestione dell'iperglicemia (Haribabu et al, 2013; Akilandeswari V. et al, 2016) coinvolti nell'insorgenza della MetS.

Dai dati ottenuti, emerge che il contenuto in licopene, è significativamente maggiore in angurie sudamericane (CLCR e CLE) il cui contenuto è quasi il doppio rispetto agli altri campioni e questo ne spiega l'intenso colore rosso nonché la relativa attività biologica (tab. 56).

Per quanto riguarda i campioni di angurie rumene (CLRG, CLRL, CLRS) il contenuto in licopene è cresciuto linearmente durante la fenofase ma risulta significativamente più basso rispetto alle altre angurie, conferendo al frutto il tipico colore giallo dorato.

tab. 56 Contenuto in polifenoli, flavonoidi totali ed attività antiossidante (DPPH test) polpa *Citrullus lanatus*

Provenienza	Polifenoli (mgCAE/gFW)	Flavonoidi (mgQE/gFW)	Licopene (µg/g)
CLB	14,98 ± 0,13 ^d	5,32 ± 0,08 ^c	19,00 ± 0,24 ^c
CLCR	16,07 ± 0,09 ^d	7,89 ± 0,40 ^a	39,68 ± 0,13 ^a
CLE	17,50 ± 0,32 ^b	5,37 ± 0,04 ^c	28,28 ± 0,45 ^b
CLL	16,73 ± 0,80 ^c	3,41 ± 0,02 ^d	18,08 ± 0,58 ^d
CLLM	15,84 ± 0,15 ^d	2,79 ± 0,05 ^e	17,70 ± 0,11 ^e
CLKR	18,70 ± 0,09 ^a	6,28 ± 1,00 ^b	15,09 ± 0,37 ^f
CLRG	11,21 ± 0,18 ^f	3,12 ± 0,98 ^d	6,21 ± 0,88 ⁱ
CLRL	13,68 ± 0,50 ^e	4,34 ± 0,50 ^d	8,68 ± 0,23 ^h
CLRS	15,02 ± 0,04 ^d	6,92 ± 0,98 ^b	9,02 ± 0,50 ^g

Polifenoli totali sono espressi come mg equivalenti di acido clorogenico (mgCAE) per g di materiale fresco (FW). Flavonoidi totali sono espressi come mg di quercetina equivalente (mgQE) per g di materiale fresco. I dati ($n = 3$) ± SD con lettere diverse all'interno della stessa colonna sono significativamente diverse a $p < 0,05$. Per il controllo positivo del DPPH test, è stato utilizzato il Trolox

Dai saggi per la determinazione dell'attività antiossidante, è possibile riscontrare coerenza se paragonati al contenuto in polifenoli e licopene, sulla specifica attività antiossidante svolta dalle polpe di anguria (tab. 57).

tab. 57 Attività antiossidante in relazione al contenuto in polifenoli e licopene in polpa *Citrullus lanatus*

Provenienza	Polifenoli (mgCAE/gFW)	Licopene (μ g/g)	DPPH (IC ₅₀) (μ g/ml)
CLB	14,98 \pm 0,13 ^d	19,00 \pm 0,24 ^c	2,68 \pm 0,57 ^f
CLCR	16,07 \pm 0,09 ^d	39,68 \pm 0,13 ^a	0,60 \pm 0,41 ^a
CLE	17,50 \pm 0,32 ^b	28,28 \pm 0,45 ^b	0,64 \pm 0,18 ^b
CLL	16,73 \pm 0,80 ^e	18,08 \pm 0,58 ^d	1,73 \pm 0,58 ^e
CLLM	15,84 \pm 0,15 ^d	17,70 \pm 0,11 ^e	1,52 \pm 0,44 ^d
CLKR	18,70 \pm 0,09 ^a	15,09 \pm 0,37 ^f	1,42 \pm 0,99 ^c
CLRG	11,21 \pm 0,18 ^f	6,21 \pm 0,88 ⁱ	3,82 \pm 1,03 ^g
CLRL	13,68 \pm 0,50 ^e	8,68 \pm 0,23 ^h	3,61 \pm 0,99 ^h
CLRS	15,02 \pm 0,04 ^d	9,02 \pm 0,50 ^g	3,62 \pm 0,83 ^h

Polifenoli totali sono espressi come mg equivalenti di acido clorogenico (mgCAE) per g di materiale fresco (FW). I dati ($n = 3$) \pm SD con lettere diverse all'interno della stessa colonna sono significativamente diverse per $p < 0,05$. Per il controllo positivo del DPPH test, è stato utilizzato il Trolox

Tuttavia, interessante è notare come l'attività antiossidante nelle angurie rumene CLRL e CLRS rimanga significativamente invariata nel periodo di maturazione compreso tra luglio e settembre nonostante il contenuto in licopene e polifenoli sia aumentato.

Così come dimostrato da Jaskani et al, 2005, Zhao et al, 2013 per le angurie a polpa gialla, il contenuto in licopene è significativamente ridotto e pertanto rispondente ad una ridotta attività antiperossilica rilevata attraverso il β -carotene bleaching test (tab. 58).

Difatti, è dimostrato che l'attività antiossidante viene persa dopo 60' a trattamento termico.

L'andamento difforme dei risultati, si può spiegare con la differente composizione rilevata, sia per la frazione polifenolica, sia per lo stesso contenuto in licopene.

I dati fitochimici, inoltre, sono stati utilizzati per spiegare i risultati trovati per i test biologici di inibizione enzimatica, presentati in seguito (tab. 59, 60).

Il risultato totale dell'analisi, rivela come, da un lato, tale frutto sia ascrivibile nell'elenco dei cibi di stagione consigliati per l'apporto di fitocomplessi e nutrienti utilissimi perché efficacemente funzionali nei riguardi dello stress ossidativo, dall'altra, per essere ritenuto una interessante fonte di citrullina.

I dati rilevati evidenziano un più alto contenuto di citrullina, sia buccia dei campioni provenienti dal Brasile (CLB), Ecuador (CLE) nonché in quelli di provenienza italiana e coltivate a Latina (CLL) e a Lamezia Terme (CLLM), mentre, sorprendentemente, interessante è stato il rinvenimento in polpe CLE, CLKR e CLL, di citrullina, rispettivamente.

Quest'ultimo dato è particolarmente sensibile per lo scopo del lavoro; infatti, la citrullina che si candida come ottimo componente per la realizzazione di un mix ad azione multifunzionale e di protezione dell'endotelio vascolare, può essere assunta, anche se in quantità significativamente ridotte rispetto alla buccia, anche nella polpa.

tab. 58 Contenuto in flavonoidi totali ed attività antiossidante (β -carotene *bleaching* test) in estratto di polpa *Citrullus lanatus*

Provenienza	Licopene ($\mu\text{g/g}$)	β-carotene 30' (IC₅₀) ($\mu\text{g/ml}$)	β-carotene 60' (IC₅₀) ($\mu\text{g/ml}$)
CLB	19,00 \pm 0,24 ^c	54,5 \pm 0,05 ^e	99,96 \pm 0,07 ^d
CLCR	39,68 \pm 0,13 ^a	28,4 \pm 0,03 ^a	93,44 \pm 0,11 ^b
CLE	28,28 \pm 0,45 ^b	30,8 \pm 0,26 ^b	94,95 \pm 0,30 ^c
CLL	18,08 \pm 0,58 ^d	34,2 \pm 0,13 ^c	91,91 \pm 0,19 ^a
CLLM	17,70 \pm 0,11 ^e	62,5 \pm 0,35 ^f	115,96 \pm 0,47 ^e
CLKR	15,09 \pm 0,37 ^f	48,5 \pm 1,00 ^d	99,94 \pm 0,11 ^d
CLRG	6,21 \pm 0,88 ⁱ	71,2 \pm 0,98 ^g	133,22 \pm 1,03 ^h
CLRL	8,68 \pm 0,23 ^h	99,4 \pm 1,00 ^h	132,61 \pm 0,99 ^f
CLRS	9,02 \pm 0,50 ^g	99,2 \pm 0,98 ^h	132,02 \pm 0,83 ^g

I dati ($n = 3$) \pm SD con lettere diverse all'interno della stessa colonna sono significativamente diverse a $p < 0,05$. Per il controllo positivo del β -carotene *bleaching* test, è stato utilizzato il Trolox

tab. 59 Contenuto di L-citrullina in buccia e polpa espressa in mg/g

Provenienza	Buccia (mg/gFW)	Polpa (mg/gFW)
CLB	2,60 \pm 0,12 ^c	0,38 \pm 0,09 ^d
CLCR	1,87 \pm 0,01 ^b	0,38 \pm 0,11 ^d
CLE	2,32 \pm 0,03 ^a	0,87 \pm 0,03 ^a
CLL	2,31 \pm 0,17 ^a	0,47 \pm 0,07 ^b
CLLM	2,33 \pm 0,17 ^a	0,10 \pm 0,02 ^f
CLKR	1,31 \pm 0,04 ^d	0,51 \pm 0,08 ^c
CLRG	0,71 \pm 0,09 ^e	0,25 \pm 0,03 ^e
CLRL	0,68 \pm 0,03 ^f	0,11 \pm 0,09 ^f
CLRS	0,12 \pm 0,05 ^g	0,02 \pm 0,03 ^g

I dati ($n = 3$) \pm SD con lettere diverse all'interno della stessa colonna sono significativamente diverse a $p < 0,05$

4.4.1.2 Saggi enzimatici

I campioni di polpa di buccia, nonostante le peculiari attività antiossidanti mostrate attraverso il test del DPPH e del BCB, non mostrano possedere significativa attività di inibizione rispetto al controllo orlistat e acarbose nell'inibizione di lipasi e amilasi rispettivamente.

Tuttavia, è dimostrata l'attività di inibizione delle amilasi, contribuendo alla riduzione della digestione degli zuccheri nel lume intestinale e per tanto, in grado di rallentare l'assorbimento del glucosio e il rispettivo aumento plasmatico. Questo dato risulta particolarmente interessante se visto nell'ottica della gestione clinica del paziente diabetico per il quale, di solito, l'anguria viene fortemente sconsigliata nell'integrazione dietetica.

tab. 60 Inibizione di lipasi e amilasi in estratto di polpa *Citrullus lanatus*

Provenienza	Polifenoli (mgCAE/gFW)	α -amilasi (IC ₅₀)*	lipasi (IC ₅₀)**
CLB	14,98 ± 0,13 ^d	186,1 ± 0,75 ^f	143,36 ± 1,52 ^e
CLCR	16,07 ± 0,09 ^d	171,3 ± 0,35 ^b	137,50 ± 0,70 ^d
CLE	17,50 ± 0,32 ^b	184,4 ± 0,40 ^e	130,55 ± 0,28 ^c
CLL	16,73 ± 0,80 ^c	169,7 ± 0,58 ^c	126,57 ± 0,71 ^b
CLLM	15,84 ± 0,15 ^d	176,3 ± 0,84 ^d	166,78 ± 0,35 ^f
CLKR	18,70 ± 0,09 ^a	145,5 ± 0,50 ^a	117,10 ± 0,19 ^a
CLRG	11,21 ± 0,18 ^f	322,1 ± 1,03 ⁱ	312,1 ± 0,98 ⁱ
CLRL	13,68 ± 0,50 ^e	261,3 ± 1,01 ^h	234,6 ± 1,00 ^h
CLRS	15,02 ± 0,04 ^d	202,4 ± 0,83 ^g	192,4 ± 0,98 ^g

* α - amilasi espressa come concentrazione IC₅₀, ovvero la concentrazione di estratto in $\mu\text{g/ml}$ che inibisce del 50% l'attività enzimatica; Controllo positivo amilasi: acarbose IC₅₀ = 36,50 ± 0,32 $\mu\text{g/ml}$

**lipasi espressa come concentrazione IC₅₀, ovvero la concentrazione di estratto in $\mu\text{g/ml}$ che inibisce del 50% l'attività enzimatica; Controllo positivo lipasi: orlistat IC₅₀ = 57,20 ± 0,19 $\mu\text{g/ml}$.

Conclusioni

Il nostro lavoro ha dimostrato l'efficacia e la possibilità di utilizzo, attraverso saggi *in vitro*, di estratti dotati di spiccate attività *radical scavenging* e specifica attività biologica nel controllo e gestione dei parametri implicati nell'insorgenza di obesità, iperlipidemia e iperglicemia.

A questo scopo sono state prese in considerazione *M. comosum* (L.) Mill. come rappresentante della vasta famiglia delle *Hyacinthaceae*, diverse cultivar di *Citrus* (L). per le *Rutaceae* e il *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. et Nakai per le *Cucurbitaceae*, essendo tutte specie commestibili e ampiamente utilizzate nella cucina tradizionale calabrese. Di esse abbiamo selezionato diverse specie e/o cultivar e distinto tra le droghe vegetali differenti, evidenziando anche, le differenze fitochimiche e biologiche in funzione dell'areale di crescita.

Nello specifico, tra tutti i bulbi (Calabria, Basilicata, Puglia, Marocco) e porzioni di pianta (gambi e foglie) analizzati per *M. comosum* sono i primi, ad avere manifestato significativa attività. Poiché pochi studi di attività biologica sono stati effettuati su bulbi recuperati in Sila (Calabria, Italia), quelli indicativi della popolazione silana, hanno mostrato di possedere spiccate attività: i bulbi di *M. comosum* sono stati segnalati per la significativa attività *radical scavenging* testata attraverso il DPPH test, l'attività antiperossilica testata con BCB e per la significativa attività biologica di inibizione di lipasi e amilasi pancreatiche implicate nella digestione di grassi e amidi. Le specifiche attività biologiche riservate ai bulbi di *M. comosum* sono state attribuite alla presenza e all'identificazione, per la prima volta, di due molecole di 3-benzil-4-cromanone.

Gli studi *in vitro* di bulbi di *M. comosum* hanno così fornito le basi per ritenere il bulbo un buon candidato per i test *in vivo* e per verificare la reale attività protettiva verso la MetS, in ratti con obesità indotta.

Al contempo, abbiamo studiato, in linea con quelle che erano le informazioni reperite in letteratura, diverse specie di *Citrus* differenziando anche in questo caso la droga vegetale studiata, al fine di valutare le caratteristiche fitochimiche e relative attività biologiche di quelle coltivate nella Piana di Sibari (Calabria, Italia) che occupano il principale comparto agricolo della Regione.

I nostri campioni, hanno mostrato possedere contenuto in polifenoli e flavonoidi, nonché significativa attività antiossidante tanto da ritenerli particolarmente indicati per l'integrazione dietetica nei pazienti con fattori di rischio per la MetS. Il nostro studio ha ulteriormente dimostrato, l'effetto di inibizione delle amilasi pancreatiche che aprirebbe uno scenario molto discusso in ambito clinico, sul consumo della frutta (e negli agrumi dello specifico) nei soggetti con diabete di tipo 2.

Il nostro studio, ha dimostrato le peculiarità antiossidanti e biologiche di *Citrus limon* reperito nella zona di Rocca Imperiale (Calabria, Italia), prodotto di marchio IGP e di *Citrus aurantifolia*, per i quali letteratura aveva ampiamente dimostrato effetti biologici, confrontandoli con quelli ottenuti da specie ibride (Tacle®, Early Sicily® e Mandalate®) messe a punto dal CREA – Agrumicoltura di Acireale (Sicilia, Italia) per le quali, invece poco è stato scritto.

Abbiamo dimostrato, dal confronto tra foglie e porzioni di frutto di Tacle®, Early Sicily® e Mandalate®, che è il Tacle® quello dotato di maggiori attività *radical scavenging* e relative attività biologiche esplicate nei confronti dell'inibizione della lipasi e amilasi pancreatiche alla pari dei controlli (orlistat e acarbosio).

Per tale ragione, abbiamo voluto indagare le caratteristiche fitochimiche di questa nuova specie ibrida confrontandola con i genitori Clementina e Tarocco. Le adeguate tecniche colturali, le condizioni climatiche e le peculiarità del terreno, hanno permesso a questa varietà di nuovo impianto calabrese, di essere presentata sul mercato dei succhi come prodotto dotato di alto potere

salutistico. Infatti, dati quali e quantitativi, anche il contenuto in flavonoli, esperedina, naringina e naringenina, è significativamente superiore nel Tacle® rispetto ai genitori, Clementina e Tarocco.

Dai nostri studi emerge anche, che il Tacle® è un frutto che mantiene le proprie peculiarità nutrizionali, sia in termini di Vit. C che di componente fitochimica e relativa attività antiossidante, inalterate durante le fasi di stoccaggio a basse temperature.

Tutte le specie appartenenti al genere *Citrus* trattate, hanno mostrato attività biologiche significative, sia nei riguardi delle amilasi che delle lipasi, confermando quanto già ampiamente trattato in letteratura da altri autori per questo genere.

Tuttavia, dato il notevole interesse commerciale per il nuovo ibrido, abbiamo testato l'estratto di polpa di Tacle® in ratti con obesità indotta.

Per l'ottenimento di un mix multifunzionale che avesse attività protettiva nei riguardi dei parametri patologicamente rilevanti per la diagnosi di MetS, abbiamo ritenuto che le specie di *Citrullus lanatus* le cui peculiarità antiossidanti dovute al licopene erano abbastanza note in letteratura, fossero le miglior candidate per la gestione dell'ipertensione arteriosa in virtù del contenuto in L- citrullina. Com'è noto, L- citrullina è il precursore della produzione endogena di L-arginina che è un substrato fondamentale per la sintesi di ossido nitrico (NO). Abbiamo dimostrato che, le polpe di *Citrullus lanatus* sono dotate di peculiari attività antiossidanti e biologiche esplicate nei confronti di amilasi e lipasi anche se, tali risultati mostrano valori significativamente molto distanti dai dati ottenuti dai controlli positivi.

Il nostro lavoro, per la prima volta, ha valutato gli effetti metabolici e antropometrici a lungo termine degli estratti di bulbi di *M. comosum* e di estratti di polpa di Tacle® su un modello di ratto indotto ad obesità in seguito a dieta iperlipidica, dimostrando gli importanti effetti biologici del bulbo e del frutto sull'obesità.

Per tale ragione gli estratti di *M. comosum* (20 mg o 60 mg) e gli estratti di Tacle® (20 mg) sono stati somministrati per via orale in aggiunta a una dieta ricca di grassi per valutare se e in che misura avrebbero potuto contrastare obesità, iperglicemia, iperlipidemia che sono fattori correlati alla Sindrome metabolica.

Innanzitutto, i dati attuali mostrano una significativa azione inibitoria dell'estratto di bulbi *M. comosum* e di polpa di Tacle® sull'attività enzimatica della lipasi pancreatica *in vitro*. Da notare, i risultati del presente studio forniscono una forte indicazione circa la capacità dell'estratto di bulbo di *M. comosum* e l'estratto di polpa di Tacle® di inibire anche l'azione dell' α -amilasi e quindi di mostrare un metabolismo attivo anche nei riguardi della digestione degli amidi.

