



# PROPRIETÀ TERAPEUTICHE DEI LIGNANI: UN FOCUS SUI LIGNANI DELL'OLIO D'OLIVA

Foto di S. Del Moro

*Oltre agli acidi grassi, che sono peculiari nella sua composizione, l'olio di oliva contiene diverse altre sostanze che ne determinano le sue importanti proprietà biologiche. Tra queste i lignani, oggetto di diversi studi relativi alle attività antiossidante, antinfiammatoria, antitumorale e antimicotica, che si possono sviluppare nell'organismo dopo la conversione in enterolignani operata del microbiota intestinale.*



\* **Valerio Mambretti**  
 \* **Lorenzo Cecchi**  
 \* **Nadia Mulinacci**

**L'**olio d'oliva è un componente imprescindibile della Dieta Mediterranea, poiché contribuisce al fabbisogno giornaliero di acidi grassi essenziali e di sostanze fenoliche antiossidanti, che hanno un effetto benefico nel contrastare disturbi cronico-degenerativi come le malattie infiammatorie, cardiovascolari e il cancro. L'attività antiossidante dei composti fenolici è alla base della loro attività antitumorale.

I possibili effetti benefici dei lignani dipendono principalmente dalla loro conversione a enterolignani da parte della flora batterica intestinale. Da un punto di vista farmacologico si possono considerare dei pro-drug, che possono avere un'azione antiossidante, antitumorale, antinfiammatoria e antifungina.

Diversi studi scientifici descrivono i benefici legati al consumo di lignani e di olio d'oliva (López-Biedma *et al.*, 2016); pertanto (+)-pinoresinolo e (+)-1-acetospinoresinolo sono molto interessanti per le loro proprietà

nutraceutiche. Le informazioni su questi due lignani sono spesso ambigue e diverse, e per questo è necessario, da un lato raccogliere e sintetizzare le informazioni presenti in letteratura in merito alle proprietà di questi due lignani, dall'altro effettuare ulteriori studi al fine di chiarire le ambiguità sulle proprietà biologiche dei lignani dell'olio d'oliva.

In questa sede si riportano le principali potenzialità terapeutiche dei lignani a oggi descritte in letteratura, tenendo anche conto del fatto che recentemente è stata descritta una possibile proprietà negativa del pinoresinolo, legata a un suo possibile effetto avverso nell'assorbimento della vitamina D (Goncalves *et al.*, 2016).

### Metabolismo e biodisponibilità dei lignani

I lignani di *Olea europaea* L. sono abbastanza stabili nelle condizioni di digestione gastrica e duodenale, come dimostrato in modelli *in vitro*. Successivamente, superata la barriera gastrico-duodenale, possono essere metabolizzati dalla flora batterica del colon a enterolignani (*mammalian lignans*) come, per esempio, l'enterodiolo.

Per quanto riguarda il pinoresinolo, sono riportati studi *in vitro* sulla microflora fecale umana, che mostrano come la sua trasformazione a enterolignano è approssimativamente pari al 55%. L'enterodiolo può essere a sua volta convertito a enterolattone; non a caso l'uso di antibiotici ha come

effetto collaterale quello di ridurre i livelli sierici di enterolattone. Pertanto, i livelli sierici e urinari di enterolattone riflettono l'attività dei batteri intestinali e possono essere utilizzati come marcatori dell'attività dei batteri della flora intestinale.

Uno studio farmacocinetico condotto sull'uomo ha mostrato che dopo una singola dose di secoisolariciresinolo (0,9 mg/kg di peso corporeo), il 40% del secoisolariciresinolo assunto era biodisponibile sottoforma di enterodiolo ed enterolattone. Le concentrazioni plasmatiche di enterodiolo hanno raggiunto un picco di 73 nmol/L dopo una media di 15 ore dall'ingestione di secoisolariciresinolo, mentre quelle di enterolattone hanno raggiunto un picco di 56 nmol/L dopo 20 ore.

Evidenze suggeriscono che alcuni individui convertano più enterodiolo, in funzione della composizione della loro flora microbica intestinale. È quindi probabile che le differenze individuali nel metabolismo dei lignani, a causa della microflora intestinale, influenzino le attività biologiche e conseguentemente gli effetti di questi composti sulla salute. Inoltre, non va trascurato che fattori quali fumo e obesità, possono influenzare i livelli di lignani in circolo.