In questo lavoro, è stato dimostrato che l'attività biologica degli estratti di bulbi, è da attribuirsi alla presenza di *homoisoflavanoids* e nello specifico del tipo 3-benzil-4-cromone ampiamente trattato in letteratura. Il nostro studio, dopo accurate indagini, ha permesso di identificare due nuove molecole di *homoisoflavanoids* in bulbi di *M. comosum*.

Per meglio definire la componente biologicamente attiva del Tacle®, abbiamo valutato il contenuto in esperedina, naringina e naringenina le cui peculiarità sono state ampiamente studiate in letteratura sia su saggi *in vivo* che *in vitro*.

Per *M. comosum*, l'ampia gamma di attività osservate *in vitro* per gli estratti di bulbi può spiegare gli effetti sui parametri metabolici e antropometrici valutati nei ratti HFD integrati con Lc (20 mg) o Lc (60 mg). L'HFD è in grado di alterare l'equilibrio tra introito calorico e dispendio energetico, causando prima il sovrappeso e poi l'obesità, con conseguente aumento di specie reattive dell'ossigeno (ROS) da cui origina una infiammazione cronica che è alla base delle principali patologie alimentazione correlate. Nel presente studio, l'HFD ha indotto un aumento

del peso corporeo senza modificare la lunghezza del corpo dei ratti, da cui è emerso un aumentato BMI. Poiché, il BMI rappresenta un modo semplice e comune per stimare il grasso corporeo, partendo dal presupposto che in soggetti con la stessa altezza, le variazioni di peso sono dovute alla massa grassa (Kopelmam, 2000), è un indice molto utilizzato per indicare il grado di obesità e fornire un'utile indicazione sui rischi metabolici associati. Secondo questa considerazione, infatti, i ratti trattati con HFD hanno mostrato un aumento della massa grassa rispetto al gruppo di controllo SD. L'aumento del BMI, della massa grassa e della circonferenza della vita, partendo dal modello animale, rappresentano un forte fattore predittivo di condizioni fisiopatologiche come il diabete di tipo 2, l'ipertensione e la dislipidemia (Matthews et al, 1985; Han et al, 1995). D'altra parte, la disposizione di adipe a livello viscerale e intra-addominale, come visibile nel gruppo HFD, è principalmente responsabile dello sviluppo di ipertensione, di elevati livelli di insulina plasmatica e di insulino-resistenza, di diabete mellito e iperlipidemia (Kopelmam, 2000).

In particolare, la valutazione preliminare della resistenza all'insulina nel presente studio è stata eseguita utilizzando semplici parametri deriva: a partire dalla glicemia basale ai livelli di insulina, generando l'indice HOMA-IR. Un aumento di tale 'indice, registrato nei ratti HFD, potrebbe indicare l'instaurarsi di una insulino resistenza presente generalmente nella fase iniziale del diabete e delle steatoepatite (Matthews et al, 1985). Questi dati corrispondono sia all'aumento dei livelli plasmatici di insulina e glucosio del gruppo HFD sia all'aumento del numero e delle dimensioni dei vacuoli ricchi di grasso e delle aree adipocitarie osservate al microscopio ottico, indicativo di steatosi e responsabile anche del peso del fegato che è risultato aumentato. In questo studio sono stati anche valutati i cambiamenti epatici di due enzimi regolatori chiave della gluconeogenesi, come PEPCCK e G6Pasi- α e che una compromissione della gluconeogenesi promuove la produzione di glucosio epatico aggravando la resistenza all'insulina (Sharabi et al, 2015) e contribuendo fortemente alla patogenesi di iperglicemia e intolleranza al glucosio (Barthel and Schmoll, 2003). Nei nostri dati, *M. comosum* ha ridotto i livelli di espressione della proteina di PEPCCK e G6Pase- α . Questi possono rafforzare i risultati che indicano la capacità di *M. comosum* di migliorare la sensibilità all'insulina e la gluconeogenesi epatica che modula la tolleranza al glucosio.

L'aumento del volume ematico totale tipico di MetS provoca un aumento del precarico ventricolare sinistro e della gittata cardiaca a riposo (de Divitiis et al, 1981). Il cuore risponde con cambiamenti strutturali, aumentando il riempimento del ventricolo sinistro, la dimensione della cavità ventricolare sinistra e lo stress di parete. Come rilevato nel presente studio, la massa ventricolare sinistra e CSI aumentano proporzionalmente al BMI, poiché la dilatazione miocardica causa ipertrofia (Lauer et al, 1991). Presi insieme, tutti gli effetti osservati nei ratti HFD sono particolarmente rilevanti se confrontati con quelli ottenuti nei gruppi sperimentali in cui l'HFD è stato integrato con estratti di Lc (20 mg) o Lc (60 mg).

In questo studio, sia Lc (20 mg) che Lc (60 mg) sono stati in grado di abolire gli effetti avversi sui parametri metabolici e antropometrici degli animali HFD. Un ruolo chiave degli effetti positivi suscitati dagli estratti è certamente giocato dalla sua capacità antiossidante, essendo in grado di contrastare sia la produzione di ROS che quella del colesterolo LDL indotta dall'HFD.

In conclusione, tra le azioni benefiche osservate per gli estratti di bulbi *M. comosum*, oltre alla sua capacità antiossidante, può essere rappresentato dai suoi effetti inibitori sulle attività delle lipasi e delle amilasi.

In realtà, tutti gli effetti collaterali negativi di MetS sono legati alla resistenza all'insulina e alla conseguente dislipidemia, causata da un alterato equilibrio tra consumo di energia e consumo di energia che, a sua volta, è causato da un comportamento nutrizionale sbagliato. Quindi, l'azione

a monte degli estratti di bulbo *M. comosum*, nel ridurre la digestione dei grassi e dei carboidrati e l'assorbimento nel lume intestinale, potrebbe determinare, indirettamente, tutti gli altri effetti benefici.

L'ipotesi che sia Lc (20 mg) che Lc (60 mg) siano in grado di contrastare gli effetti negativi dell'HFD su parametri metabolici e antropometrici, apre la strada all'uso di *M. comosum* come farmaco naturale nella gestione dell'obesità e dei fattori di rischio della MetS. Ciò consente di ottenere un prodotto naturale dall'alto potenziale terapeutico senza i tipici effetti collaterali delle medicine sintetiche tradizionali.

Inoltre, l'estratto di bulbi è stato utilizzato per valutare la suscettibilità del miocardio all'ischemia attraverso tecniche di ischemia/riperfusion (I/R) su ratti sani, sottoposti a dieta SD. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza che, l'estratto induce un iniziale aumento della contrattilità cardiaca significativa alla prima dose testata ed a un effetto di riduzione della contrattilità alle dosi più alte (10^{-7} e 10^{-6} M).

Questo effetto bifasico è tipico dei polifenoli (Quintieri et al, 2013) e conferma l'attività di rilassamento cardiaco positivo a dosi basse e negativo a dosi alte suggerendo che l'estratto determina un maggiore rilassamento del cuore.

Anche l'estratto di polpa di Tacle®, testato preliminarmente alla dose di 20 mg/die, ha significativamente ridotto il peso corporeo in ratti alimentati con HDF quando aggiunto nella dieta, rispetto al gruppo senza supplementazione. Differenze significative sono state rilevate nella quantità di adipe perirenale e epididimale ma non nei riguardi dell'adipe addominale, dimostrando che la dose di 20 mg/die non è sufficiente per garantire una totale copertura preventiva nei riguardi del grasso biologicamente più attivo (viscerale).

Inoltre, il CSI (*cardiac somatic index*), parametro utile per valutare complessivamente la funzione cardiaca, poiché mette in correlazione il volume di sangue pompato dal cuore con la superficie corporea dell'individuo, risulta significativamente ridotto in ratti dopo somministrazione con dieta HDF + 20 mg di estratto.

Allo stesso tempo sono stati testati i livelli di insulina e glucosio plasmatico che erano più elevati nei ratti alimentati con HDF e significativamente diminuita in ratti con dieta HDF + 20 mg di estratto. Tuttavia, nonostante i livelli di insulina fossero ridotti, l'Indice HOMA- IR non è stato significativamente diminuito nei ratti con somministrazione di 20 mg di estratto. Anche in questo caso, è intuibile che la dose utilizzata non è efficace e pertanto, ulteriori studi sono richiesti dato le peculiarità di questo frutto. Il colesterolo totale e il grado di ossidazione delle LDL che rappresentano un elevato fattore di rischio per l'insorgenza e la progressione dell'aterosclerosi, nei ratti HDF supplementati con l'estratto, risulta significativamente ridotto. Inoltre, l'estratto ha mostrato significativa attività antiossidante, essendo in grado di contrastare sia la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che quella del colesterolo LDL indotta dall'HFD. Infatti, lo stress ossidativo cellulare e il successivo danno ossidativo sono associati a un eccesso di specie chimiche ad alto potenziale reattivo specificatamente molto dannoso alle vie metaboliche (McMurray et al, 2016) responsabile dell'ossidazione del colesterolo LDL la cui deposizione all'interno delle pareti dei vasi sanguigni porta a una proliferazione di cellule infiammatorie all'interno della parete arteriosa, con formazione di ateroma e placche che gradualmente restringono il lume del vaso e ostacolano il flusso sanguigno, dando origine a aterosclerosi (Huang et al, 2008).

Nonostante il Tacle® abbia permesso di raggiungere risultati non totalmente soddisfacenti alla dose testata, il nostro obiettivo rimane quello dell'attività multifunzionale che questo svolgerà

in vivo su uomo, nei riguardi delle attività biologiche, in associazione con *M. comosum* e *C. lanatus*.

Il risultato complessivo del lavoro ha, quindi portato a esprimere un'ipotesi di formulato multifunzionale in cui i tre estratti, nelle dosi testate singolarmente *in vivo* per *M. comosum* e Tacle® e *in vitro* per *Citrullus lanatus*, trovano posto in un unico mix che è stato micro-incapsulato utilizzando il 30% di Maltodestrine (Laborfarm) come agente di rivestimento. Di questa nuova formulazione, in attesa di prove di stabilità ossidativa, nonostante la normativa europea per gli integratori non obblighi a trial clinici, è in corso documentazione, in collaborazione con l'Università *De Vest Vasile Goldis* di Arad (Romania), per autorizzazione alla somministrazione orale dell'integratore in pazienti con fattori di rischio per la MetS.

Bibliografia

- Abd E. Azim W.M., Ahmed S.T.h., 2009. Effect of salinity and cutting date on growth and chemical constituents of *Achillea fragratissima* Forssk, under Ras Sudr conditions. *Res J Agr Biol Sci* 5(6):1121-9
- Adinolfi M., Aquila T., Barone G., Lanzetta R., Parrilli M., 1989. Homoisoflavanones from *Bellevalia romana*. *Phytochemistry*, 28(11):3244-3246
- Adinolfi M., Barone G., Belardini M., Lanzetta R., Laonigro G. and Parrilli M., 1984. 3-Benzyl-4-chromanones from *M. comosum*. *Phytochemistry*, 23:2091–2093
- Adinolfi M., Barone G., Belardini M., Lanzetta, R Laonigro, G. Parrilli, M., 1985. Homoisoflavanones from *M. comosum* bulbs. *Phytochemistry*, 24:2423-2426
- Adinolfi M., Barone G., Giordano F., Lanzetta R., and Parrilli M., 1990. Absolute configuration of benzocyclobutene homoisoflavanones from *Muscari* species. *Tetrahedron*, 46(18):6565–6574
- Adinolfi M., Lanzetta R., Laonigro G., Parrilli M., and Breitmaier E., 1986. Magnetic Resonance in Chemistry, 24:663
- Ågren J.A., Greiner S., Johnson M.T., Wright S.I., 2015. No evidence that sex and transposable elements drive genome size variation in evening primroses. *Evolution*, 69:1053–1062
- Ahmed Hassan L.E, Mohd Sirat H., Ahemd Yagi S.M., Koko W.S., Abdelwahab S.I., 2011. In vitro antimicrobial activities of Chloroformic, Hexane and Ethanolic extract of *Citrullus lanatus* var. *citroides* (Wild melon). *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(8):1338-44
- Akilandeswari V., Karthikeyan S., Vasanth S., Elavarasi P., 2016. Study on Antihyperglycemic Effect of Lycopene in Alloxan Induced Diabetes in Rats. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, 5(11):244-246
- Akiyama S., Katsumata S., Suzuki K., Ishimi Y., Wu J., Uehara M., 2010. Dietary hesperidin exerts hypoglycemic and hypolipidemic effects in streptozotocin-induced marginal type 1 diabetic rats. *J Clin Biochem Nutr*, 46:87–92
- Al Ahl, E.A. Om. 2011. Medicinal and aromatic plants production under salt stress. A review. *H. A. H. Said- Herba Polonica*, 57(1)
- Al Nakib T., Bezjak V., Meegan M.J. and Chandy R., 1995. Synthesis and antifungal activity of some 3-benzylidenechroman-4-ones, 3-benzylidenethiochroman-4-ones and 2-benzylidene-1-tetralones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 25: 455-462
- Alali F., El-Elimat T., Albataineh H., Al-Balas Q., Al-Gharaibeh M., Falkinham II J. O., Chen W.L., Swanson S.M. and Oberlies N.H., 2015. Cytotoxic Homoisoflavones from the Bulbs of *Bellevalia eigi*J. *Nat. Prod.*, 78(7):1708–1715
- Alam M.A., Kauter K., Brown L., 2013. Naringin improves diet-induced cardiovascular dysfunction and obesity in high carbohydrate, high fat dietfed rats. *Nutrients*, 5:637–50
- Al-Anbari A.K.H., and Hasan M.A., 2015. Antioxidant Activity in Some Citrus Leaves and Seeds Ethanolic Extracts. *International Conference on Advances in Agricultural, Biological & Environmental Sciences (AABES-2015) July 22-23, 2015 London (UK)*
- Al-Bachir M., and Bakir M.A., 2017. Predictive value of body mass index to metabolic syndrome risk factors in Syrian adolescents. *J Med Case Rep.*, 11:170

- Alberti K.G., Zimmet P.Z., 1998. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.*, 15(7):539-53
- Alberti K.G.M.M., Alberti K.G.M.M., Zimmet P., Shaw J., 2005. The metabolic syndrome—a new worldwide definition. *The Lancet*, 366(9491):1059–1062
- Alberti K.G.M.M., Zimmet P., and Shaw J., 2006. Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabetic Medicine*, 23: 469–480
- Ali H., Houghton P.J., Soumyanath A., 2006. α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(3):449-455
- Ali Syed S., Yu Y., Pfosser M., and Wetschnig W., 2012. Inferences of biogeographical histories within subfamily Hyacinthoideae using S-DIVA and Bayesian binary MCMC analysis implemented in RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies). *Ann. Bot.*, 109:95–107
- Al-Suwailem K., Al-Tamimi A.S., Al-Omar M.A., and Al-Suhbani M.S., 2006. Safety and Mechanism of Action of Orlistat (Tetrahydrolipstatin) as the First Local Antiobesity Drug. *Journal of Applied Sciences Research*, C(): CC-CC, 2006
- Alvarez-Gonzales I., Madrigal-Bujaidar E., Sanchez- Garcia V.Y., 2010. Inhibitory effect of grapefruit juice on the genotoxic damage induced by ifosfamide in mouse *Plant Foods Hum. Nutr.*, 65:369-373
- Ameer B., Weintraub R.A., Johnson J.V., Yost R.A., Rouseff R.L., 1996. Flavanone absorption after naringin, hesperidin, and Citrus administration. *Clin Pharmacol Ther.*, 60:34–40
- Amiot M.J., Riva C. and Vinet A., 2016. Effects of dietary polyphenols on metabolic syndrome features in humans: a systematic review. *Obesity reviews*, 17:573–586
- Anagnostopoulou M.A., Kefalas P., Papageorgiou V.P., Assimopoulou A.N., Boskou D., 2006. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange flavedo (*Citrus sinensis*). *Food Chem.*, 94:19-25
- Armesto J., Gómez-Limia L., Carballo J., Martínez S., 2017. Impact of vacuum cooking and boiling, and refrigerated storage on the quality of galega kale (*Brassica oleracea* var. *acephala* cv. *Galega*). *LWT - Food Science and Technology*, 79:267-277
- Aruna A., Vijayalakshmi K., Karthikeyan V., 2014. Pancreatic lipase inhibitory screening of *Citrullus lanatus* leaves. *The Pharma Innovation Journal*, 3(7):44-52
- Aruna A., Vijayalakshmi K., Karthikeyan V., Nandhini S.R., Jegadeesh S., 2014. Water Melon Plant (*Citrullus lanatus*): Pharmacognostical Standardization and Phytochemical Screening of its Leaves. *Pharmanest*, 5(4):2184-91
- Asagami T., Abbasi F., Stuelinger M., Lamendola C., McLaughlin T., Cooke J.P., Reaven G.M., and Tsao P.S., 2002. Metformin treatment lowers asymmetric dimethylarginine concentrations in patients with type 2 diabetes. *Metabolism*, 51:843–846
- Asano N., Kuroi H., Ikeda K., Kizu H., Kameda Y., Kato A., Adachi I., Watson A.A., Nash R.J., Fleet G.W.J., 2000. New polyhydroxylated pyrrolizidine alkaloids from *Muscari armeniacum*, structural determination and biological activity. *Tetrahedron: Asymmetry*, 11:1-8
- Assis C.R.C.L., Hermsdorff H.H.M., Bressan J., 2013. Anti-inflammatory properties of orange juice: possible favorable molecular and metabolic effects. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 68:1-10