L'accessibilità dei lignani a livello delle cellule tumorali è stata valutata mediante studi isotopici marcando con il trizio il secoisolariciresinolo diglucoside; il 92% dei tessuti tumorali nei topi, cui era

- Produzione saponette vegetali 100% personalizzate per erboristerie, profumerie, farmacie
- Saponette da Hotel
- Produzione di cosmetici
- Lavorazione c/o terzi

**ALCHIMIA SOAP**  
SRL



**Alchimia Soap Srl**  
 Via Mantova, 5  
 21057 Olgiate Olona (VA)  
 Tel.: 0331631582  
 Fax: 0331674574  
 www.alchimiasoap.it  
 soap@alchimiasoap.it



LIGNANO	PM (g/mol)	Fonti edibili	Riferimenti bibliografici
(+)-PINORESINOLO	358,39	Olio d'oliva Semi di sesamo Brassicacee	<a href="http://phenol-explorer.eu/classifications/compounds/21/22">http://phenol-explorer.eu/classifications/compounds/21/22</a>
(+)-1-ACETOSSIPINORESINOLO	416,42	Olio d'oliva	<a href="http://phenol-explorer.eu/classifications/compounds/21/22">http://phenol-explorer.eu/classifications/compounds/21/22</a>
(+)-1-IDROSSIPINORESINOLO	374,39	Olio d'oliva	Ballus et al. 2015
(+)-SIRINGARESINOLO	418,44	<u>Segale</u> Avocado Sesmi di sesamo Olio d'oliva	<a href="http://phenol-explorer.eu/classifications/compounds/21/22">http://phenol-explorer.eu/classifications/compounds/21/22</a> Ballus et al. 2015
SESAMINA	354,36	Semi di sesamo	<a href="http://phenol-explorer.eu/classifications/compounds/21/22">http://phenol-explorer.eu/classifications/compounds/21/22</a>
MATAIRESINOLO	358,39	<u>Semi di sesamo</u> <u>Semi di lino</u> Uva (frutto secco) Ananas	<a href="http://phenol-explorer.eu/classifications/compounds/21/22">http://phenol-explorer.eu/classifications/compounds/21/22</a>
SECOISOLARICIRESINOLO	362,42	<u>Semi di lino</u> Anacardi Kiwi Uva Fichi, datteri Albicocche, prugne Frutti di bosco Ananas, melograno Semi di lino Aglione, basilico Soia Cavolo	<a href="http://phenol-explorer.eu/classifications/compounds/21/22">http://phenol-explorer.eu/classifications/compounds/21/22</a>
LARICIRESINOLO	360,41	<u>Broccoli</u> <u>Anacardi</u> Fagioli verdi Aglione fresco Olio d'oliva	<a href="http://phenol-explorer.eu/classifications/compounds/21/22">http://phenol-explorer.eu/classifications/compounds/21/22</a>

Tabella 1. Per ogni lignano sono riportati: i) il peso molecolare; ii) le fonti edibili, con le principali sottolineate; iii) la fonte bibliografica

somministrato il lignano marcato, è risultato radioattivo. Per quanto riguarda i lignani dell'olio d'oliva, (+)-pinoresinolo e (+)-1-acetossipinoresinolo, esistono poche informazioni riguardanti la loro biodisponibilità nei tessuti e negli organi quando non sono metabolizzati a enterolignani.

Sulla base della resistenza alle condizioni digestive e alla lipofilia dei lignani di *Olea europaea* L., è stato ipotizzato che una buona parte di essi è assorbita a livello del tessuto adiposo mammario. Per questa ragione sono degli ottimi candidati alla prevenzione del carcinoma mammario. Inoltre, la

restante parte non assorbita rimane nell'intestino, dove esercita un'azione preventiva contro il cancro colon-rettale (CRC).

In un altro studio è stato notato un assorbimento di circa il 50% di (+)-pinoresinolo da parte delle cellule tumorali mammarie JIMT-1 tra le 2 e le 24 h dopo l'assunzione, mentre l'assorbimento di (+)-1-acetossipinoresinolo era già circa al 40% dopo un 1 h dall'assunzione.