- Atamer A., Eceder S.A., Atamer Y., Kocyigit Y., Bozkurt Yigit N., and Eceder T., 2012. The Effects of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA), Nitric Oxide (NO) and Homocysteine (Hcy) on Progression of Mild Chronic Kidney Disease (CKD): Relationship Between Clinical and Biochemical Parameters. *Chronic Kidney Disease*, chapter 12, Edited by Prof. Monika Gööz ISBN 978-953-51-0171-0
- Babaiwa U.F., Erharuyi O., Falodun A., Akerele J.O., 2017. Antimicrobial activity of ethyl acetate extract of *Citrullus lanatus* seeds. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 1(7)
- Bahramsoltani R., Ebrahimi F., Farzaei M.H., Baratpournoghaddam A., Ahmadi P., Rostamiasrabadi P., Rasouli Amirabadi A.H., Rahimi R., 2017. Dietary polyphenols for atherosclerosis: A comprehensive review and future perspectives. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 16:1-19
- Balkau B., Charles M.A., 1999. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR) *Diabet Med.*; 16(5):442-3
- Bangani V. Crouch N.R. Mulholland D.A., 1999. Homoisoflavanones and stilbenoids from *Scilla nervosa*. *Phytochemistry*, 51(7):947-951
- Baojian W., Kulkarni K., Basu S., Zhang S., and Hu M., 2011. First-pass metabolism via UDP-glucuronosyltransferase: a barrier to oral bioavailability of phenolics. *J Pharm Sci.*, 100(9): 3655–3681
- Barkley N.A., Roose M.L., Krueger R.R., Federici C.T., 2006. Assessing genetic diversity and population structure in a Citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs) *Theor. Appl. Genet.*, 112:1519–1531
- Barone G., Belardini M., Lanzetta R., Laonigro G., and Parrilli M., 1983. *Rend. Accad. Sci. Fis. Mat., Naples*, 50: 297–298
- Barrett H.C., Rhodes A.M., 1976. A numerical taxonomic study of affinity relationship in cultivated Citrus and its closed relatives. *Syst. Bot.*, 1:105–136
- Barros L., Baptista P., Correia D.M., Sá Morais J. and Ferreira I.C.F.R. Effects of Conservation Treatment and Cooking on the Chemical Composition and Antioxidant Activity of Portuguese Wild Edible Mushrooms. *J. Agric. Food Chem.*, 55(12):4781–4788
- Barthel A., Schmoll D., 2003. Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 285(4):E685-E692
- Basli A., Younci S., Benkerrou Z., Khetta B., and Madani K., 2016. Evaluation of In-vitro Antidiabetic and Hypolipidaemic Activities of Extracts Citrus Lemon Fruit. *Journal of Environmental Science and Engineering*, 5:612-618
- Batubara I., Mitsunaga T., Ohashi H., 2009. Screening antiacne potency of Indonesian medicinal plants: antibacterial, lipase inhibition, and antioxidant activities. *J Wood Sci.*, 55(3):230-235
- Bausher M.G., Singh N.D., Seung-Bum L., Jansen R.K., and Daniell H., 2006. The complete chloroplast genome sequence of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var 'Ridge Pineapple': organization and phylogenetic relationships to other angiosperms. *BMC Plant Biol.* 6: 21
- Bayer R.J., Mabberley D.J., Morton C., Miller C.H., Sharma I.K., Pfeil B.E., Rich S., Hitchcock R., and Sykes S., 2009. A molecular phylogeny of the orange subfamily (Rutaceae: Aurantioideae) using nine cpDNA sequences. *Am. J. Bot.*, 96(3):668-685
- Beaulieu J.M., Leitch I.J., Knight C.A., 2007. Genome size evolution in relation to leaf strategy and metabolic rates revisited. *Ann Bot.*, 99(3):495-505
- Beaulieu J.M., Leitch I.J., Patel S., Pendharkar A., Knight .CA., 2008. Genome size is a strong predictor of cell size and stomatal density in angiosperms. *New Phytol.*, 179(4):975-86

- Beecher G.R., 2003. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr.*, 133(Suppl):3248S–54S
- Chun O.K., Chung S.J, Song W.O., 2007. Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults. *J Nutr.*, 137:1244–52
- Benavente-García O., and Castillo J., 2008. Update on Uses and Properties of Citrus Flavonoids: New Findings in Anticancer, Cardiovascular, and Anti-inflammatory Activity. *J. Agric. Food Chem.*, 56(15):6185–6205
- Bendicho S., Trigueros M.C, Hernández T., Martín O., 2001. Validation and comparison of analytical methods based on the release of p-nitrophenol to determine lipase activity in milk. *J Dairy Sci.*, 84(7):1590-6
- Benjamin E. J., Larson M. G., Keyes M. J., Mitchell G. F., Vasani R. S., Keaney J. F., Lehman B.T., Fan S., Osypiuk E., Vita J.A., 2004. Clinical correlates and heritability of flow-mediated dilation in the community: the Framingham Heart Study. *Circulation*, 109:613–619
- Bennett M.D., Leitch I.J., 2005. Genome size evolution in plants. In: Gregory TR, editor. *The evolution of the genome*. San Diego, CA: Elsevier, pp. 89–162
- Bernardo L., Bartolucci F., Cancellieri L., Costalonga S., Galasso G., Galesi R., Gargano D., Iberite M., Iocchi M., Lattanzi E., Magrini S., Peccenini S., Sciandrello S., Scoppola A., Signorino G., Tilia A. e Spampinato G., 2012. Contributo alla conoscenza floristica della Calabria: resoconto dell'esecuzione del Gruppo di Floristica (S.B.I.) nel 2008 nella Presila Catanzarese. *Informatore Botanico Italiano*, 44(1):125-151
- Bhardwaj A., Kumar R., Dabas V., Alam N., 2012. Evaluation of anti-ulcer Activity of *Citrullus lanatus* seed extract in Wistar albino rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(5):135-139
- Bianco V.V., Mariani R., Santamaria P., 2009. *Piante spontanee nella cucina tradizionale molese. Storie, curiosità e ricette*. Levante Eds. Bari (Italia)
- Bieze K., Lois R., 2001. An *Arabidopsis* mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics. *Plant Physiol*, 126:1105–1115
- Bilecová-Rabajdová M., Birková A., Urban P., Gregová K., Durovcová E., Mareková M., 2013. Naturally occurring substances and their role in chemo-protective effects. *Cent Eur J Public Health.*, 21(4):213-9
- Birari R.B., Bhutani K.K, 2007. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential *Drug Discov Today.*, 12(19-20):879-89
- Birt D.F., Hendrich S., Wang W., 2001. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*, 90:157-177
- Blachier F., M'Rabet-Touil H., Posho L., Darcy-Vrillon B., and Duee P.H., 1993. Intestinal arginine metabolism during development. Evidence for de novo synthesis of L-arginine in newborn pig enterocytes. *Eur. J. Biochem.*, 216(1):109-17
- Bode-Boger S.M., Boger R.H., Galland A., Tsikas D., and Frolich J.C., 1998. L-Arginine-induced vasodilation in healthy humans: pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 46:489–497
- Böhm V., 2012. Lycopene and heart health. *Mol Nutr Food Res.*, 56(2):296-303
- Böhnert T., and Lobin W., 2017. *Leopoldia neumannii* sp. nov. (Asparagaceae, Scilloideae): a new species of *Muscari* sensu lato from Greece. *Willdenowia*, 47(2):179-185

- Bombelli M., Ronchi I., Volpe M., Facchetti R., Carugo S., Dell’Oro R., Cuspidi C., Grassi G., Mancia G., 2014. Prognostic value of serum uric acid: new-onset in and out-of-office hypertension and long-term mortality. *Journal of Hypertension*, 32(6):1237–1244
- Bonora E., Kiechl S., Willeit J., Oberhollenzer F., Egger G., Targher G., Alberiche M., Bonadonna R.C., and Muggeo M., 1998. Prevalence of insulin resistance in metabolic disorders: the Bruneck Study. *Diabetes*, 47:1643–1649
- Borgonovo G., Caimia S., Morini G., Scaglioni L., Bassoli A., 2008. Taste-active compounds in a traditional Italian food: “lampascioni”. *Chem Biodiv*, 5:1184-94
- Boscaiu M., Sánchez M., Bautista I., Donat P., Lidón A., Llinares J., Llul C., Mayoral O., Vicente O., 2010. Phenolic compounds as stress markers in plants from Gypsum. *Habitats Bulletin UASVM Horticulture*, 67(1) Print ISSN 1843-5254 Electronic ISSN 1843-5394
- Boulos L., 2005. *Flora of Egypt* 4: 1-617. Al Hadara Publishing, Cairo
- Bourgou S., Kchouk M.E., Bellila A., Marzouk B., 2010. Effect of salinity on phenolic composition and biological activity of *Nigella sativa*. *Acta Hort.*, 853:57-60
- Bredt D.S., Snyder S.H., 1994. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem.*, 63:175-95
- Brett G.M., Hollands W., Needs P.W., Teucher B., Dainty J.R., Davis B.D., Brodbelt J.S. and Kroon P.A., 2016. Absorption, metabolism and excretion of flavanones from single portions of orange fruit and juice and effects of anthropometric variables and contraceptive pill use on flavanone excretion *Br J Nutr.*, 101(5): 664–675
- Bruton B.D., Fish W.W., Roberts W., Popham T.W., 2009. The influence of rootstock selection on fruit quality attributes of watermelon. *Open Food Sci J.*, 3:15–34
- Bugel S.M., Bonventre J.A., Tanguay R.L., 2016. Comparative Developmental Toxicity of Flavonoids Using an Integrative Zebrafish System. *Toxicol Sci.*, (1):55-68
- Bugel S.M., Bonventre J.A., Tanguay R.L., 2016. Comparative Developmental Toxicity of Flavonoids Using an Integrative Zebrafish System. *Toxicol Sci.*, 154(1):55-68
- Bures P., Wang Y.F., Horov L., Suda J., 2004. Genome size variation in central European species of *Cirsium* (Compositae) and their natural hybrids. *Ann Bot.*, 94:353–363
- Burleigh J.G., Barbazuk W.B., Davis J.M., Morse A.M., Soltis P.S., 2012. Exploring diversification and genome size evolution in extant gymnosperms through phylogenetic synthesis. *J. Bot.* 1- 6
- Burnett G.T., 1835. *Outlines of Botany*, Londra, J. Churchill Cacho J., Sevillano J., De Castro J., Herrera E., Ramos M.P., 2008. Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 295(5):E1269-E1276
- Caldwell M.M., Bornman J.F., Ballarè C.L., Flint S.D., Kulandaivelu G., 2007. Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation, and interactions with other climate change factors. *Photochem Photobiol Sci*, 6:252–266
- Camp H.S., Ren D., and Leff T., 2002. Adipogenesis and fat-cell function in obesity and diabetes. *TRENDS in Molecular Medicine.*, 8(9)
- Candido V., 2014. Relazione misura PSR 2.1.4 30.11.2014
- Candido V., Castronuovo D., Fascetti S., Rosati L. and Potenza G., 2017. Seed-propagated *M. comosum* (L.) Mill.: Effects of sowing date and growing conditions *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology Official Journal of the Societa Botanica Italiana.*, 151(3): 484-492

- Candido V., Castronuovo D., Matteo D., Fascetti S., Potenza G., Miccolis V., 2015. European Botanic Gardens in a Changing World: Insights into EUROGARD VI 193 Seed propagated tassel hyacinth: Effects of sites and sowing dates
- Caneva G., Pontrandolfi M.A., Fascetti S., 1997. Le piante alimentari spontanee della Basilicata. Basilicata Regione Notizie, suppl. n° 5, Consiglio Regione Basilicata Eds., Potenza (Italy), p. 305
- Cao G., Sofic E. and Prior R.L., 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships," *Free Radical Biology and Medicine*, 22(5):749–760
- Carbonell-Caballero J., Alonso R., Ibanez V., Terol J., Talon M., and Dopazo J., 2015. A Phylogenetic Analysis of 34 Chloroplast Genomes Elucidates the Relationships between Wild and Domestic Species within the Genus *Citrus*, *Mol. Biol. Evol.*, 32(8): 2015–2035
- Carolyn C., and Malcolm R., 2002. Case report of abuse of orlistat. *Eat. Behav.*, 3:167-179
- Castelli M.V., López S.N., 2017. Chapter 9 - Homoisoflavonoids: Occurrence, Biosynthesis, and Biological Activity. *Studies in Natural Products Chemistry*, 54:1-414. Edited by Atta-ur-Rahman. ISBN: 978-0-444-63929-5
- Cazarolli L.H., Zanatta L., Alberton E.H., Figueiredo M.S, Folador P., Damazio R.G., Pizzolatti M.G., Silva F.R., 2008. Flavonoids: Prospective Drug Candidates. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* ,8 (13): 1429-40
- Cha J.Y., Cho Y.S., Kim I., Anno T., Rahman S.M., Yanagita T., 2001. Effect of hesperedin, a Citrus flavonoid, on the liver triacylglycerol content and phosphatidatephosphohydrolase activity in oroticacidfed rats. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 56:349-358
- Charoensiri R., Kongkachuichai R., Suknicom S. and Sungpuag P., 2009. Beta-Carotene, Lycopene and alpha-tocopherol contents of selected thai fruits. *Food Chemistry*, 113:202-207
- Chase M.W., Reveal J.L., Fay M.F., 2009. A subfamilial classification for the expanded Asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Bot J Linn Soc.*, 161:132–136
- Chasse G.A., Mak M.L., Deretey E., Farkas I., Torday L.L., J. G. Papp, D. S. R. Sarma, A. Agarwal, A. Sujak, S. Agarwal, A. V. Rao. 2001. An ab initio computational study on selected lycopene isomers. *J Mol Struc.*, 571:27–37
- Chedda U., Kaikini A., Bagle S., Seervi M., Sathaye S., 2016. In vitro pancreatic lipase inhibition potential of commonly used Indian spices. *IOSR Journal Of Pharmacy*, 6(10):10-13. (e)-ISSN: 2250-3013, (p)-ISSN: 2319-4219
- Chen X.M., Tait A.R., Kitts D.D., 2017. Flavonoid composition of orange peel and its association with antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Chemistry*, 218(1):15-21
- Cho K.W., Kim Y.O., Andrade J.E., Burgess J.R., Kim Y.C., 2011. Dietary naringenin increases hepatic peroxisome proliferators-activated receptor alpha protein expression and decreases plasma triglyceride and adiposity in rats. *Eur J Nutr.*, 50:81–8
- Choi B.M., Lee J.A., Gao S.S., Eun S.Y., Kim Y.S., Ryu S.Y., Choi Y.H., Park R., Kwon D.Y., Kim B.R., 2007. Brazilin and the extract from *Caesalpinia sappan* L. protect oxidative injury through the expression of heme oxygenase-1. *Biofactors*, 30(3):149-157
- Choi J.S., Yokozawa T., Oura H., 1991. Improvement of hyperglycemia, hyperlipemia in streptozotocin-diabetic rats by a methanolic extract of *Prunus davidiana* stems, its main component. *Prunin Planta Med.*, 57:208–11
- Chopra R.N., 1958. *Indigenous drugs of India*: Academic Publishers

- Choudhary B.R., Haldhar S.M., Maheshwari S. K., Bhargava R., and Sharma S.K., 2015. Phytochemicals and antioxidants in watermelon (*Citrullus lanatus*) genotypes under hot arid region. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 85(3):414–7
- Chun O.K., Chung S.J., Song W.O., 2007. Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults. *J Nutr.*, 137:1244–52
- Chutia M., Deka B.P, Pathak M.G., Sarma T.C., and Boruah P., 2009. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *Food Science and Technology*, 42:777–780
- Cines D.B., Pollak E.S., Buck C.A., Loscalzo J., Zimmerman G.A., McEver R.P., Pober J.S., Wick T.M., Konkle B.A., Schwartz B.S., Barnathan E.S., McCrae K.R., Hug B.A., Schmidt A.M., Stern D.M., 1998. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*, 91:3527-3561
- Conforti F., Sosa S., Marrelli M., Menichini F., Statti G.A., Uzunov D., Tubaro A., Menichini F., Loggia R.D., 2008. The protective ability of Mediterranean dietary plants against the oxidative damage: the role of radical oxygenspecies in inflammation and the polyphenol, flavonoid and sterol contents. *J Ethnopharmacol.*, 116:144-51
- Conforti F., Perri V., Menichini F., Marrelli M., Uzunov D., Statti G.A., Menichini F., 2012. Wild Mediterranean dietary plants as inhibitors of pancreatic lipase. *Phytother Res.*, 26(4):600-4
- Conti F., Abbate, G., Alessandrini A., Blasi C. (eds.), 2005. An annotated Checklist of the Italian vascular flora. Palombi Editori, Roma
- Cook N.C., Samman S., 1996. Flavonoids Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutritional Biochemistry*, 7:66–76
- Cooper-Driver G.A., Bhattacharya M., 1998. Role of phenolics in plant evolution. *Phytochemistry*, 49:1165–1174
- Couillard C., Mauriège P., Imbeault P., Prud'homme D., Nadeau A., Tremblay A., Bouchard C., Després J.P., 2000. Hyperleptinemia is more closely associated with adipose cell hypertrophy than with adipose tissue hyperplasia. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 24:782–788
- Cowan M.M., 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev.*, 12(4): 564–582
- Curthoys N.P., Watford M., 1995. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annu Rev Nutr.*, 15:133-59
- Cutrufello P.T., Stephen J., Gadowski S.J., and Zavorsky G.S., 2015. The effect of L-citrulline and watermelon juice supplementation on anaerobic and aerobic exercise performance. *Journal of Sports Sciences*, 33(14):1459-66
- Czczot H., 2000. Biological activities of flavonoids A review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 950(4):3–13
- Czerepanov S.K., 1995. *Vascular Plants of Russia and Adjacent States (The Former USSR)*: 1-516. Cambridge University Press
- Dai Y., Harinantenaina L., Brodie P.J., Goetz M., Shen Y.Y., Dyke K.T., and Kingston D.G.I., 2013. Antiproliferative Homoisoflavonoids and Bufatrienolides from *Urginea depressa*. *J Nat Prod.*, 76(5): 865–87
- Dane F., Liu J., 2007. Diversity and origin of cultivated and citron type watermelon (*Citrullus lanatus*). *Genet Resour Crop Ev.*, 54:1255-1265

- Danin A., 2004. Distribution Atlas of Plants in the Flora Palaestina area: 1-517. The Israel Academy of Sciences and Humanities, Jerusalem
- Danış O., Ogan A., Anbar D., Yuce-Dursun B., Demir S., and Salan U., 2015. Inhibition of Pancreatic Lipase by Culinary Plant Extracts. *Int J Plant Biol Res.*, 3(2): 1038
- Das B., Thirupathi P., Ravikanth B., Aravind Kumar R., Subramanya Sarma A.V., And Basha S.J., 2009. Isolation, Synthesis, and Bioactivity of Homoisoflavonoids from *Caesalpinia pulcherrima*. *Chem. Pharm. Bull.*, 57(10):1139—1141
- Dash P., and Ghosh G., 2017. Fractionation, amino acid profiles, antimicrobial and free radical scavenging activities of *Citrullus lanatus* seed protein. *Natural Product Research Formerly Natural Product Letters*, 31(24): 2945-2947
- Davis A.R., Fish A.W., Perkins-Veazie P., 2003. A rapid spectrophotometric method for analyzing lycopene content in tomato and tomato products. *Postharvest Biology and Technology*, 28(3):425-430
- Davis B.D., Needs P.W., Kroon P.A., Brodbelt J.S., 2006. Identification of isomeric flavonoid glucuronides in urine and plasma by metal complexation and LC-ESI-MS/MS. *J Mass Spectrom.*, (7):911-20
- Davis P.H., Mill R., Tan K., 1988. *Muscari Mill. Flora of Turkey and the east Aegean Islands*, 10. Edinburgh, UK: Edinburgh University Press, pp. 225-226
- Davis PH, Stuart DC (1984). *Muscari Mill.* In: Davis PH, editor. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Vol. 8. Edinburgh, UK: Edinburgh University Press, pp. 245-263
- Davis P.H., and Stuart D.C., 1980. *Muscari Mill.* — Pp. 46–49 in: Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Moore D. M., Valentine D. H., Walters S. M. & Webb D. A. (ed.), *Flora europaea 5.* — Cambridge: Cambridge University Press
- Davis B.D., Needs P.W., Kroon P.A., Brodbelt J.S., 2006. Identification of isomeric flavonoid glucuronides in urine and plasma by metal complexation and LC-ESI-MS/MS. *J. M. Spectrom.*, 41(7):911-20.
- De Cristofaro P., 2002. *Basi metodologiche dell'approccio psiconutrizionale.* See Editrice, 2002
- De Divitiis O., Fazio S., Petitto M., Maddalena G., Contaldo F., Mancini M., 1981. Obesity and cardiac function. *Circulatio*, 64(3):477-482.
- De Jonge W.J., Dingemans M.A., De Boer P.A., Lamers W.H., Moorman A.F., 1998. Arginine-metabolizing enzymes in the developing rat small intestine. *Pediatr Res.*, 43:442–451
- Della Loggia R., Del Negro P., Tubaro A., Barone G. and Parrilli M., 1989. *Planta Medica*, 55: 587-588
- Deng Y., Scherer P.E., 2010. Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome. *Ann N.Y. Acad Sci.*, 120():E1-E19
- Desideri N., Bolasco A., Fioravanti R., Monaco L.P., Orallo F., Yáñez M., Ortuso F., Alcaro S., 2011. Homoisoflavonoids: natural scaffolds with potent and selective monoamine oxidase-B inhibition properties. *J Med Chem*, 54(7):2155-64
- Desideri N., Olivieri S., Stein M.L., Sgro R., Orsi N. and Conri C., 1997. Synthesis and anti-picornavirus activity of homo-isoflavonoids. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 8(6): 545-555
- Després J.P., and Lemieux I., 2006. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*, 444, 881–887