D'altra parte, in una ricerca è stato mostrato che le cellule tumorali del colon retto Caco-2, dopo 4 ore di esposizione a una concentrazione di 40 µM di (+)-pi-

noresinolo, ne avevano assorbito solo il 2%, di cui il 75% in forma coniugata.

Lo studio ha dimostrato che il pinoresinolo viene internalizzato o per gradiente di concentrazione con un meccanismo di diffusione semplice o mediante un trasportatore a bassa affinità. Dato che il trasportatore per il (+)-pinoresinolo è aspecifico, questo suggerisce che il lignano potrebbe essere assorbito anche da altri tipi cellulari nei quali potrebbe esercitare altri effetti biologici.

In letteratura è riportato che i lignani sono presenti nel plasma in concentrazioni nanomolari, ma non si possono escludere fenomeni di bioaccumulo.

Non sono da escludere interazioni tra lignani e alcuni alimenti come proteine, fibre, grassi e alcol, che potrebbero avere un effetto sul loro assorbimento, emivita plasmatica ed eliminazione.

Tuttavia, non è stato ancora sufficientemente chiarito come i lignani vengano internalizzati all'interno delle cellule target, e pertanto sono necessari e auspicabili ulteriori indagini scientifiche.

Per quanto riguarda l'apporto giornaliero dei lignani presenti nell'olio d'oliva, uno studio riporta i valori di pinoresinolo: Olanda, 312 µg/die; Francia, 422; Canada, 107; Finlandia, 442.

Per queste popolazioni, le principali fonti stimate di pinoresinolo sono grano integrale, segale, caffè, the, frutti di bosco, verdure e frutta.

Ovviamente, si può dedurre che nelle popolazioni che seguono la Dieta Mediterranea, ricca di olio d'oliva, l'apporto di pinoresinolo sia maggiore. Inoltre, queste popolazioni avranno anche apporti significativi di acetossipinoresinolo (Lopez-Biedma *et al.*, 2016).

In tabella 1 sono riassunte le principali fonti edibili dei lignani e i loro pesi molecolari.



## Proprietà antiossidanti e antinfiammatorie dei lignani

I fenoli dell'olio d'oliva esercitano un effetto protettivo perché contrastano l'azione delle ROS, specie reattive dell'ossigeno, quali l'anione superossido ( $O_2^-$ ), il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) e il radicale ossidrilico ( $OH\cdot$ ). I fenoli degli oli vergini d'oliva agiscono come antiossidanti di tipo I, ossidandosi al posto dell'alimento: essi inattivano i radicali alchilperossidi generati dall'autossidazione lipidica donando un radicale idrogeno ai radicali alchilperossidi ( $ROO\cdot$ ); in questa maniera si ottengono come prodotti un radicale molto meno reattivo derivante dal composto fenolico (idrochinone radicale) e un acido grasso derivante dal radicale alchilperossido di partenza. L'idrochinone radicale, a sua volta, reagisce con un altro radicale alchilperossido, formando un'altra molecola di acido grasso e un chinone, prodotto finale di ossidazione del fenolo di partenza. Una molecola fenolica riesce così a spegnere due molecole radicaliche (figura 1). In tal modo, ossidandosi al po-

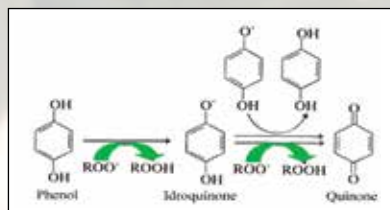


Figura 1. Meccanismo antiossidante dei fenoli

sto degli acidi grassi con meccanismo di spazzini di radicali liberi, i composti fenolici contribuiscono a preservare l'olio di oliva dai processi degradativi e dall'irrandimento ossidativo.

Alla stessa maniera, i composti fenolici possono funzionare come antiossidanti anche a livello delle cellule del corpo umano.

Tra le sostanze più suscettibili all'ossidazione provocata dai

ROS ricordiamo gli acidi grassi delle membrane cellulari e delle lipoproteine (LDL), le proteine, i peptidi e gli amminoacidi di natura enzimatica, le basi azotate che formano il DNA e l'RNA.

Nello specifico, le LDL ossidate non sono più in grado di svolgere il loro ruolo nel trasporto del colesterolo e quindi si accumulano all'interno dei vasi sanguigni, determinando la formazione di placche aterosclerotiche. Invece, i danni ossidativi subiti dal DNA sono spesso coinvolti nei processi di carcinogenesi. I ROS sono coinvolti nei processi infiammatori intestinali come la colite ulcerosa: in questo caso il danno all'intestino è causato da un'iperproduzione di ROS da parte dei linfociti che si accumulano sulla parete dell'epitelio intestinale. La produzione delle specie reattive dell'ossigeno è implicata anche nel ciclo della cicloossigenasi (COX 2), che causa la produzione di diversi fattori flogistici come *IL1* e *TNF-α*. Questi sono a loro volta responsabili di processi infiammatori, come la colite ulcerosa e alcuni tipi di tumore.

Esiste una relazione tra lo stress ossidativo e i processi di invecchiamento: l'organismo, dovendo produrre energia, produce inevitabilmente ROS durante tutto l'arco della vita causando così l'invecchiamento. Studi condotti sui ratti hanno confermato questa relazione; infatti, si è notato che l'attività antiossidante della superossido dismutasi è fortemente aumentata negli individui anziani rispetto a quelli giovani.

Poiché l'iperproduzione dei ROS provoca gravi danni all'organismo umano, questo si difende da un lato con gli antiossidanti endogeni, e dall'altro con quelli esogeni, ovvero quelli assunti con la dieta. Da ciò si evince che per incrementare l'assunzione di antiossidanti, è opportuno seguire

una dieta bilanciata come quella Mediterranea. Per tale ragione i cibi ricchi di composti antiossidanti come frutta, verdura e olio di oliva, hanno ottenuto una particolare attenzione da parte della comunità scientifica.

I danni ossidativi sono più accentuati in soggetti anziani; al contrario, l'adesione alla Dieta Mediterranea aiuta a prevenire malattie neurodegenerative come l'Alzheimer e il Parkinson. L'olio di oliva vergine sembra essere uno dei principali fattori dietetici nella prevenzione della demenza senile; la somministrazione di olio di oliva ha mostrato anche di contrastare i danni provocati dalle radiazioni UV a carico dell'epidermide e di essere un fattore chemopreventivo nel cancro del colon-retto. Come già detto, i composti fenolici riducono la perossidazione delle LDL e l'aggregazione piastrinica, che causano la formazione delle placche aterosclerotiche. In particolare l'idrossitiroso inibisce l'enzima cicloossigenasi, limitando così l'aggregazione piastrinica. Inoltre, i composti fenolici contrastano l'ossidazione delle basi azotate del DNA dovuta al perossido nitrico, la produzione dei radicali liberi nei tumori intestinali, e provocano l'inibizione dei processi infiammatori in modelli animali. Per quanto riguarda i lignani dell'olio d'oliva, l'attività antiradicalica dell'acetossipinorezinolo è stata testata in maniera limitata. Infatti, questa molecola non è disponibile come standard, e il suo isolamento o sintesi sono difficoltose. Il (+)-1-acetossipinorezinolo ha mostrato una buona attività antiradicalica rispetto a molecole come l'acido caffeico, l'idrossitiroso e l'oleuropeina. Le proprietà antiradicaliche dei lignani dell'olio d'oliva sono state valutate attraverso il metodo del DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhy-



drazyl); i lignani dell'olio d'oliva si sono mostrati entrambi agenti antiossidanti, ma il (+)-pinoresinolo presenta una maggiore attività rispetto al (+)-1-acetossipinoresinolo, forse a causa del gruppo  $-COOCH_3$ , che non è un elettrondonatore.

Secondo gli autori della ricerca, questa differenza strutturale potrebbe spiegare il minore effetto antiossidante del (+)-1-acetossipinoresinolo nel metodo DPPH. L'attività antiossidante dei lignani dell'olio d'oliva con il metodo DPPH è stata misurata anche in altre ricerche, con risultati non sempre in accordo fra loro, come mostrato in tabella 2.

lignani potrebbero essere impiegati nella prevenzione dell'aterosclerosi e nelle patologie cardiovascolari.

Inoltre, il (+)-pinoresinolo possiede attività antinfiammatoria che si esplica nell'inibizione della formazione del monossido d'azoto (NO) e della prostaglandina E2 (PGE2), come è stato osservato in modelli murini.