- Devasagayam T.P.A., Tilak J.C., Boloor K.K., Sane K.S., Ghaskadbi S.S., Lele R.D., 2004. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. JAPI 52
- Dewick P.M., 1975. Pterocarpin Biosynthesis: 2'-Hydroxy-isoflavone and -isoflavanone Precursors of Demethylhomopterocarpin in Red Clover. J.C.S. Chem. Comm., 656-658
- Dhanakoti S.N., Brosnan J.T., Brosnan M.E., Herzberg G.R., 1992. Net renal arginine flux in rats is not affected by dietary arginine or dietary protein intake. J Nutr., 122(5):1127-34
- Dhanakoti S.N., Brosnan J.T., Herzberg G.R., Brosnan M.E., 1990. Renal arginine synthesis: studies in vitro and in vivo. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism Published, 259(3):E437
- Dhanakoti S.N., Brosnan M.E., Herzberg G.R., Brosnan J.T., 1992. Cellular and subcellular localization of enzymes of arginine metabolism in rat kidney. Biochem J., 282:369-375
- Dieng S.I.M., Diallo A.J., Fall A.D., Diatta-Badji K., Diatta W., Sarr A., and Bassene E., 2017. Total polyphenols and flavonoids contents of aqueous extracts of watermelon red flesh and peels (*Citrullus lanatus*, Thunb). Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 6(5): 801-803
- Díez C.M., Gaut B.S., Meca E., Scheinvar E., Montes-Hernandez S., Eguiarte L.E., Tenaillon M.I., 2013. Genome size variation in wild and cultivated maize along altitudinal gradients. New Phytol. 199(1):264-76
- Dimopoulos P., Raus Th., Bergmeier E., Constantinidis Th., Iatrou G., Kokkini S., Strid A., Tzanoudakis D., 2013. Vascular Plants of Greece: An annotated checklist: Englera, No. 31
- Dimopoulos P., Raus Th., Bergmeier E., Constantinidis Th., Iatrou G., Kokkini S., Strid A. and Tzanoudakis D., 2013. Vascular plants of Greece. An annotated checklist. — Athens: Hellenic Botanical Society Berlin: Botanic Garden and Botanical Museum, Berlin-Dahlem
- Ding X., Fan S., Lu Y., Zhang Y., Gu M., Zhang L., Liu G., Guo L., Jiang D., Lu X., Li Y., Zhou Z. and Huang C. 2012. Citrus ichangensis Peel Extract Exhibits Anti- Metabolic Disorder Effects by the Inhibition of PPAR γ and LXR Signaling in High-Fat Diet-Induced C57BL/6 Mouse. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Article ID: 678592
- Diwadkar-Navsariwala V., Novotny J.A., Gustin D.M., Sosman J.A., Rodvold K.A., Crowell J.A., Stacewicz-Sapuntzakis M., Bowen P.E., 2003. A physiological pharmacokinetic model describing the disposition of lycopene in healthy men. J Lipid Res., 44(10):1927-39
- Dixon R.A., Dey P.M., Lamb C.J., 1983. Phytoalexins: enzymology and molecular biology. Adv Enzymol., 55:1-69
- Doğu S., Bağcı Y., 2009. *Muscari vuralii* sp. nov. (Liliaceae/Hyacinthaceae) from South Anatolia, Turkey. Nord. J. Bot., 27:243-246
- Doğu S., Dinç M., 2013. Anatomical Characteristics of *Muscari vuralii* Y. Bağcı & Doğu (Hyacinthaceae). Modern Phytomorphology, 3:29-33
- Doussi M.A., Thanos C.A., 2002. Ecophysiology of seed germination in Mediterranean geophytes. 1. *Muscari* spp. Seed Science Res., 12:193-201
- Drew B.S., Dixon A.F., and Dixon J.B., 2007. Obesity management: Update on orlistat Vasc Health Risk Manag., 3(6): 817-821
- Drexler H., Hornig B., 1999. Endothelial dysfunction in human disease. J. Mol. Cell Cardiol., 31:51-60
- Drummond G.R., Selemidis S., Griendling K.K., Sobey C.G., 2011. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. Nat Rev Drug Discov., 10(6):453-71

- During A., Dawson H.D., Harrison E.H., 2005. Carotenoid transport is decreased and expression of the lipid transporters SR-BI, NPC1L1, and ABCA1 is downregulated in caco-2 cells treated with ezetimibe. *J Nutr.*, 135(10):2305–12
- During A., Harrison E.H., 2004. Intestinal absorption and metabolism of carotenoids: insights from cell culture. *Arch Biochem Biophys.*, 430(1):77-88
- Einhorn D., Reaven G.M., Cobin R.H., Ford E., Ganda O.P., Handelsman Y., Hellman R., Jellinger P.S., Kendall D., Krauss R.M., Neufeld N.D., Petak S.M., Rodbard H.W., Seibel J.A., Smith D.A., Wilson P.W., 2003. American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome. *Endocr Pract.*, 9(3):237-52
- Eker I., Koyuncu M., 2008. *Muscari babachii* sp. nov. (Hyacinthaceae) from south Anatolia. *Nordic J. Bot.*, 26:49–52
- Erhirhie E.O., and Ekene N.E., 2014. Medicinal Values on *Citrullus lanatus* (Watermelon): Pharmacological Review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences.* 4(4) - ISSN: 2229-3701
- Ersus [S. and Cam M., 2007.](#) Determination of organic acids, total phenolic content, and antioxidant capacity of sour *Citrus aurantium* fruits *Chemistry of Natural Compounds*, 43(5):607–609
- Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. *JAMA.* 2001, 285(19):2486-97
- Fayek N.M., El-Shazly A.H., Abdel-Monem A.R., Moussa M.Y., Abd-Elwahab S.M., El-Tanbouly N.D., 2017. Comparative study of the hypocholesterolemic, antidiabetic effects of four agro-waste Citrus peels cultivars and their HPLC standardization. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27(4):488-494
- Fejzić A., Čavar S., 2014. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Some Citruses *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina*, 42:1-4
- Fernández-Sánchez A., Madrigal-Santillán E., Bautista M., Esquivel-Soto J., Morales-González A., Esquivel-Chirino C., Durante-Montiel I., Sánchez-Rivera G., Valadez-Vega C., Morales-González J.A., 2011. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci.*, 12(5):3117-32
- Ferrannini E., Buzzigoli G., Bonadonna R., Giorico M.A., Oleggini M., Graziadei L., Pedrinelli R., Brandi L., and Bevilacqua S., 1987. Insulin resistance in essential hypertension. *N. Engl. J. Med.*, 317:350–357
- Ferraz R.R., Tiselius H.G., Heiberg I.P., 2004. Fat malabsorption induced by gastrointestinal lipase inhibitor leads to an increase urinary oxalate excretion. *Kidney Int.*, 66:676-682
- Ferruzzi M.G., Nguyen M.L., Sander L.C., Rock C.L., Schwartz S.J.J., 2001. Analysis of lycopene geometrical isomers in biological microsamples by liquid chromatography with coulometric array detection. *Chromatogr B Biomed Sci Appl.*, 760(2):289-99
- Figuroa A., Sanchez-Gonzalez M.A., Wong A., Arjmandi B.H., 2012. Watermelon extract supplementation reduces ankle blood pressure and carotid augmentation index in obese adults with prehypertension or hypertension. *Am J Hypertens.*, 25(6):640-3
- Figuroa A., Wong A., Jaime S.J., Gonzales J.U., 2017. Influence of L-citrulline and watermelon supplementation on vascular function and exercise performance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 20(1):92-98

- Figuroa A., Wong A., Kalfon R., 2014. Effects of watermelon supplementation on aortic hemodynamic responses to the cold pressor test in obese hypertensive adults. *American Journal of Hypertension*, 27(7):899- 906
- Floegel A., Kim D., Chung S., Koo S.I., Chun O.K., 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J Food Compos Anal.*, 24:1043–1048
- Ford E.S., 2004. The metabolic syndrome and mortality from cardiovascular disease and all-causes: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey II Mortality Study. *Atherosclerosis*, 173(2):309-14
- Foster-Powell K., Holt S.H., Brand-Miller J.C., 2002. International table of glycemic index and glycemic load values. *Am J Clin Nutr.*, 76:5-56
- Francis S.H., Busch J.L., Corbin J.D., Sibley D., 2010. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol. Rev.*, 62:525–563
- Friesenecker B., Tsai A.G., Intaglietta M., 1995. Cellular basis of inflammation, edema and the activity of Daflon 500 mg., *Int J Microcirc Clin Exp.* 15(suppl):17–21
- Frishman W.H., Beravol P., Carosella C., 2009. Dis Mon. 2009 Alternative and complementary medicine for preventing and treating cardiovascular disease. *Dis. Mon.*, 55(3):121-92
- Frydman A., Weissshaus O., Bar-Peled M., Huhman D.V., Sumner L.W., Marin F.R., Lewinsohn E., Fluhr R., Gressel J., Eyal Y., 2004. Citrus fruit bitter flavors: isolation and functional characterization of the gene Cm1,2RhaT encoding a 1,2 rhamnosyltransferase, a key enzyme in the biosynthesis of the bitter flavonoids of Citrus. *The plant Journal*, 40(1):88-100
- Fuhr U., Kummert A.L., 1995. The fate of naringin in humans: A key to grapefruit juice-drug interactions? *Clin Pharmacol Ther.*, 158:365–373
- Fukuchi Y., Hiramitsu M., Okada M., Hayashi S., Nabeno Y., Osawa T., Naito M., 2008. Lemon polyphenols suppress diet-induced obesity by upregulation of mRNA levels of the enzymes involved in beta-oxidation in mouse white adipose tissue. *J Clin Biochem Nutr.*, 43:201–9
- Furchgott R.F., and Zawadzki J.V., 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373–376
- Furr H.C., Clark R.M., 1997. Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids. *J Nutr Biochem.*, 8(7):364–77
- Fursa, T.B., 1981. Intraspecific classification of watermelon under cultivation. *Kulturpflanze* 29:297–300
- Furukawa S., Fujita T., Shimabukuro M., Iwaki M., Yamada Y., Nakajima Y., Nakayama O., Makishima M., Matsuda M., Shimomura I., 2004. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.*, 114(12):1752-61
- Furukawa S., Fujita T., Shimabukuro M., Iwaki M., Yamada Y., Nakajima Y., Nakayama O., Makishima M., Matsuda M., and Shimomura I., 2017. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.*, 114(12):1752-1761 (rev. II)
- Fusurato K., 1957. Studies on polyembryony in Citrus. *Rep. Kihara Inst. Biol. Res.*, 8:40–48
- Gaffar M.A., 2002. Preparation and utilization of new carboxyl group containing cation exchangers based on starch using a dry reaction method. *Starch*, 54:185–192
- Gan C., Zhao Z., Nan D.D., Yin B., Hu J., 2014. Homoisoflavonoids as potential imaging agents for β -amyloid plaques in Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 76:125-131

- Gao S., Hu M., 2010. Bioavailability challenges associated with development of anti-cancer phenolics. *Mini Rev Med Chem.*, 10(6):550–67
- Garbari F., 1966. Contributo allo studio citologico dei Muscari italiani. *Caryologia*, 19:419–428
- Garbari F., and Greuter W., 1970. On the taxonomy and typification of Muscari Miller (Liliaceae) and allied genera, and on typification of generic names. *Taxon*, 19(3):329–335
- García-Lor A., Luro F., Navarro L., Ollitrault P., 2012. Comparative use of InDel and SSR markers in deciphering the interspecific structure of cultivated Citrus genetic diversity: a perspective for genetic association studies. *Mol Genet.*, 287(1):77-94
- Ghasemi K., Ghasemia Y. and Ebrahimzadeh M.A., 2009. Antioxidant Activity, Phenol And Flavonoid Contents Of 13 Citrus Species Peels And Tissues. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 22(3):277-281
- Gironés-Vilaplana A., Moreno D.A., and García-Viguera C., 2014. Phytochemistry and biological activity of Spanish Citrus fruits. *Food Funct.*, 5:764-772
- Goerisch H., 1978. On the mechanism of the chorismate mutase reaction, in *Biochemistry*, 17(18):3700
- González-Chávez A., Simental-Mendía L.E., and Elizondo-Argueta S., 2011. Elevated triglycerides/HDL-cholesterol ratio associated with insulin resistance. *Cir Cir.*, 79(2):115-119
- Gorinstein S., Cvikrova M., Machackova I., Haruenkit R., Park Y.S., Jung S.T., Yamamoto K., Ayala A.L.M., Katrich E., Trakhtenberg S., 2004. Characterization of antioxidant compounds in Jaffa sweeties and white grapefruits. *Food Chem.*, 84:503-510
- Govaerts R., 2016. World checklist of Asparagaceae. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew
- Graham J H., 1986. Citrus mycorrhizae: potential benefits and interactions with pathogens. *HortScience*, 21:1302-1306
- Greenwell M., Rahman P.K.S.M., 2015. Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. *Int J Pharm Sci Res.*, 6(10):4103–4112
- Grundy S.M., 2006. Metabolic syndrome: connecting and reconciling cardiovascular and diabetes worlds. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 47(6):1093-100
- Grundy S.M., Brewer H.B. Jr, Cleeman J.I., Smith S.C. Jr, Lenfant C., 2004. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. American Heart Association, National Heart, Lung, and Blood Institute. *Circulation*, 109(3):433-8
- Guarrera P.M., Salerno G., Caneva G., 2005. Folk phytotherapeutical plants from Maratea area (Basilicata, Italy). *J. of Ethnopharmacology*, 99:367–378
- Guedes A.P., Gregory F., Fernandes-Ferreira M., 2012. *Hypericum* sp.: Essential oil composition and biological activities. *Phytochemistry Reviews*, 11(1):127–152
- Guerciolini R., 1997. Mode of action of orlistat. *Int J Obes Relat Metab Disord.*, 21(Suppl 3):S12-23
- Guimarães R., Barros L., Barreira J.C.M., Sousa M.J., Carvalho A.M., Ferreira I.C.F.R., 2009. Targeting excessive free radicals with peels and juices of Citrus fruits: grapefruit, lemon, lime and orange. *Food Chem. Toxicol.*, 48 (1):99-106
- Guoyao W.U., and Sidney M., Morris J., 1998. Review Article. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.*, 336, 1–17

- Gupta A.K., Arshad S., Poulter N.R., 2010. Compliance, safety, and effectiveness of fixed-dose combinations of antihypertensive agents: a meta-analysis. *Hypertension*, 55(2):399-407
- Gyo-Nam K., Mi-Rae S., Sung H.S., Ah Reum L., Joo Y.L., Bu-I.I.S., Min Y.K., Tae H.K., Jeong S.N., Man H.R. and Seong-Soo R., 2016. Study of Antiobesity Effect through Inhibition of Pancreatic Lipase Activity of Diospyros kaki Fruit and Citrus unshiu Peel. *Biomed Res Int*. Article ID 1723042, 7 pages
- Hadley C.W., Clinton S.K., Schwartz S.J., 2003. The consumption of processed tomato products enhances plasma lycopene concentrations in association with a reduced lipoprotein sensitivity to oxidative damage. *J Nutr.*, 133(3):727-32
- Haenen G.R., Bast A., 1999. Nitric oxide radical scavenging of flavonoids. *Methods Enzymol.*, 301:490–503
- Hajian-Tilaki K., and Heidari B., 2015. Is Waist Circumference A Better Predictor of Diabetes Than Body Mass Index Or Waist-To-Height Ratio In Iranian Adults? *Int J Prev Med.*, 6:5
- Halliwell B., and Gutteridge J.M.C., 1998. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Oxford, UK, 1998
- Han T.S., Van Leer E.M., Seidell J.C., Lean M.E., 1995. Waist circumference action levels in the identification of cardiovascular risk factors: prevalence study in a random sample. *BMJ*. 311(7017):1401–1405
- Hansen A., and Sunding P., 1985. *Flora of Macaronesia. Checklist of vascular plants*. 3. revised edition. *Sommerfeltia* 1: 5-103
- Haribabu T., Divakar K., Goli D., 2013. Department of Pharmacology, Acharya & B.M. Reddy. Evaluation of anti-diabetic activity of Lycopene and its synergistic effect with Metformin hydrochloride and Glipizide in Alloxan induced diabetes in rats. *Sch. Acad. J. Pharm.*, 2(2):119-124
- Hassan L.E.A., Sirat H.M, Yagi S.M.A., Waleed S. Koko, and Siddig Ibrahim Abdelwahab, 2011. In-vitro Antimicrobial activities of chloroformic, hexane and ethanolic extracts of *Citrullus lanatus* var. *citroides*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(8):1338-1344
- Herbert G., Windmueller H.G., and Spaeth A.E., 1975. Intestinal metabolism of glutamine and glutamate from the lumen as compared to glutamine from blood. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 171(2):662-672
- Hertog M.G., Hollman P.C., Katan M.B., Kromhout D., 1993. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer*, 20:21–9
- Hertog M.G., Kromhout D., Aravanis C., et al. 1995. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med*, 155:381–6
- Higashi Y., Oshima T., Ozono R., Watanabe M., Matsuura H., and Kajiyama G., 1995. Effects of L-arginine infusion on renal hemodynamics in patients with mild essential hypertension. *Hypertension*, 25:898–902
- Hoi J.S., Yokozawa T., Oura H., 1991. Improvement of hyperglycemia, hyperlipemia in streptozotocin-diabetic rats by a methanolic extract of *Prunus davidiana* stems, its main component. *Prunin Planta Med.*, 57:208–11
- Hollman P.C.H., 2004. Absorption, Bioavailability, and Metabolism of Flavonoids. *Pharmaceutical Biology*, 42:74–83
- Hollman P.C.H., Buijsman M.N.C.P., Van Gameren Y., Cnossen P.J., De Vries J.H.M., and Katan M.B., 1999. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radical Research*, 31(6):569–573