L'azione antinfiammatoria del (+)-pinoresinolo è stata descritta anche nelle cellule della microglia dei ratti in cui si assisteva all'inibizione di altri mediatori flogistici come la COX-2, il TNF- $\alpha$ , l'IL1- $\beta$  e l'IL-6.

Infine, è stato osservato un decre-

• La fase di iniziazione, rapida e irreversibile, è avviata da fattori fisici e chimici che provocano alterazioni del DNA cellulare. Agenti fisici, come le radiazioni ionizzanti, possono agire aumentando la produzione di ROS o danneggiando le basi azotate del DNA, con conseguente modifica dei livelli di espressione dei geni onco-soppressori (come la proteina P-53) e proto-oncogeni. I fattori chimici includono invece agenti alchilanti, nitrosammine e grassi polinsaturi che possono danneggiare l'estremità ammino-terminale dei residui di guanina del DNA.

• La promozione, fase lenta, ripetitiva e reversibile, è modulata dall'attivazione dei recettori per i fattori di crescita, e conduce alla formazione del tessuto neoplastico, con aumento dell'angiogenesi e della degradazione della matrice extracellulare.

• Infine, durante la fase di progressione, le cellule tumorali acquisiscono la capacità di diffondere e di attecchire in tessuti lontani dalla sede di origine, con formazione delle metastasi.

Le mutazioni a carico dei proto-oncogeni possono portare alla formazione di oncogeni e, insieme a mutazioni degli oncosoppressori, sono alla base della cancerogenesi. Gli oncogeni codificano per proteine (fattori di crescita) che promuovono la crescita e la mitosi delle cellule tumorali; viceversa i geni soppressori del tumore impediscono la divisione cellulare permettendo la riparazione del DNA. Tra le proteine codificate dagli oncogeni abbiamo per esempio il fattore di crescita piastrinico (PDGF), i recettori per i fattori di crescita endoteliali (per esempio EGF), le proteine chinasi, e le proteine nucleari che regolano il ciclo cellulare, come cicline fra cui quelle chinasi dipendenti. Le mutazioni degli oncosoppressori

Composto	Analisi	IC50	Riferimenti
(+)-pinoresinolo	DPPH	24,16 $\mu$ M	Kang & Wang, 2010
	DPPH	34,50 $\mu$ M	Kuo et al, 2011
	DPPH	96,82 $\mu$ M	Chin et al., 2008
	DPPH	558,00 $\mu$ M	Yi et al., 2011
	ABTS	8,60 $\mu$ M	Kang & Wang, 2010
	ABTS	153,46 $\mu$ M	Yi et al., 2011
1-acetossipinoresinolo	ABTS	5,00 $\mu$ M	Koch et al., 2015
	Ipoxantina/xantina ossidasi	0,91 $\mu$ M	Owen et al., 2000

Tabella 2. Attività antiradicalica del (+)-pinoresinolo e del (+)-1-acetossipinoresinolo (Lopez-Biedma et al., 2016)

La tabella riporta anche i risultati di test effettuati con il metodo ABTS sul pinoresinolo con risultati anche in questo caso contrastanti.

In un esperimento effettuato con un test di invecchiamento accelerato (OSI, *Oil Stability Index*) è stato evidenziato un effetto pro-ossidante dei due lignani, in contrasto con le proprietà antiossidanti ed è stato ipotizzato che ciò sia dovuto alle condizioni termiche dell'esperimento che causerebbero l'apertura degli anelli ossigenati (Lopez-Biedma et al., 2016).

Alcuni studi hanno dimostrato che il (+)-pinoresinolo inibisce la perossidazione delle LDL indotta dal  $CuSO_4$  attraverso un effetto concentrazione dipendente tra 0,1 M a 10 M. Per tale ragione, i

mento dei livelli di IL-6 e PGE2 in linee cellulari umane di adenocarcinoma del colon. Questi autori hanno associato l'attività antinfiammatoria del (+)-pinoresinolo alla sua struttura furofuranica, dato che altri lignani privi di tale struttura non hanno prodotto questo effetto.

Pertanto, il (+)-pinoresinolo potrebbe essere un potenziale candidato per il trattamento di patologie infiammatorie dovute all'iperproduzione di radicali liberi, in particolare nel colon.

### Potenzialità dei lignani nel ridurre il rischio oncologico

La cancerogenesi è un processo suddiviso in tre fasi distinte: l'iniziazione, la promozione e la progressione.



sori portano invece alla perdita o all'inattivazione di proteine che esercitano un controllo inibitorio sul ciclo cellulare e che promuovono l'apoptosi, quali per esempio la proteina p53. Come conseguenza dell'accumulo di queste mutazioni verrà aumentata la trascrizione degli oncogeni e ridotta quella degli oncosoppressori.

Il ruolo chiave della p53 nella prevenzione dei tumori è quello di indurre l'arresto del ciclo cellulare e di attivare l'apoptosi nelle cellule che presentano un danno al DNA. Per questo motivo è stata definita il "guardiano dell'integrità" del genoma cellulare.

In seguito a un danno del DNA i livelli di espressione della p53 aumentano; essa viene fosforilata da parte di specifiche chinasi (per esempio ATM), migra nel nucleo e attiva la trascrizione dei geni che controllano la proliferazione cellulare e l'apoptosi.

Il ciclo cellulare (figura 2) è una

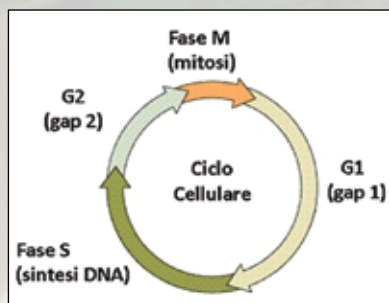


Figura 2. Fasi del ciclo cellulare

successione ordinata di eventi che permettono a una cellula di duplicarsi dando origine a due cellule figlie. Si distinguono 4 stadi:

- la G1, caratterizzata dall'aumento della sintesi di RNA e proteine;
- la S in cui si ha la duplicazione di tutto il DNA cellulare;
- la G2, in cui si completa la duplicazione del DNA e sono sintetizzate le proteine utili per la mitosi;
- la mitosi, o fase M, in cui si ha la divisione nucleare e citoplas-

matica. La corretta progressione del ciclo cellulare è regolata dalla fosforilazione e defosforilazione dei complessi cicline/chinasi ciclina-dipendenti (CDK) in corrispondenza di punti di controllo, localizzati a livello delle transizioni G1/S e G2/M.

I lignani degli oli vergini di oliva si sono dimostrati efficaci nel bloccare alcune fasi del ciclo cellulare di cellule tumorali e nel ridurre la proliferazione cellulare inducendo l'arresto in fase G2/M e l'apoptosi nelle cellule di cancro al colon RKO e HCT116 con l'asse p53 attivo (Fini *et al.* 2008).

La sesamina, lignano presente

nell'olio di sesamo, ha indotto l'arresto della crescita in cellule di cancro alla mammella MCF-7 bloccando la corretta progressione del ciclo cellulare in fase G1. Alla luce dei risultati ottenuti sembra quindi che i lignani siano dei possibili candidati nella prevenzione tumorale. Essi inibiscono lo sviluppo di vari tipi di tumore: cutaneo, mammario, del colon-retto, della prostata e del polmone. Negli animali, la somministrazione di semi di lino, che sono una notevole fonte di lignani, previene l'insorgenza del carcinoma mammario.

I lignani dal punto di vista far-

royalnature®  
 superalimenti  
 naturali  
 vegani  
 biologici

## Superalimenti Royal Nature, cibo verde quotidiano.



GREEN MAGMA



FINO AL 30.09.2017  
 ACQUISTA ON-LINE  
 CON IL 15% DI SCONTO  
 USANDO IL CODICE:  
 NAT12017

[www.royalnature.it](http://www.royalnature.it)

Ci trovi allo Stand 5 del Padiglione 16 (VeganFest) del SANA - Bologna 08 -11 Settembre 2017



	EVOO-A EVOO-B	
3,4-DHPEA-EDA	n.r.	22,4
p-HPEA-EDA (oleocantale)	6,0	35,0
3,4-DHPEA-EA	16,4	16,5
p-HPEA-EA	15,6	7,5
Pinoresinolo	62,0	18,6

Tabella 3. Composizione fenolica di EVOO-A e EVOO-B, (Fini et al., 2008).

macologico possono essere considerati fitoestrogeni o composti simil-estrogenici, la cui azione è mediata dal legame con i recettori per gli estrogeni ER  $\alpha$  e  $\beta$ . L'incidenza di tumori e malattie cardiovascolari è minore nei paesi del Mediterraneo, con una dieta

basata su alimenti vegetali ricchi di fitoestrogeni come lignani e isoflavoni, che sono più abbondanti nel sangue e nelle urine di soggetti che vivono in aree con bassa incidenza di cancro.