- Holt E., Lyn M. Steffen, Lyn M. Steffen Lyn M. Steffen, Moran A., Basu S., Steinberger J., MS, Ross J.A, Hong C.P., Alan R. Sinaiko, 2009. Fruit and Vegetable Consumption and Its Relation to Markers of Inflammation and Oxidative Stress in Adolescents. *Journal of the American Dietetic Association*, 109(3): 414-421
- Honohan T., Hale R.L., Brown J.P., Wingard R.E.J., 1976. Synthesis and metabolic fate of hesperetin-3-14C. *J Agricul Food Chem.*, 24:906–911
- Horiba T., Nishimura I., Nakai Y., Abe K., Sato R., 2010. Naringenin chalcone improves adipocyte functions by enhancing adiponectin production. *Mol Cell Endocrinol.*, 323:208–14
- Hossain M.K., Dayem A.A, Han J., Yin Y., K. K., Saha S. K., Yang G.M., Choi H.Y. and Cho S.G., 2016. Molecular Mechanisms of the Anti-Obesity and Anti-Diabetic Properties of Flavonoids. *Int J Mol Sci.*, 17(4): 569
- Hsiu S.L., Huang T.Y., Hou Y.C., Chin D.H., Chao P.D., 2007. Comparison of metabolic pharmacokinetics of naringin and naringenin in rabbits. *Life Sci.*, 1570(13):1481-9
- Hu C.M., Kang J.J., Lee C.C., Li C.H., Liao J.W., Cheng Y.W., 2003. Induction of vasorelaxation through activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by brazilin. *Eur J Pharmacol*, 468(1):37-45
- Hu C.M., Liu Y.H., Cheah K.P., Li J.S., Lam C.S., Yu W.Y., Choy C.S., 2009. Heme oxygenase-1 mediates the inhibitory actions of brazilin in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J Ethnopharmacol*, 121(1):79-85
- Huang H., Mai W., Liu D., Hao Y., Tao J., Dong Y. 2008. The oxidation ratio of LDL: a predictor for coronary artery disease. *Dis Markers*, 24(6):341-349
- Hung T.M., Thu C.V., Dat N.T., Ryoo S.W., Lee J.H., Kim J.C., Na M., Jung H.J., Bae K., Min B.S., 2010. Homoiso flavonoid derivatives from the roots of *Ophiopogon japonicus* and their in vitro anti-inflammation activity. *Bioorg Med Chem Lett.*, 1520(8):2412-6
- Hurwitz R., Kretchmer N., 1986. Development of arginine-synthesizing enzymes in mouse intestine. *Am J Physiol.*, 251(1 Pt 1):G103-10
- Hussain T., Tan B., Yin Y., Blachier F., Tossou M.C.B. and Rahu N., 2016. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, Article ID 7432797, 9 pages
- Hutchings A., Scott A.H., Lewis G., Cunningham A.B., 1996. Zulu Medicinal Plants. An Inventory. University of Natal Press, Pietermaritzburg, pp. 38–44
- Iglarz M., Clozel M., 2007. Mechanisms of ET-1-induced endothelial dysfunction. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 50:621–628
- Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S., Byrns R.E., and Chaudhuri G., 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 84(24): 9265–9269
- Ikemura M., Sasaki Y., Giddings J.C., Yamamoto J., 2012. Preventive effects of hesperidin, glucosyl hesperidin and naringin on hypertension and cerebral thrombosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Phytother Res* 26:1272–7
- Ito A., Tsao P.S., Adimoolam S., Kimoto M., Ogawa T., Cooke J.P., 1999. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation*, 99(24):3092-5

- Jackson W.P.U., 1990. Origins and meanings of names of South African plant genera. University of Cape Town;
- Jacob D., 2014. Citrus Fruits. Oxford Book Company. pp. 48-. ISBN 978-93-5030-190-6
- Jafari A., 2012. A new species of *Leopoldia* (Asparagaceae Scilloideae formerly Hyacinthaceae) from Iran. *Feddes Repertorium*, 123(4):291–294
- Jafari A., 2012. A new species of *Leopoldia* (Asparagaceae) from Iran. *Phytotaxa*, 43: 61–64
- Yildirim H., 2016. *Muscari elmasii* sp. nova (Asparagaceae). A new species from western Anatolia, Turkey. *Turkish J. Bot.*, 40:380–387
- Jafari A., Maassoumi A.A., 2011. Synopsis of *Leopoldia*, *Muscari* and *Pseudomuscari* (Hyacinthaceae) in Iran, with *Leopoldia ghouschtchiensis* sp. nova. *Ann. Bot. Fenn.*, 48: 396–400
- Jaskani M.J., Kwon S.W., Kim D.H., 2015. Comparative study on vegetative, reproductive and qualitative traits of seven diploid and tetraploid watermelon lines. *Euphytica*, 145:259–268
- Jeong E.J., Liu X., Jia X., Chen J., Hu M., 2005. Coupling of conjugating enzymes and efflux transporters: impact on bioavailability and drug interactions. *Curr Drug Metab.*, 6(5):455–68
- Jimoh T.O., Ademiluyi A.O., Oboh G., and Boligon A.A., 2017. Phenolic extracts and amino acids content from *Cucumeropsis manni* naudin and *Citrullus lanatus* inhibit relevant enzymes of erectile dysfunction in rat's penile tissue. *Biochem Biophys Rep.*, 12:5–11
- Jiyun A., Wonhee C., Suna K., and Taeyoul H., 2011. Anti-diabetic effect of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad) on Streptozotocin-induced diabetic mice *Food Science and Biotechnology*, 20(1):251-254
- Johnson R.J., Nakagawa T., Jalal D., Sánchez-Lozada L.G., Kang D.H., Ritz E., 2013. Uric acid and chronic kidney disease: which is chasing which? *Nephrol Dial Transplant.*, 28(9):2221-8
- Jordan G.J, Carpenter R.J, Koutoulis A., Price A., Brodribb T.J., 2015. Environmental adaptation in stomatal size independent of the effects of genome size. *New Phytol.*, 205(2):608-17
- Juránek, I., Suchý, V., Stará, D., Materova, I., Grancaiová, Z., 1993. Antioxidative activity of homoisoflavonoids from *Muscari racemosum* and *Dracena cinnabari*, *Die Pharmazie*, 48(4):310-311
- Kanaze F.I., Bounartzi M.I., Georgarakis M., and Niopas I., 2007. Pharmacokinetics of the Citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61:472–477
- Kanaze F.I., Bounartzi M.I., Georgarakis M., and Niopas I., 2007. Pharmacokinetics of the Citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61:472–477
- Kang M., Tao J., Wang J., Ren C., Qi Q., Xiang Q.Y., Huang H., 2014. Adaptive and nonadaptive genome size evolution in Karst endemic flora of China. *New Phytol.*, 202(4):1371-81
- Kang S.I., Shin H.S., Kim H.M., Hong Y.S., Yoon S.A., Kang S.W., Kim J.H., Kim M.H., Ko H.C., Kim S.J. 2012. Immature Citrus sunki peel extract exhibits antiobesity effects by β -oxidation and lipolysis in high-fat diet-induced obese mice. *Biol Pharm Bull.*, 35(2):223-30
- Kannappan S., Anuradha C.V., 2010. Naringenin enhances insulin-stimulated tyrosine phosphorylation and improves the cellular actions of insulin in a dietary model of metabolic syndrome. *Eur J Nutr.*, 49:101–9

- Karagozlu M.Z., Kim M., Lee M., 2016. Citrus Peel Ethanol Extract Inhibits the Adipogenesis Caused from High Fat-Induced DIO Model. *Food and Nutrition Sciences*, 7(1)
- Karlén T., 1984. *Muscari pulchellum* (Liliaceae) and associated taxa in Greece and W Turkey. *Willdenowia*, 14: 89–118
- Kast P., Tewari Y.B., Wiest O., Hilvert D., Houk K.N. and Goldberg R.N., 1997. Thermodynamics of the Conversion of Chorismate to Prephenate: Experimental Results and Theoretical Predictions, *J. Phys. Chem. B*, 101(50):10976–10982
- Kaur J., 2014. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol. Res. Pract.*, 2014:943162
- Kawaguchi K., Mizuno T., Aida K. and Uchino K., 1997. Hesperidin as an Inhibitor of Lipases from Porcine Pancreas and *Pseudomonas*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61(I):102-104
- Kawakami M., Iwanami J., Tsukuda K., Higaki A., Min L.J., Mogi M., Horiuchi M., 2017. Hesperidin, Ingredient of Citrus Fruits Juice, Attenuates Cognitive Impairment Induced by Ischemic Brain Damage. *Hypertension*, 70:AP447
- Kayiran D., Özhatay F.N., 2017. A karyomorphological study on the genus *Muscari* Mill. growing in Kahramanmaraş (Turkey) Serpil, *Turk J Bot.*, 41:289-298
- Kelly E.H., Anthony R.T., and Dennis J.B., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10):572–584
- Khettal B., Kadri N., Tighilet K., Adjebli A., Dahmoune F., Maiza-Benabdeslam F., 2017. Phenolic compounds from Citrus leaves: antioxidant activity and enzymatic browning inhibition. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 14(1)
- Kim G.N., Shin M.R., Shin S.H., Lee A.R., Lee J.Y., Seo B.I., Kim M.Y., Kim T.H., Noh J.S., Rhee M.H., Roh S.S., 2016. Study of Antiobesity Effect through Inhibition of Pancreatic Lipase Activity of *Diospyros kaki* Fruit and Citrus unshiu Peel. *Biomed Res Int.*, 2016:1723042
- Ko J.H, Jeon W.J., Kwon H.S., Yeon S.W. Kang J.H., 2015. Anti-obesity Effects of Ethanolic Extract of *Polygonatum sibiricum* Rhizome in High-fat Diet-fed Mice. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 47(4):499-503
- Kolawole T.A., Ojeka S.O., and Dapper D.V., 2016. Anti-diabetic effects of the methanolic extract of the rind of *Citrullus lanatus* (watermelon) in alloxan induced diabetes in male albino wistar rats. *Journal of Medicine and Medical Sciences*, 7(2):023-029
- Komarov V.L., 1935. *Flora SSSR* 4: 1-586. Izdatel'stov Akademii N. SSSR, Leningrad
- Koocheki A., Razavi S.M.A., Milani E., Monghadam T.M., Alamatyian S., and Izadkhah S., 2007. Physical properties of watermelon seeds as a function of moisture content and variety. *Int. Agrophysics*, 21:349-359
- Kopelman P.G., 2000. Obesity as a medical problem. *Nature* 404:635-643
- Krol A., Amarowicz R., Weidner S., 2014. Changes in the composition of phenolic compounds and antioxidant properties of grapevine roots and leaves (*Vitis vinifera* L.) under continuous of long-term drought stress. *Acta Physiol Plant*, 36:1491–1499
- Kumar A., Narayani M., Subanthini A., and Jayakumar M., 2011. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of Citrus fruits peel utilization of fruit waste. *International Journal of Engineering Science and Technology*, 3(6):5414-5421
- Kumar R.V., Nandini S., and Anitha S., 2010. Antityphoid activity of aqueous extract of fruit peel *Citrus sinensis*. *International Journal of Pharma. Research and Development*, 2(1):217-212

- Kumar S., and Pandey A.K., 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview The Scientific World Journal, 2013, Article ID 162750, 16 pages
- Kwon Y.I., Apostolidis E., Kim Y.C., Shetty K., 2007. Health benefits of traditional corn, beans and pumpkin: In vitro studies for hyperglycemia and hypertension management. *J Med Food*, 10:266-75
- Lagha-Benamrouche S., Madani K., 2013. Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Industrial Crops and Products*, 50:723-730
- Lau F.C., Shukitt-Hale B., and Joseph J.A., 2006. Beneficial effects of berry fruit polyphenols on neuronal and behavioral aging. *J. Sci. Food Agric.*, 86:2251-2255
- Lau T., Owen W., Yu Y.M., Noviski N., Lyons J., Zurakowski D., Tsay R., Ajami A., Young V.R., and Castillo L., 2000. Arginine, citrulline, and nitric oxide metabolism in end-stage renal disease patients. *J Clin Invest.*, 105(9):1217-1225
- Lauer M.S., Anderson K.M., Kannel W.B., Levy D., 1991. The impact of obesity on left ventricular mass and geometry. The Framingham Heart Study. *JAMA*, 266(2):231-236
- Lebeda A., Widrlechner M.P., Staub J., Ezura H., Zalapa J., and Kristkova E., 2007. Cucurbits (*Cucurbitaceae*; *Cucumis* spp., *Cucurbita* spp., *Citrullus* spp. NCRPIS Publications and Papers, 84
- Legssyer A.K., Hove-Madsen L., Hoerter J., Fischmeister R., 1997. Sympathetic modulation of the effect of nifedipine on myocardial contraction and Ca²⁺ current in the rat. *J Mol Cell Cardiol*, 29:579-591
- Lekakis J.P., Papathanassiou S., Papaioannou T.G., Papamichael C.M., Zakopoulos N., Kotsis V., Dage A.G., Stamatelopoulos K., Protogerou A., and Stamatelopoulos S.F., 2002. Oral L-arginine improves endothelial dysfunction in patients with essential hypertension. *Int. J. Cardiol.*, 86:317-323
- Lentini F., Venza F., 2007. Wild food plants of popular use in Sicily. *J. of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3:15-21
- Leong L.P., and Shui G., 2002. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem*, 76:69
- Lerman A., Burnett J.C.J., Higano S.T., McKinley L.J., and Holmes D.R.J., 1998. Long-term L-arginine supplementation improves small-vessel coronary endothelial function in humans. *Circulation*, 97:2123-2128
- Leskovar D.I., Bang H., Crosby K.M., Maness N., Franco J.A., Perkins-Veazie P., 2004. Lycopene, carbohydrates, ascorbic acid and yield components of diploid and triploid watermelon cultivars are affected by deficit irrigation. *J Hort Sci Biotechnol.*, 200479:75-81
- Levi A., Thomas C.E., Keinayh A.P., Wehner T.C., 2001. Genetic diversity among watermelon (*Citrullus lanatus* and *Citrullus colocynthis*) accessions. *Genet Resour Crop Ev*, 48: 59-566
- Lewinsohn E., Sitrit Y., Bar E., Azulay Y., Ibdah M., Meir A., Yosef E., Zamir D. and Tadnor Y., 2005. Not just colors-carotenoid degradation as a link between pigmentation and aroma on tomatoes' and watermelon fruits. *Trends Food Sci.Tech.*, 16:407-415
- Li N., Zhang J.Y., Zeng K.W., Zhang L., Che Y.Y., Tu P.F., 2012. Anti-inflammatory homoisoflavonoids from the tuberous roots of *Ophiopogon japonicus*. *Fitoterapia*, 83:1042-1045
- Lim T.K., 2014. *Muscari neglectum*. *Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants*. Springer Netherlands, 122-5

- Lin LG., Liu QY., Ye Y., 2014. Naturally Occurring Homoisoflavonoids and Their Pharmacological Activities. *Planta Med*, 80(13):1053-1066
- Liu W., Zhao S., Cheng Z., Wan X. and Yan Z., 2010. Proc. 4th IS on Cucurbits Ed.: Xiaowu Sun. Lycopene and Citrulline Contents in Watermelon (*Citrullus lanatus*) Fruit with Different Ploidy and Changes during Fruit Development *Acta Hort.* 71, ISHS 2010 Postharvest Biology and Technology
- Liu Z., Hu M., 2007. Natural polyphenol disposition via coupled metabolic pathways. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.*, 3(3):389–406
- Locatelli D.A, Nazareno M.A., Fusari C.M., Camargo A.B., 2017. Cooked garlic and antioxidant activity: Correlation with organosulfur compound composition *Food Chemistry*, 220(1):219-224
- Loizzo M.R., Tundis R., Menichini F., Pugliese A., Bonesi M., Solimene U., Menichini F., 2010. Chelating, antioxidant and hypoglycaemic potential of *M. comosum* (L.) Mill. bulb extracts. *Int J Food Sci Nutr.*, 61(8):780-91
- Loizzo M.R., Tundis R., Menichini F., Bonesi M., Frega N., Menichini F., 2011. Radical scavenging activity and cholinesterase inhibitory activity of *Leopoldia comosa* (L.) bulbs. *Progress in Nutrition*, 13(4):300-303
- Loke W.M., Proudfoot J.M., Hodgson J.M., McKinley A.J., Hime N., Magat M., Stocker R., Croft K.D., 2010. Specific dietary polyphenols attenuate atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice by alleviating inflammation and endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 30(4):749-57
- Loscalzo J., 2013. The identification of nitric oxide as endothelium-derived relaxing factor. *Circ Res.*, 113:100–103
- Lowe M., 2002. The triglyceride lipases of the pancreas. *J Lipid Res.*, 43:2007-2016
- Lu Y.B, Qi Y.P., Yang L.T., Lee J., Guo P., Ye X., Jia M.Y., Li M.L. and Chen L.S., 2015. Long-term boron-deficiency-responsive genes revealed by cDNA-AFLP differ between *Citrus sinensis* roots and leaves. *Front. Plant Sci.*, 286:585
- Lucarini M., Lanzi S., D'Evoli L., Aguzzi A., Lombardi-Boccia G., 2006. Intake of vitamin A and carotenoids from the Italian population--results of an Italian total diet study. *Int J Vitam Nutr Res.* 76(3):103-9
- Lucier G., Lin H.B., 2001. Factors affecting watermelon consumption in the United States. In Annoymous, eds. *Vegetables and Specialties: Situation and outlook*. VGS-287 p. USDAERS pp. 23-29
- Luiking Y.C., Ten Have G.A. M., Wolfe R.R, Deutz N.E. P. 2012. Arginine de novo and nitric oxide production in disease states. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism.*, 303(10):E1177-E1189
- Lyons-Wall P., Autenzio P., Lee E., Moss R., Samman S., 2004. Catechins are the major source of flavonoids in a group of Australian women. *Asia Pac J Clin Nutr.*, 13:S72
- Mabberley D.J., 2008. *Mabberley's Plant-Book: a portable dictionary of plants, their classification and uses*. Cambridge University Press
- Machala M., Kubínová R., Horavová P., Suchý V., 2001. Chemoprotective potentials of homoisoflavonoids and chalcones of *Dracaena cinnabari*: modulations of drug-metabolizing enzymes and antioxidant activity. *Phytother Res.*, 15(2):114-8
- Madhavi P., Kamala V., and Habibur R., 2012. Hepatoprotective Activity of *Citrullus lanatus* Seed Oil on CCl4 Induced Liver Damage in Rats. *Scholars Academic Journal of Pharmacy*, 1(1):30-33