L'effetto antitumorale dei lignani si basa sia sulla loro attività antiossidante, sia sulla somiglianza strutturale con l'estradiolo e il tamoxifene (anti-estrogeno sintetico). Questo indica inoltre che, dipendentemente dalla dose, i lignani possano agire, in parte, come anti-estrogeni.

Elevati livelli plasmatici di enterolignani sono stati associati all'inibizione della carcinogenesi mammaria nei ratti, dove sono in grado di inibire la sintesi di estradiolo nella placenta e nel tessuto adiposo, nonché la proliferazione di cellule tumorali mammarie estrogeno dipendenti, e di aumentare i livelli sierici di globuline leganti gli steroidi sessuali (più avanti indicate con la sigla SSBG dalla denominazione inglese "Sex Steroid-Binding Globulin"), con conseguente riduzione dei livelli biologicamente attivi di estrogeni liberi.

Alcuni di questi effetti sono particolarmente importanti nella patogenesi del carcinoma mammario nelle donne obese. In obesità, i livelli di SSBG sono ridotti, con conseguente aumento dei livelli plasmatici di estrogeni liberi.

Le cellule mammarie, che sono tipicamente ormono-sensibili, sono costantemente esposte all'azione di elevate quantità di estrogeni. Quindi, l'inibizione esercitata dai lignani sulla sintesi di estrogeni nel tessuto adiposo è fondamentale nella prevenzione del cancro al seno nelle donne obese; infatti il tessuto adiposo non è solo un tessuto energetico e di deposito, ma svolge anche una funzione endocrina importante, poiché raccoglie e metabolizza ormoni steroidei e converte l'androstenedione in estrone (E1) e il testosterone in 17- $\beta$ -estradiolo (E2). L'effetto antitumorale dei lignani è quindi probabilmente dovuto alla loro azione sul metabolismo degli estrogeni.

Come già accennato in precedenza, un recente studio ha determinato i meccanismi alla base degli effetti antitumorali di composti fenolici contenuti in due diverse varietà di olio extravergine di oliva (EVOO) su modelli *in vitro* di cellule di cancro colon-rettale (CRC) (Fini et al., 2008).