- Madhavi P., Maruthi R., Kamala V., Habibur R., Chinna Eswaraiah M., 2012. Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of *Citrullus lanatus* Seed Oil by In-vivo and In-vitro Models. *Int. Res J Pharm. App Sci.*, 2012 2(4):104-108
- Magiorkinis E., Beloukas A., Diamantis A., 2011. Scurvy: past, present and future. *Eur. J. Int. Med.*, 22(2011):147-152
- Mahboubi M., Taghizadeh M., 2016. The antimicrobial and antioxidant activity of *Muscari neglectum* flower ethanol extract. *From Botanical to Medical Research.*, 62(4)
- Makarem N., Mossavar-Rahmani Y., Sotres-Alvarez D., Hua S., Wong W.W., Van Horn L., Daviglus M.L., Franke A.A., Gellman M.D., Kaplan R.C. and Beasley J.M., 2017. The relationship between polyphenols and body composition in US Hispanics/Latinos: results from the HCHS/SOL SOLNAS study. *Curr Dev Nutr.*, doi:10.1177/0011115
- Mallick N., Khan R.A., 2016. Antihyperlipidemic effects of *Citrus sinensis*, *Citrus paradisi*, and their combinations. *J Pharm Bioallied Sci.*, (2):112-8
- Manach C., Morand C., Gil-Izquierdo A., Bouteloup-Demange C. and Révész C., 2003. Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57:235–242
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Révész C. and Jiménez L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5):727–747
- Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Révész C., 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr*, 81(1 Suppl.):230S–242S
- Mann J., Davidson R.S., Hobbs J.B., Banthorpe D.V., and Harborne J.B., 1994. *Natural Products: Their chemistry and biological significance*, Longman Scientific and Technical, Longman Group UK Ltd.: Harlow, Essex, 372
- Manning J.C., Goldblatt P., Fay M.F., 2003. A revised generic synopsis of Hyacinthaceae in sub-Saharan Africa, based on molecular evidence, including new combinations and the new tribe Pseudoprosperaeae. *Edinb J Bot*, 60:533–568
- Marfella R., Acampora R., Verrazzo G., Ziccardi P., De Rosa N., Giunta R., and Giugliano D., 1996. Metformin improves hemodynamic and rheological responses to L-arginine in NIDDM patients. *Diabetes Care*, 19:934– 939
- Marletta M.A., Yoon P.S., Iyengar R., Leaf C.D., Wishnok J.S., 1988. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry*, 27(24):8706-11
- Marotta T., Russo B.F., Ferrara L.A., 2010. Triglyceride-to-HDL-cholesterol ratio and metabolic syndrome as contributors to cardiovascular risk in overweight patients. *Obesity (Silver Spring)*, 18(8):1608-13
- Marrelli M., La Grotteria S., Araniti F., and Conforti F., 2017. Investigation of the Potential Health Benefits as Lipase Inhibitor and Antioxidant of *Leopoldia comosa* (L.) Parl.: Variability of Chemical Composition of Wild and Cultivated Bulbs. *Plant Foods Hum Nutr*, 2017
- Marrelli M., Loizzo M.R., Nicoletti M., et al. 2014. In vitro investigation of the potential health benefits of wild Mediterranean dietary plants as anti-obesity agents with α -amylase and pancreatic lipase inhibitory activities. *J Sci Food Agr* 201494:2217-24
- Martí R., Roselló S., Cebolla-Cornejo J., 2016. Tomato as a Source of Carotenoids and Polyphenols Targeted to Cancer Prevention. *Cancers (Basel)*, 8(6):58

- Martinez-Azor M., Crespo M.B., Juan A., and Fay M.F., 2011. Molecular phylogenetics of subfamily Ornithogaloideae (Hyacinthaceae) based on nuclear and plastid DNA regions, including a new taxonomic arrangement. *Ann. Bot.*, 107:1–37
- Massi A., Bortolini O., Ragno D., Bernardi T., Sacchetti G., Tacchini M. and De Risi C., 2017. Research Progress in the Modification of Quercetin Leading to Anticancer Agents. *Molecules*, 22:1270
- Mašterová I., Grancaiova Z., Uhrinova S., Suchy V., Ubik K., Nagy M., 1991. Flavonoids in flowers of *Calendula officinalis* L. *Chem. Papers*, 45(1):105-108
- Masterova I., Suchy V., Uhrin D., Ubik K., Grancaiova Z., Bobovnický B., 1991. Homoisoflavanones and other constituents from *Muscari racemosum*. *Phytochemistry*, 30:713-714
- Matsuoka H., Itoh S., Kimoto M., Kohno K., Tamai O., Wada Y., Yasukawa H., Iwami G., Okuda S., and Imaizumi T., 1997. Asymmetrical dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, in experimental hypertension. *Hypertension*, 29:242–247
- Matthews D.E., Marano M.A., and Campbell R.G., 1993. Splanchnic bed utilization of glutamine and glutamic acid in humans. *Am. J. Physiol.*, 264:E848-E854
- Matthews D.R., Hosker J.P., Rudenski A.S., Naylor B.A., Treacher D.F., Turner R.C., 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28(7):412-419
- Mayans L., 2015. Metabolic Syndrome: Insulin Resistance and Prediabetes. *FP Essent*, 435:11-6
- Maynard D.N., 2001. Watermelons: characteristics, production and marketing. American Society for Horticultural Science (ASHS) Press. Horticulture Crop Production Series
- Mayumi N.V., Alves Macedo G., Alves Macedo J., 2014. Citrus bioactive phenolics: Role in the obesity treatment. *LWT-Food Science and Technology*, 59(2014):1205-1212
- McMurray F., Patten D.A., Harper M.E., 2016. Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in Obesity-Recent Findings and Empirical Approaches. *Obesity*. 24(11):2301-2310
- Mehta S., Stewart D.J., and Levy R.D., 1996. The hypotensive effect of L-arginine is associated with increased expired nitric oxide in humans, *Chest* 109:1550–1555
- Meiyanto E., Hermawan A., and Anindyajati., 2012. Natural Products for Cancer-Targeted Therapy: Citrus Flavonoids as Potent Chemopreventive Agents. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(2):427-36
- Meydani M., Hasan S.T., 2010. Dietary polyphenols and obesity. *Nutrients*, 2:737-51
- Miadoková E., Masterova I., Vlckova V., Duhova V., Toth J., 2002. Antimutagenic potential of homoisoflavanoids from *Muscari racemosum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 81(3): 381-386
- Michel T., Vanhoutte P.M., 2010. Cellular signaling and NO production. *Pflugers Arch.*, 459(6):807-16
- Mikulic-Petkovsek M., Schmitzer V., Slatnar A., Stampar F. and Veberic R., 2015. A comparison of fruit quality parameters of wild bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) growing at different locations. *J. Sci. Food Agric.*, 95:776–785
- Mishra A., Kumar S., and Pandey A.K., 2013. Scientific validation of the medicinal efficacy of *Tinospora cordifolia*. *The Scientific World Journal*. Article ID 292934
- Moerman D.E., 1998. Native American ethnobotany: Timber Press. ISBN13: 9780881924534
- Moncada S., Higgs E.A., 1995. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J*. 9(13):1319-30

- Montezano A.C., Touyz R.M., 2012. Molecular mechanisms of hypertension-reactive oxygen species and antioxidants: a basic science update for the clinician. *Can J Cardiol.*, 28(3):288-95
- Morales P., Ferreira I.C.F.R., Carvalho A.M., et al. 2014. Mediterranean non-cultivated cultivated vegetables as dietary sources of compounds with antioxidant and biological activity. *LWT-Food Sci Technol*, 5:389-96
- Morgan-Richards M., Trewick S.A., Chapman H.M., Krahulcova A., 2004. Interspecific hybridization among *Hieracium* species in New Zealand: Evidence from flow cytometry. *Heredity*, 93:34–42
- Morricone A., Pedicino V., 1986. *Dizionario dietetico degli alimenti*, Milano, A. Vallardi, p. 224
- Morris S.M. Jr., Sweeney W.E. Jr., Kepka D.M., O'Brien W.E., Avner E.D., 1991. Localization of arginine biosynthetic enzymes in renal proximal tubules and abundance of mRNA during development. *Pediatr Res.*, 29(2):151-4
- Morse R., Zhang V., Thakur E., and Reisin L., 2005. Hypertension and the metabolic syndrome. *The American Journal of the Medical Sciences*, 330(6):303–310
- Mulè G., Calcaterra I., Nardi E., Cerasola G., Cottone S., 2014. Metabolic syndrome in hypertensive patients: An unholy alliance. *World J Cardiol.*, 6(9):890-907
- Moussa M., Landrier J.F., Reboul E., Ghiringhelli O., Coméra C., Collet X., Fröhlich K., Böhm V., 2008. Borel Lycopene absorption in human intestinal cells and in mice involves scavenger receptor class B type I but not Niemann-Pick C1-like 1. *P. J Nutr.* 138(8):1432-6
- Mrdaković M., Lazarević C.J., Peri C., Mataruga V., Ilijin L., and Vlahovi C.M., 2008. Partial Characterization of a Lipase from Gypsy Moth (*Lymantria dispar* L.) Larval Midgut. *Folia biologica (Kraków)*, 56(1-2)
- Mulholland D.A., Schwikkard S.L. and Crouch N.R., 2013. The chemistry and biological activity of the Hyacinthaceae. *Nat. Prod. Rep.*, 30:1165-1210
- Mulvihill E.E., Allister E.M., Sutherland B.G., Telford D.E., Sawyez C.G., Edwards J.Y., Markle J.M., Hegele R.A., Huff M.W., 2009. Naringenin prevents dyslipidemia, apolipoprotein B overproduction, and hyperinsulinemia in LDL receptor-null mice with diet-induced insulin resistance. *Diabetes*, 58:2198–10
- Munglue P., Kupittayanant S., and Kupittayanant P., 2014. Effect of Watermelon (*Citrullus lanatus*) Flesh Extract on Sexual Behavior of Male Rats. *CMUJ NS Special Issue on Food and Applied Bioscience*, 13(1):519-527
- Muthiah P., Umamaheswari M., Asokkumar K., 2012. In vitro antioxidant activities of leaves, fruits and peel extracts of Citrus. *Int J Phytopharm*, 2:13–20
- Nacz M., Shahidi F., 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr.*, 1054:95–111
- Nakajima V.M., Macedo G.A., Macedo J.A., 2014. Citrus bioactive phenolics: Role in the obesity treatment. *LWT - Food Science and Technology*, 59:1205-1212
- Nam K., Ellegren H., 2012. Recombination drives vertebrate genome contraction. *PLoS Genet.*, 8:e1002680
- Namdar R. and Nafisi S., 2013. Study on the interaction of homoisoflavonoids with nucleic acids Comparative study by spectroscopic methods. ISBN 978-3-659-49924
- Nannapaneni R., Muthaiyan A., Crandall P.G, Johnson M.G., O'Bryan C.A., Chalova V.I., Callaway T.R., Carroll J.A., Arthington J.D., Nisbet D.J and Ricke S.C. 2008. Antimicrobial activity of commercial Citrus based natural extract against *Escherichia coli* O157: H7 Isolates and mutant strains. *Food borne Pathogens and disease*, 5(5): 695-699

- Naresh S.G., 2011. Evaluation of Antioxidant activity of *Citrullus lanatus* Seed extract in Rats., *Lat. Am. J. Pharm*, 30(3):429-34
- Nengguo T., Yumei G., Yuejin L., and Fei G., 2010. Carotenoids from the peel of Shatian Pummelo (*Citrus grandis* Osbeck) and its antimicrobial activity. *American Eurasian Journal of agricultural and environmental science*, 7(1):110-115
- Nesto R.W., 2003. The relation of insulin resistance syndromes to risk of cardiovascular disease. *Rev Cardiovasc Med.*, 4 Suppl 6:S11-8
- Nguyen M.L., Schwartz S.J., 1998. Lycopene Stability During Food Processing. *Experimental Biology and Medicine*, 218(2):101-105
- Nguyen M.L., Schwartz S.J., Zechmeister L., 1944. Cis-trans isomerization and stereochemistry of carotenoids and diphenyl-polyenes. *Chem Rev.*, 34(2):267-344
- Nicolosi E., Deng Z.N., Gentile A., La Malfa S., Continella G., and Tribulato E., 2000. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor. Appl. Genet.*, 100:1155-1166
- Nilesh P. N., Mithun S.R., Prasad R.G.S.V., Ahmad M., 2015. Brazilin from *Caesalpinia sappan* heartwood and its pharmacological activities: A review- *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 8(6):421-430
- Nweze C.C., Abdulganiyu M.G., and Erhabor O.G., 2015. Comparative analysis of vitamin c in fresh fruits juice of *Malus domestica*, *Citrus sinensi*, *Ananas comosus* and *Citrullus lanatus* BY iodometric titration. *International Journal of Science, Environment ISSN 2278-3687 (O) and Technology*, 4:(1):17-22
- Okamura T., Pei X.Y., Miyoshi I., Shimizu Y., Takanashi-Yanobu R., Mototani Y., Kanai T., Satoh J., Kimura N., Kasai N., 2013. Phenotypic characterization of LEA rat: a new rat model of non obese type 2 diabetes. *J Diabetes Res.*, 2013:986462
- Okunrobo O.L., Uwaya O.J., Imafidon E.K., Osarumwense O.P., Omorodion E.J., 2012. Quantitative determination, Metal analysis and Antiulcer evaluation of Methanol seeds extract of *Citrullus lanatus* Thunb (*Cucurbitaceae*) in Rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, S1:261-S1265
- Olabinri B.M., Olaleye M.T., Ajani R.A., Akinmayowa S., Busayo O.O., Funmilola A., 2013. In Vitro Discovery of Watermelon (*Citrullus lanatus*) Extract with Moderate Chelating Ability, and Survey of other in Vitro Bioactivities. *American International Journal of Contemporary Research*, 3(4)
- Olamide A.A., Olayemi O.O., Demetrius O.O., Olatoye O.J., and Kehinde A.A., 2011. Effects of Methanolic Extract of *Citrullus lanatus* Seed on Experimentally Induced Prostatic Hyperplasia. *European Journal of Medicinal Plants*. 21(4):171-179
- Oliver M.J., Petrov D., Ackerly D., Falkowski P., Schofield O.M., 2007. The mode and tempo of genome size evolution in eukaryotes. *Genome Res.*, 17:594-601
- Ollitrault P., Terol J., Chen C., Federici C.T., Lotfy S., Hippolyte I., Ollitrault F., Bérard A., Chauveau A., Cuenca J., Costantino G., Kacar Y., Mu L., Garcia-Lor A., Froelicher Y., Aleza P., Boland A., Billot C., Navarro L., Luro F., Roose M.L., Gmitter F.G., Talon M. and Brunel D., 2012. A reference genetic map of *C. clementina* hort. ex Tan. Citrus evolution inferences from comparative mapping. *BMC Genomics*, 13:593
- Onuma W., Asai D., Tomono S., Miyamoto S., Fujii G., Hamoya T., Nagano A., Takahashi S., Masumori S., Miyoshi N., Wakabayashi K., and Mutoh M., 2017. Anticarcinogenic Effects of Dried Citrus Peel in Colon Carcinogenesis Due to Inhibition of Oxidative Stress. *Journal Nutrition and Cancer.*, 69(6):855-861
- Orrego-Lagarón N., Martínez-Huélamo M., Quifer-Rada P., Lamuela-Raventos R.M., Escribano-Ferrer E., 2016. Absorption and disposition of naringenin and quercetin after simultaneous administration via intestinal perfusion in mice. *Food Funct.*, 147(9):3880-9

- Oseni O.A., Odesanmi O.E., and Oladele F.C., 2015. Antioxidative and antidiabetic activities of watermelon (*Citrullus lanatus*) juice on oxidative stress in alloxan-induced diabetic male Wistar albino rats. *Niger Med J.*, 56(4):272–277
- Ouchi N., Parker J.L., Lugus J.J. and Walsh K., 2011. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews, Immunology*, 11(2):85-97
- Ovodov I., 1998. Polysaccharides of flower plants: Structure and physiological activity. *Bioorg Khim*, 24:483–501
- Oyedemi S.O., Oyedemi B.O., Ijeh I.I., Ohanyerem P.E., Coopoosamy R.M., and Aiyegoro O.A., 2017. Alpha-Amylase Inhibition and Antioxidative Capacity of Some Antidiabetic Plants Used by the Traditional Healers in Southeastern Nigeria. *ScientificWorldJournal*, 2017: 3592491
- Oyolu C.A., 1977. Quantitative and qualitative study of seed types in egusi (*Colocynthis citrullus* L). *Tropic Sci.*, 19(1):55-62
- Padayatty S.J., Katz A., Wang Y., Eck P., Kwon O., Lee J.H., Chen S., Corpe C., Dutta A., Dutta S.K. and Levine M., 2003. Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. *Journal of the American College of Nutrition*, 22(1)
- Padwal R., Li S.K., Lau D.C., 2003. Long-term pharmacotherapy for obesity and overweight. *Cochrane Database Syst Rev.*, 4:CD004094
- Pagnotta P., Germano G., Grutter G., Leonardo F., Rosano G., and Chierchia S., 1997. Oral L-arginine supplementation improves essential arterial hypertension. *Circulation*, 96(suppl.8S):538-I
- Pak C.Y., 2004. Medical management of urinary stone disease. *Nephron Clin. Prac.*, 98(2004):49-53
- Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S., 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327(6122):524-6
- Pan S.Y., Zhou S.F., Gao S.H., Yu Z.L., Zhang S.F., Tang M.K., Sun J.N., Ma D.L., Han Y.F., Fong W.F., and Ko K.M., 2013. New Perspectives on How to Discover Drugs from Herbal Medicines: CAM's Outstanding Contribution to Modern Therapeutics. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, Article ID 627375, 25 pages
- Panchal S.K., Poudyal H., Brown L., 2012. Quercetin ameliorates cardiovascular, hepatic, and metabolic changes in diet-induced metabolic syndrome in rats. *J Nutr.*, 142(6):1026-1032
- Pandey A.K., Mishra A.K., and Mishra A., 2012. Antifungal and antioxidative potential of oil and extracts derived from leaves of Indian spice plant *Cinnamomum tamala*. *Cellular and Molecular Biology*, 58:142–147
- Panza J.A., Casino P.R., Badar D.M., and Quyyumi A.A., 1993. Effect of increased availability of endothelium-derived nitric oxide precursor on endothelium-dependent vascular relaxation in normal subjects and in patients with essential hypertension. *Circulation*, 87:1475–1481
- Park H.J., Jung U.J., Lee M.K., Cho S.J., Jung H.K., Hong J.H., Park Y.B., Kim S.R., Shim S., Jung J., Choi M.S., 2013. Modulation of lipid metabolism by polyphenol-rich grape skin extract improves liver steatosis and adiposity in high fat fed mice. *Mol Nutr Food Res.*, 57(2):360-4
- Parks M., Cronn R., Liston A., 2009. Increasing phylogenetic resolution at low taxonomic levels using massively parallel sequencing of chloroplast genomes. *BMC Biol.*, 7():84
- Parmar H.S., and Kar A., 2008. Antiperoxidative, antithyroidal, antihyperglycemic and cardioprotective role of *Citrus sinensis* peel extract in male mice. *Phytother. Res.*, 22: 791–795

- Penjor T., Yamamoto M., Uehara M., Ide M., Matsumoto N., Matsumoto R., Nagano Y., 2013. Phylogenetic Relationships of Citrus and Its Relatives Based on matK Gene Sequences. *PLoS one*, 8(4):e62574
- Pepe G., Pagano F., Adesso S., Sommella E., Ostacolo C., Manfra M., Chieppa M., Sala M., Russo M., Marzocco S. and Campiglia P., 2017. Bioavailable Citrus sinensis Extract: Polyphenolic Composition and Biological Activity. *Molecules*, 22(4), 623, 22040623 Article
- Perkins-Veazie P., and Collins J.K., 2004. Flesh quality and lycopene stability of fresh-cut watermelon. *Postharvest Biol. Technol.*, 31:159-166
- Petchlert C., Kaewnoi R., Siriboot A., Suriyapan O., 2013. Antioxidant capacity of commercial Citrus juices from supermarket in Thailand. *Pure and Applied Chemistry International Conference*, 1-4
- Petrussa E., Braidot E., Zancani M., Peresson C., Bertolini A., Patui S., and Vianello A., 2013. Plant Flavonoids—Biosynthesis, Transport and Involvement in Stress Responses *Int J Mol Sci.*, 14(7):14950–14973
- Pfeil B.E., and Crisp M.D., 2008. The age and biogeography of Citrus and the orange subfamily (Rutaceae: Aurantioideae) in Australasia and New Caledonia. *Am. J. Bot.*, 95(12):1621-1631
- Pfossen M., Speta F., 1999. Phylogenetics of Hyacinthaceae based on plastid DNA sequences. *Ann Mo Bot Gard*, 86:852–875
- Pieroni A., Janiak V., Dürr C.M., Lüdeke S., Trachsel E., Heinrich M., 2002. In vitro antioxidant activity of non-cultivated vegetables of ethnic Albanians in southern Italy. *Phytother Res.*, 16(5):467-73
- Pieroni A., Nebel S., Quave C., Munz H., Heinrich M., 2002. Ethnopharmacology of liakra: traditional weedy vegetables of the Arbëreshë of the Vulture area in southern Italy. *J Ethnopharmacol.*, 81:165-85
- Pieroni A., Nebel S., Santoro F.R., Heinrich M., 2005. Food for two seasons: Culinary uses of non-cultivated, local vegetables and mushrooms in a south Italian Village. *Int. J. of Food Sciences and Nutrition*, 56:245-272
- Podsedek A., 2007. Review Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables. *LWT* 40 (2007) 1–11
- Pohl T.S., Crouch N.R., Mulholland D.A., 2000. Southern African Hyacinthaceae: Chemistry, bioactivity and ethnobotany. *Curr. Org. Chem.*, 4:1287–1324
- Porrini M., Riso P. 2005. What are typical lycopene intakes? *J Nutr.*, 135(8):2042S-5S
- Pourshojaei P.Y., Gouranourimi A., Hekmat S., Asadipour A., Rahmani-Nezhad S., Moradi A., Nadri H., Moghadam F.H., Emami S., Foroumadi S., Shafiee A., 2015. Design, synthesis and anticholinesterase activity of novel benzylidenechroman-4-ones bearing cyclic amine side chain. *Eur. J. Med. Chem.*, 97:181–189
- Prakash O.M., Amit K., Pawan K. and Ajeet, 2013. Anticancer Potential of Plants and Natural Products: A Review. *American Journal of Pharmacological Sciences*, 1(6):104-115
- Prasad M., Chandni R., Devarajan E., 2017. A Study On Estimation Of Visceral Fat And Its Metabolic And Clinical Correlates In Metabolic Syndrome. *Clinical Proceedings*, [S.l.], 13(1):6-13, ISSN 2229-5011
- Priscilla D.H., Jayakumar M., Thirumurugan K., 2015. Flavanone naringenin: An effective antihyperglycemic and antihyperlipidemic nutraceutical agent on high fat diet fed streptozotocin induced type 2 diabetic rats. *J Funct Foods*, 14:363–73

- Priscilla D.H., Roy D., Suresh A., Kumar V., Thirumurugan K., 2014. Naringenin inhibits α -glucosidase activity: A promising strategy for the regulation of postprandial hyperglycemia in high fat diet fed streptozotocin induced diabetic rats. *Chem Biol Interact.*, 210:77–85
- Proteggente A.R., Saija A., De Pasquale A., Rice-Evans C.A., 2003. The compositional characterisation and antioxidant activity of fresh juices from Sicilian sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck L.) varieties. *Free Radic. Res.*, 37:681-687
- Pu P., Gao D.M., Mohamed S., Chen J., Zhang J., Zhou X.Y., Zhou N.J., Xie J., Jiang H., 2012. Naringin ameliorates metabolic syndrome by activating AMP-activated protein kinase in mice fed a high-fat diet. *Arch Biochem Biophys*, 518:61–70
- Queslati S., Karray-Bouraoui N., Attia H., Rabhi M., Ksouri R., Lachaal M., 2010. Physiological and antioxidant responses of *Mentha pulegium* (Pennyroyal) to salt stress. *Acta Physiol Plant*, 32(2):289-96
- Quettier-Deleu C., Gressier B., Vasseur J., Dine T., Brunet C., Luyckx M., Cazin M., Cazin J.C., Bailleul F., Trotin F., 2000. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *J Ethnopharmacol*, 72(1-2):35-42
- Quintieri A.M., Baldino N., [Filice E.](#), Vitetti A., Tota B., De Cindio B., Cerra M.C. and Angelone T., 2013. Malvidin, a red wine polyphenol, modulates mammalian myocardial and coronary performance and protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(7):1221-1231
- Quyyumi A.A., Dakak N., Diodati J.G., Gilligan D.M., Panza J.A., and Cannon R.O., 1997. Effect of L-arginine on human coronary endothelium-dependent and physiologic vasodilation. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 30:1220–1227
- Raghavan S., Subramaniam G., Shanmugam N., 2012. Proinflammatory effects of malondialdehyde in lymphocytes. *J Leukoc Biol.*, 92(5):1055-67
- Rahman H., Priyanka P., Lavanya P., Srilakshmi N., Kumar P., 2013. A review on ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Citrullus lanatus* L. *Int. Res J Pharm. App Sci.*, 3(2):77-81
- Rahman M.M., Gibbons S., Gray A.I., 2007. Isoflavanones from *Uraria picta* and their antimicrobial activity. *Phytochemistry*, 68(12):1692-7
- Rahul K. L., Deeba N.S., Vaqar M.A., Mohammad I.K. and Hasan M., 2015. Dietary Polyphenols in Prevention and Treatment of Prostate Cancer. *Int J Mol Sci.*, 16(2):3350–3376
- Rajesh E., Leena S., Sankari L. M., and Jayasri R.K., 2015. Naturally occurring products in cancer therapy. *J Pharm Bioallied Sci.*, 7(1):S181–S183
- Rajesh N., Huma L.C., Holland L.E., Shukla D., McCormick D.L., Mehta R.G., Moriarty R.M., 2008. Antiviral Activity of Phytochemicals: A Comprehensive Review *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 8(11):1106-33
- Rakhimov D.A., Arifkhodzaef A.O., Dzhabarov A., Ismailov Z.F., 1980. Polysaccharides from representatives of the family Liliaceae. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*, 6:823-824
- Ramakrishna A., and Ravishankar G.A., 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal Behav*, 6(11):1720–1731
- Rampersaud G.C., and Valim M.F., 2017. 100% Citrus juice: Nutritional contribution, dietary benefits, and association with anthropometric measures. *Journal Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(1): 129-140
- Rapisarda P., Bellomo S.E., Fabroni S., and Russo G., 2008. Juice Quality of Two New Mandarin-like Hybrids (*Citrus clementina* Hort. ex Tan x *Citrus sinensis* L. Osbeck) Containing Anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.*, 56:2074–2078

- Rapisarda P., Tomaino A., Lo Cascio R., Bonina F., De Pasquale A., and Saija A., 1999. Antioxidant Effectiveness As Influenced by Phenolic Content of Fresh Orange Juices. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47(11):4718–4723
- Reaven G.M., 1988. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37, 1595–1607
- Reaven G.M., 2003. Insulin resistance/compensatory hyperinsulinemia, essential hypertension, and cardiovascular disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 88:2399–2403
- Reddy Y.S., Kiranmayi V.S., Bitla A.R., Krishna G.S., Srinivasa Rao P.V.L.N., and Sivakumar V., 2015. Nitric oxide status in patients with chronic kidney disease. *Indian J Nephrol.*, 25(5):287–291
- Renna M., Rinaldi V.A., Gonnella M., 2015. The Mediterranean Diet between traditional food and human health: the culinary example of Puglia (Southern Italy). *Int J Gastron Food Sci*, 2:63-1
- Reshef N, Hayari Y, Goren C, Boaz M, Madar Z, Knobler H, 2005. Antihypertensive effect of sweetie fruit in patients with stage I hypertension. *Hypertens A.J.*, 18 (10):1360-3
- Revathy J., Srinivasan S., Abdullah S.H.S., Muruganathan U. 2018. Antihyperglycemic effect of hesperetin, a Citrus flavonoid, extenuates hyperglycemia and exploring the potential role in antioxidant and antihyperlipidemic in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97:98-106
- Rexrode K.M., Carey V.J., Hennekens C.H., Walters E.E., Colditz G.A., Stampfer M.J., Willett W.C., Manson J.A.E., 1998. Abdominal Adiposity and Coronary Heart Disease in Women. *JAMA*, 280(21):1843–1848
- Reyes A.A., Karl I.E., Klahr S., 1994. Role of arginine in health and in renal disease. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 267(3):F331-F346
- Rimando A.M., and Perkins-Veazie P.M., 2005. Determination of Citrulline in watermelon rind. *J. Chromatograph.*, 1078:196-200
- Robert S-D., Ismail A.A., Winn T., Wolever T.M., 2008. Glycemic index of common Malaysian fruits. *Asia Pac J Clin Nutr.*, 17(1):35-9
- Rodríguez H., Gómez-Cordovés C., Curiel J. A., Mancheño J. M., Landete J. M., Rivas B. D. L. and Muñoz R., 2009. Food phenolics and lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 132:79-90
- Rothberg A.E., McEwen L.N., Kraftson A.T., Ajluni N., Fowler C.E., Nay C.K., Miller N.M., Burant C.F., Herman W.H., 2017. Impact of weight loss on waist circumference and the components of the metabolic syndrome. *BMJ Open Diabetes Research and Care*, 5:e000341
- Ruiz Rejón M., Pascual L., Ruiz Rejón C., Valdés B., and Oliver J. L., 1985. A new species of *Muscari* subgenus *Leopoldia* from the Iberian Peninsula. *Biochem. Syst. Ecol.*, 13:239–250
- Russo D., Bonomo M.G., Salzano G., Martelli G., Milella L., 2012. Nutraceutical properties of Citrus clementina juices. *PharmacologyOnline. Special Issue*, 1:84–93
- Ryo M., Nakamura T., Kihara S., Kumada M., Shibazaki S., Takahashi M., Nagai M., Matsuzawa Y., Funahashi T., 2004. Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. *Circ J.*, 68(11):975-81
- Sadek E.S., Makris D.P., Kefalas P., 2009. Polyphenolic composition and antioxidant characteristics of kumquat (*Fortunella margarita*) peel fractions. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 64:297-302
- Sahnoun M., Trabelsi S., Bejar S., 2017. Citrus flavonoids collectively dominate the α -amylase and α -glucosidase inhibitions. *Biologia*, 72(7)

- Samad F., and Ruf W., 2013. Inflammation, obesity, and thrombosis. *Blood*, 122:3415-3422
- Saraiva A.M., Saraiva C.L., Gonçalves A.M., Soares R.R., De Oliveira Mendes F., Pereira Cordeiro R., Xavier H.S., Caetano Pisciotto M.N., 2012. Antimicrobial activity and bioautographic study of antistaphylococcal components from *Caesalpinia pyramidalis* Tull. *Braz. J. Pharm. Sci.*, 48(1)
- Sasaki Y., Hosokawa T., Nagai M., Nagumo S., 2007. In vitro study for inhibition of NO production about constituents of *Sappan lignum*. *Biol Pharma Bull*, 30(1):193-196
- Sato K., Kinoshita M., Kojima M., Miyagawa K., Takase H., Suzuki S., and Dohi Y., 2000. Failure of L-arginine to induce hypotension in patients with a history of accelerated-malignant hypertension. *J. Hum. Hypertens.* 14:485–488
- Satta C., 2007. *Piante officinali spontanee di Sardegna*. Zonza Eds., Cagliari (Italia), p. 288
- Sayantani N., Sanjaya K.M., Sumita J., 2014. An improved method of genome size estimation by flow cytometry in five mucilaginous species of Hyacinthaceae. *Cytometric Measurements of Non-Mammalian Species*, 85(10):833–840
- Scherrer U., Randin D., Vollenweider P., Vollenweider L. and Nicod P., 1994. Nitric oxide release accounts for insulin's vascular effects in humans. *J. Clin. Invest.*, 94:2511–2515
- Schippers R.R., 2002. *African indigenous vegetables, an overview of the cultivated species*. University of Greenwich, Natural Resources Institute, London, UK (2000) 222 pp. ISBN 0 85954 515 6
- Scora R.W., 1975. On the history and origin of Citrus. *Bull. Torrey Bot. Club*, 102:369–375
- Sellami M., Louati H., Kamoun J., Kchaou A., Damak M., Gargouri Y., 2017. Inhibition of pancreatic lipase and amylase by extracts of different spices and plants. *Int J Food Sci Nutr.*, 68(3):313-320
- Shamloul R., Ghanem H., 2013. Erectile dysfunction. *Lancet*, 381:153–165
- Sharabi K., Tavares C.D., Rines A.K., Puigserver P., 2015. Molecular pathophysiology of hepatic glucose production. *Mol Aspects Med.*, 46:21-33
- Sharma S., 2011. First report on Laxative activity of *Citrullus lanatus*. *Pharmacology online*, 2:790-797
- Sheikh S., Noh J., Seong M.H., Jung G.T., Kim J.M., Ju H.J., Huh Y.C., 2013. Phenotypic markers for tetraploid watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. et Nakai] following parental exposure to colchicine in T0 generation. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* December, 54(6):524–530
- Shen W., Xu Y, Lu Y.H., 2012. Inhibitory effects of Citrus flavonoids on starch digestion and antihyperglycemic effects in HepG2 cells. *J Agric Food Chem.*, 2660(38):9609-19
- Shimada A., 2015. Antioxidant activity and lipase and alpha-glucosidase inhibitory activities of yuzu juice (*Citrus junos* Tanaka). *Journal of Yasuda Women's University*, 43:351–357
- Shin Y.W., Bok S.H., Jeong T.S., Bae K.H., Jeoung N.H., Choi M.S., Lee S.H., Park Y.B., 1999. Hypocholesterolemic effect of naringin associated with hepatic cholesterol regulating enzyme changes in rats. *Int J Vitam Nutr Res.*, 69:341–7
- Sica D.A., 2006. Interaction of grapefruit juice and calcium channel blockers. *Am. J. hypertens.*, 19:768-773
- Sidwell W.T.L., Tamm C., 1999. The homo-isoflavones II1). Isolation and structure of 4'-O-methyl-punctatin, autumnalin and 3,9-dihydro-autumnalin. *Tetrahedron Lett.*, 11:475–478

- Silva B.R., Pernomian L., Bendhack L.M., 2012. Contribution of oxidative stress to endothelial dysfunction in hypertension. *Front. Physiol.*, 3:441
- Soltis D.E., Soltis P.S., Bennett M.D., Leitch I.J., 2003. Evolution of genome size in the angiosperms. *Am. J. Bot.*, 90:1596–1603
- Sommella E., Pagano F., Pepe G., Ostacolo C., Manfra M., Chieppa M., Di Sanzo R., Carabetta S., Campiglia P., Russo M., 2017. Flavonoid Composition of Tarocco (*Citrus sinensis* L. Osbeck) Clone "Lempso" and Fast Antioxidant Activity Screening by DPPH-UHPLC-PDA-IT-TOF. *Phytochem Anal.*, 28(6):521-528
- Souza A., Lamidi M., Ibrahim B., Aworet Samseny R.R.R., Boukandou Mounanga M., Batchi B.M., 2011. Antihypertensive effect of an aqueous extract of *Citrus aurantifolia* (Rutaceae) (Christm.) Swingle, on the arterial blood pressure of mammal. *International Research of Pharmacy and Pharmacology*, 1(7):142-148 ISSN 2251-0176
- Speta F., 1982. Über die Abgrenzung und Gliederung der Gattung *Muscari*, und über ihre Beziehungen zu anderen Vertretern der *Hyacinthaceae*. *Bot. Jahrb. Syst.*, 103:247–291
- Speta F., 1989. *Muscari* (subg. *Leopoldia*) *mirum* Speta, spec. nova, im Kreise seiner nächsten Verwandten. *Phyton (Horn)*, 29:105–117
- Speta F., 1998. *Hyacinthaceae*. Chapter The families and genera of vascular plants III. Flowering Plants Monocotyledons Berlin, Heidelberg: Springer, Pp. 261–285
- Speta F., 1998. *Hyacinthaceae*. In: Kubitzki K, editor. The families and genera of vascular plants. Berlin: Springer-Verlag, 3:261–285
- Srikanthan K., Feyh A., Visweshwar H., Shapiro J.I., and Sodhi K., 2016. Systematic Review of Metabolic Syndrome Biomarkers: A Panel for Early Detection, Management, and Risk Stratification in the West Virginian Population
- Stedje B., 2001. Generic delimitation of *Hyacinthaceae*, with special emphasis on subSaharan genera. *Syst Geogr Plants*, 71:449–454
- Steinberg H.O., Brechtel G., Johnson A., Fineberg N., and Baron A.D., 1994. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J. Clin. Invest.*, 94:1172– 1179
- Stoll B., Henry J., Reeds P.J., Yu H., Jahoor F., and Burrin D.G., 1998. Catabolism dominates the first-pass intestinal metabolism of dietary essential amino acids in milk protein-fed piglets. *J. Nutr.*, 128:606-614
- Story E.N., Kopec R.E., Schwartz S.J., and Harris G.K., 2010. An Update on the Health Effects of Tomato Lycopene. *Annu Rev Food Sci Technol.*, 1:189-210
- Sugiyama H, Akazome Y, Shoji T, Yamaguchi A, Yasue M, Kanda T, Ohtake Y., 2007. Oligomeric procyanidins in apple polyphenol are main active components for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption. *J Agric Food Chem.*, 55(11):4604-9
- Sun Y., Chen J., Chen X., Huang L., Li X., 2013. Inhibition of cholinesterase and monoamine oxidase-B activity by Tacrine–Homoisoflavonoid hybrids *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(23):7406–741
- Susalit E., Agus N., Effendi I., Tjandrawinata R.R., Nofiarny D., Perrinjaquet-Mocchetti T., Verbruggen M., 2011. Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: comparison with Captopril. *Phytomedicine*, 18(4):251-8
- Sutherland F.J., and Hearse D.J., 2000. The Isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacol Res*, 41: 613-627

- Swapnil S., Sarvesh P., Jaya D., and Amita T., 2011. First report on laxative activity of *Citrullus lanatus*. *Pharmacologyonline*, 2:790-797
- Swift H., 1950. The constancy of deoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 36(11): 643–654
- Swingle W.T., Reece P.C., 1967. The botany of Citrus and its wild relatives. In: Reuther W., Webber H.J., Batchelor L.D., editors. *University of California Berkeley, (The Citrus Industry)*, 1:190–430
- Tabassum N., Ahmad F., 2011. Role of natural herbs in the treatment of hypertension. *Pharmacogn Rev.*, 5(9):30-40
- Tait S., Salvati A.L., Desideri N., Fiore L., 2006. Antiviral activity of substituted homoisoflavonoids on enteroviruses. *Antiviral Res.*, 72(3):252-5
- Tamm C., 1972. Homo-isoflavones, a new series of natural products. *Arzneim. Forsch.*, 22(10):1776-1784
- Tanaka T., 1977. Fundamental discussion of Citrus classification. *Stud. Citrologia*. 1977;14:1–6
- Tarazona-Díaz M.P., Alacid F., Carrasco M., Martínez I., and Aguayo E., 2013. Watermelon Juice: Potential Functional Drink for Sore Muscle Relief in Athletes. *J. Agric. Food Chem.*, 61(31):7522–7528
- Tardío J., Pardo-De-Santayana M., Morales R., 2006. Ethnobotanical review of wild edible plants in Spain. *Bot J Lin Soc.*, 152(1):27-71
- Taylor T.N., Taylor E., and Krings M., 2009. *Flowering Plants. Paleobotany (Second Edition) The Biology and Evolution of Fossil Plants*. pp. 873–997 ISBN 9780123739728
- Thies F., Mills L.M., Moir S. and Masson L.F., 2017. Cardiovascular benefits of lycopene: fantasy or reality? *Proceedings of the Nutrition Society*, 76:122–129
- Thirunavukkarasu P., Ramanathan T., Ravichandran N., Ramkumar L., 2010. Screening of antimicrobial effect in watermelon (*Citrullus sp.*). *J Biol Sci.*, 10(7):682-5
- Tian-yang W., Qing L., Kai-Shun B., 2017. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. Available online 15 August 2017 In Press, Corrected Proof
- Tizianello A., De Ferrari G., Garibotto G., Gurrei G., Robaudo C., 1980. Renal metabolism of amino acids and ammonia in subjects with normal renal function and in patients with chronic renal insufficiency. *J Clin Invest.*, 65:1162–1173
- Tlili I., Hdidier C., Lenucci M.S., Riadh I., Jebari H., and Dalessandro G., 2011. Bioactive compounds and antioxidant activities of different watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.)] cultivars as affected by fruit sampling area. *Journal Food Composition and Analysis*, 24(3):307–14
- Tomlinson P.B., *The Botany of Mangroves*. Cambridge University Press 978-1-107-08067-6
- Tripoli E., Guardia M.L., Giammanco S., Majo D.D., Giammanco M, 2007. Citrus flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties: a review. *Food Chem.* 104:466–79
- Tsuchiya H., Sato M., Miyazaki T., Fujiwara S., Tanigaki S., Ohyama M., Tanaka T., Inuma M., 1996. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol.*, 50:27–34
- Tutin T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Valentine, D.H., Walters, S.M., and Webb, D.A., (eds.), 1964–1980—*Flora Europaea*, 1–5. Cambridge University Press, Cambridge

- Tuzlaci E., Erol M., 1999. Turkish folk medicinal plants. Part II: Eğirdir (Isparta). *Fitoterapia*, 70(6):593-610
- Uddin N., Hasan R., Hossain M., Sarker A., Nazmul Hasan A.H.M, Mahmudul Islam A.F.M., Mohd. Chowdhury M.H. and Md. Rana S., 2014. In vitro α -amylase inhibitory activity and in vivo hypoglycemic effect of methanol extract of *Citrus macroptera* Montr. *Fruit Asian Pac J Trop Biomed.*, 4(6): 473–479
- Ugurlu E., Secmen O., 2008. Medicinal plants popularly used in the villages of Yunt Mountain (Manisa-Turkey). *Fitoterapia*, 79(2):126-31
- Uluturk Z.I., Frary A., and Doganlar S., 2011. Determination of genetic diversity in watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai] germplasm *AJCS* 5(13):1832-1836 ISSN:1835-2707
- Unlu N.Z., Bohn T., Clinton S.K., Schwartz S.J., 2005. Carotenoid absorption from salad and salsa by humans is enhanced by the addition of avocado or avocado oil. *J Nutr.* 135(3):431-6
- Usher G., 1974. A dictionary of plants used by man. Constable and Company Ltd
- Uttara B., Singh A.V., Zamboni P., and Mahajan R.T., 2009. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Curr Neuropharmacol*, 7(1): 65–74
- Vallejo F., Tomás-Barberán F. and García-Viguera C., 2003. Phenolic compound contents in edible parts of broccoli inflorescences after domestic cooking. *J. Sci. Food Agric.*, 83:1511–1516
- Van Acker F.A., Schouten O., Haenen G.R., Van der Vijgh W.J., Bast A., 2000. Flavonoids can replace alpha-tocopherol as an antioxidant. *FEBS Lett.*, 473:145–8
- Van der Vossen H.A.M., Denton O.A., and El Tahir I.M., 2004. *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. and Nakai. Record from Prota 4u. Grubben, G.J.H. and Denton, O.A. Prota (Plant Resources of Tropical Africa/Ressources végétales de l’Afrique tropicale), Wageningen, Netherlands.
- Virdis A., Taddei S., 2011. How to evaluate microvascular organ damage in hypertension: assessment of endothelial function. *High Blood Pressure Cardiovasc. Prev.*, 18:163–167
- Visscher T.L.S., and Seidell J.C., 2001. The Public Health Impact of Obesity Annual Review of Public Health, 22:355-375
- Vogiatzoglou A., Mulligan A., Lentjes M.A.H., Luben R.N., Spencer J.P.E., Schroeter H., Khaw K.T. and Kuhnle G.G.C., 2015. Flavonoid Intake in European Adults (18 to 64 Years) *PLoS One*, 10(5):e0128132
- Wada M. Über Citrullin, eine neue Aminosäure im Presssaft der Wassermelone, *Citrullus vulgaris* Schrad. *Biochem Z.* 1930224:420–429
- Wakabayashi Y., 1995. The glutamate crossway. In: *Amino Acid Metabolism and Therapy in Health and Nutritional Disease* (Cynober, L. A., ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 89–98
- Wakabayashi Y., Henslee J.G., Jones M.E., 1983. Pyrroline-5-carboxylate synthesis from glutamate by rat intestinal mucosa. Subcellular localization and temperature stability. *J Biol Chem.*, 258(6):3873-82
- Wakabayashi Y., Yamada E., Hasegawa T., Yamada R., 1991. Enzymological evidence for the indispensability of small intestine in the synthesis of arginine from glutamate. I. Pyrroline-5-carboxylate synthase. *Arch Biochem Biophys.*, 291(1):1-8
- Wall M.E., Wani M.C., Manikumar G., Taylor H., McGivney R., 1989. Plant antimutagens, 6. Intracatin and intricatinol, new antimutagenic homoisoflavonoids from *Hoffmanosseggia intricata*. *J Nat Prod.*, 52(4):774-8

- Walle T., Wen X., Walle U.K., 2007. Improving metabolic stability of cancer chemoprotective polyphenols. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.*, 3(3):379-88
- Wang H., Zhao X., Wang Y., Yin S., 2007. Potential toxicities of flavonoids. *Wei Sheng Yan Jiu.*, 36(5):640-2
- Wang T.Y., Li Q., Bi K.s., 2017. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. Available online 15 August 2017 In Press, Corrected Proof
- Wang Y., Sun Y., Guo Y., Wang Z., Huang L. and Li X., 2016. Dual functional cholinesterase and MAO inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: synthesis, pharmacological analysis and molecular modeling of homoisoflavonoid derivatives. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 31(3):389–397
- Wang Y.Z., Sun S.Q., Zhou Y.B., 2011. Extract of the dried heartwood of *Caesalpinia sappan* L. attenuates collagen-induced arthritis. *J Ethnopharmacol.*, 136(1):271-278
- Webber H.J., 1943. Cultivated varieties of Citrus. In: Webber HJ, Batchelor LD (eds) *The Citrus Industry*, University of California Press, Berkeley. 1:475–668
- Weng M.L., Ruhlman T.A., Gibby M., Jansen R.K., 2012. Phylogeny, rate variation, and genome size evolution of *Pelargonium* (Geraniaceae). *Mol Phylogenet Evol.*, 64(3):654-70
- Wenge L., Shengjie Z., Zhiqiang C., Xueshan W., Zhihong Y., King S.R., 2010. Lycopene and citrulline contents in watermelon (*Citrullus lanatus*) fruit with different ploidy and changes during fruit development. *Ishs Acta Horticulturae 871: Iv International Symposium On Cucurbits*
- Windmueller H.G., 1981. Spaeth AE. Source and fate of circulating citrulline. *Am J Physiol.*, 241(6): E473-80
- Windmueller H.G., Spaeth A.E., 1975. Intestinal metabolism of glutamine and glutamate from the lumen as compared to glutamine from blood. *Arch Biochem Biophys.* 171(2):662-72
- Wing R.E., 1996. Starch citrate: Preparation and ion exchange properties. *Starch*, 48:275–279
- Winkel-Shirley B., 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol.*, 5:218-23
- Wolfe K.H., Li W.H., Sharp P.M., 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 84(24):9054-8
- Wood M., 2008. *The Earthwise Herbal: A Complete Guide to Old World Medicinal Plants*. North Atlantic Books, pg 222. ISBN 9781556436925
- Woolfe M.L., Chaplin M.F., Otchere G., 1977. Studies on the mucilages extracted from okra fruits (*Hibiscus esculentus* L.) and baobab leaves (*Adansonia digitata* L.). *J Sci Food Agric.*, 28:519–529
- Wu G., 1996. An important role for pentose cycle in the synthesis of citrulline and proline from glutamine in porcine enterocytes. *Arch Biochem Biophys.*, 336(2):224-30
- Wu G., 1997. Synthesis of citrulline and arginine from proline in enterocytes of postnatal pigs. *Am J Physiol.* 272(6Pt1):G1382-90
- Wu G., 1997. Synthesis of citrulline and arginine from proline in enterocytes of postnatal pigs. *Am. J. Physiol.*, 272:G1382-G1390
- Wu G., 1998. Intestinal mucosal amino acid catabolism. *J. Nutr.* 128:1249-1252
- Wu G., and Morris S.M., 1998. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.* (1998) 336, 1±17 (Printed in Great Britain)

- Wu G., Knabe D.A., 1995. Arginine synthesis in enterocytes of neonatal pigs. *Am J Physiol.*, 269(3Pt2):R621-9
- Wu G., Knabe D.A., Yan W., Flynn N.E., 1995. Glutamine and glucose metabolism in enterocytes of the neonatal pig. *Am J Physiol.*, 268(2Pt2):R334-42
- Wu G.A., Prochnik S., Jenkins J., Salse J., Hellsten U., Murat F., Perrier X., Ruiz M., Scalabrin S., Terol J., Takita M.A., Labadie K., Poulain J., Couloux A., Jabbari K., Cattonaro F., Del Fabbro C., Pinosio S., Zuccolo A., Chapman J., Grimwood J., Tadeo F.R., Estornell L.H., Muñoz-Sanz J.V., Ibanez V., Herrero-Ortega A., Aleza P., Pérez-Pérez J., Ramón D., Brunel D., Luro F., Chen C., Farmerie W.G., Desany B., Kodira C., Mohiuddin M., Harkins T., Fredrikson K., Burns P., Lomsadze A., Borodovsky M., Reforgiato G., Freitas-Astúa J., Quetier F., Navarro L., Roose M., Wincker P., Schmutz J., Morgante M., Machado M.A., Talon M., Jaillon O., Ollitrault P., Gmitter F., and Rokhsar D., 2014. Show fewer authors. Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during Citrus domestication. *Nature Biotechnology*, 32:656–662
- Xianquan S., Shi J., Kakuda Y., and Yueming J., 2005. Stability of Lycopene During Food Processing and Storage. *Journal of Medicinal Food*. 8(4):413-422
- Xie Y.W., Ming D.S., Xu H.X., Dong H., But P.P.H., 2000. Vasorelaxing effects of *Caesalpinia sappan* involvement of endogenous nitric oxide. *Life Sci*, 67(15): 1913-1918
- Xiong X., Jiang J., Duan J., Xie Y., Wang J. Zhai S., 2014. Development and Validation of a Sensitive Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Method for the Determination of Naringin and Its Metabolite, Naringenin, in Human *Journal of Chromatographic Science*, 52(7):654–660
- Xu Q., Chen L.L., Ruan X., Chen D., Zhu A., Chen C., Bertrand D., Jiao W.B., Hao B.H., Lyon M.P., Chen J., Gao S., Xing F., Lan H., Chang J.W., Ge X., Lei Y., Hu Q., Miao Y., Wang L., Xiao S., Biswas M.K., Zeng W., Guo F., Cao H., Yang X., Xu X.W., Cheng Y.J., Xu J., Liu J.H., Luo O.J., Tang Z., Guo W.W., Kuang H., Zhang H.Y., Roose M.L., Nagarajan N., Deng X.X., Ruan Y., 2013. The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Nat Genet.*, 45(1):59-66
- Yadav R.N.S., and Agarwala M., 2011. Phytochemical Analysis of Some Medicinal Plants. *Journal of Phytology*, 3:10-14
- Yamaguchi M., 1983. *World Vegetables: Principles, Production and Nutritive values*: West port, Conn, 1983
- Yamamoto M., Jokura H., Suzuki A., Hase T., Shimotoyodome A., 2013. Effects of continuous ingestion of hesperidin and glucosyl hesperidin on vascular gene expression in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 59(5):470-3
- Yan J., Sun L.R., Zhou Z.Y., Chen Y.C., Zhang W.M., Dai H.F., Tan J.W., 2012. Homoisoflavonoids from the medicinal plant *Portulaca oleracea*. *Phytochemistry*, 80:37-41
- Yeoh H.H., Wong F.M., Lin G., 1986. Screening for fungal lipases using chromogenic lipid substrates. *Mycologia*, 78:298
- Yi-Bin L., Yi-Ping Q., Lin-Tong Y., Jinwook L., Peng G., Xin Y., Meng-Yang J., Mei-L.L., and Li-Song C., 2015. Long-term boron-deficiency-responsive genes revealed by cDNA-AFLP differ between *Citrus sinensis* roots and leaves. *Front. Plant Sci*, 6:585
- Yildirim H., 2016. *Muscari elmasii* sp. nova (Asparagaceae). A new species from western Anatolia, Turkey. *Turkish J. Bot.*, 40: 380-387
- Yo A., Sharma P.K., Shrivastava B., Ojha S., Upadhyaya H.M., Arya D.S., Goyal S.N. 2014. Hesperidin produces cardioprotective activity via PPAR- γ pathway in ischemic heart disease model in diabetic rats. *PLoS One*, 9:e111212

- Yo A., Sharma P.K., Shrivastava B., Ojha S., Upadhyaya H.M., Arya D.S., Goyal S.N. 2014. Hesperidin produces cardioprotective activity via PPAR- γ pathway in ischemic heart disease model in diabetic rats. *PLoS One*. 9(11):e111212
- Yoon S., Assimes T.L., Quertermous T., Hsiao C.F., Chuang L.M., Hwu C.M., et al. 2014. Insulin resistance: regression and clustering. *PLoS ONE*, 9:e94129
- Yoshida H., Tsubako R., Atsumi T., Narumi K., Watanabe W., Sugita C., Kurokawa M., 2017. Naringenin interferes with the anti-diabetic actions of pioglitazone via pharmacodynamic interactions. *Journal of Natural Medicines*. 71(2):442–448
- Yuan G, Wahlqvist M.L., He G., Yang M., Li D., 2006. Natural products and anti-inflammatory activity. *Asian Pac J Clin Nutr*. 2006 15(2):143-52
- Zeng C., Han Y., Huang H., Yu C., Ren H., Shi W., He D., Huang L., Yang C., Wang X., Zhou L., and Jose P.A., 2009. D₁-like receptors inhibit insulin-induced vascular smooth muscle cell proliferation via down-regulation of insulin receptor expression. *J Hypertens.*, 27(5):1033-41
- Zhang H., Yang F., Q. J., Song X.C., Hu Z.F., Zhu D.N., Yu B.Y., 2010. Homoisoflavonoids from the fibrous roots of *Polygonatum odoratum* with glucose uptake-stimulatory activity in 3T3-L1 adipocytes. *J. Nat. Prod.*, 73:548-552
- Zhang W., Wang S.Y., 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agri Food Chem*. 200149:5165–5170
- Zhao J.W., Chen D.S., Deng C.S., Wang Q., Zhu W. And Lin L., 2017. Evaluation of anti-inflammatory activity of compounds isolated from the rhizome of *Ophiopogon japonicus*. *BMC Complement Altern Med*. 17:7
- Zhao W., Lv P., Gu H., 2013. Studies on carotenoids in watermelon flesh *Agricultural Sciences Vol.4, No.7A, 13-20, 2013*
- ZhiQiang C., WenGe L., Yun D., ShengJie Z., ZhiHong Y., Nan H., 2010. Extraction and determination of L-citrulline in watermelon fruits. *Journal of Fruit Science*, 27(4):650-654 ref.10
- Zohary D., and Hopf M., 2000. *Domestication of Plants in the Old World*. Oxford, UK: Oxford University Press 2000
- Zonneveld B.J.M., 2001. Nuclear DNA contents of all species of *Helleborus* (Ranunculaceae) discriminate between species and sectional divisions. *Plant Syst Evol*, 229:125– 130
- Zou Z., Xi W., Hu Y., Nie C., Zhou Z., 2016. Antioxidant activity of Citrus fruits. *Food Chemistry*, 196:885-896.