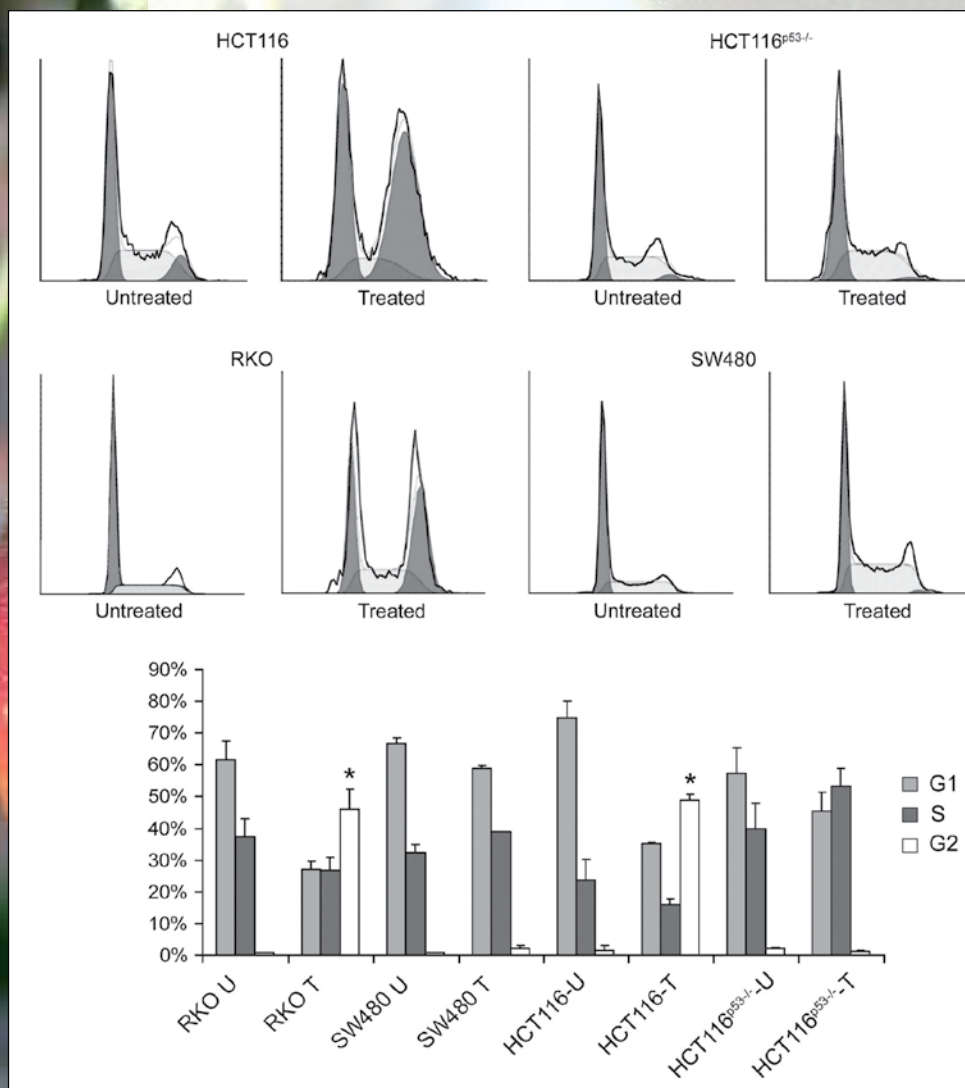


Figura 3. Analisi del ciclo cellulare di cellule CRC trattate con EVOO-A e controlli non trattati. Un arresto significativo nella fase G 2/M è stato dimostrato nelle linee cellulari RKO e HCT116 dopo il trattamento con pinoselinolo. Non è stato evidenziato nessun cambiamento significativo in quelle cellule con la p53 assente in risposta al trattamento con l'EVOO-A.



Il CRC è il quarto tipo di neoplasia più comune nei paesi occidentali, con più di un milione di nuovi casi l'anno e quasi mezzo milione di decessi. Il trattamento più efficace nel CRC è la resezione chirurgica; tuttavia una diagnosi precoce è cruciale per una prognosi favorevole. Per ridurre il rischio di CRC la migliore strategia risulta essere la prevenzione primaria attraverso la Dieta Mediterranea. Le due preparazioni di olio extravergine di oliva impiegate nello studio di Fini *et al.* (2008) sono state ottenute da olive (*Olea europaea* L.) delle varietà *Caiazzana* e *Ravece*, rispettivamente chiamate EVOO-A e EVOO-B. I due campioni differiscono per la composizione fenolica: per esempio il campione EVOO-A è ricco in pinosresinolo (fino al 62% dei fenoli totali), mentre EVOO-B è più ricco in oleocantale (conosciuto per esercitare azione antinfiammatoria) ma contiene una percentuale di pinosresinolo inferiore al 20% (tabella 3).

Le linee di cellule umane di CRC quali RKO, SW480 e HCT116 sono state ottenute dalla American Type Culture Collection, Manassas, VA. L'asse ATM p53 è attivo solo nelle cellule p53-competenti come RKO e HCT116 ed è cruciale per la regolazione dell'apoptosi e per l'arresto del ciclo cellulare. Questo studio ha dimostrato che l'olio EVOO-A, più ricco in pinosresinolo, induce l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi nelle cellule tumorali RKO e HCT p53-competenti attivando l'asse ATM-p53 (figura 3). Quindi gli autori suggeriscono che l'estratto di EVOO-A, ricco in pinosresinolo, potrebbe essere impiegato nella prevenzione primaria del cancro colon-rettale, anche se sarà necessario confermare tale ipotesi con ulteriori indagini scientifiche.

Un altro studio condotto da López-Biedma *et al.* nel 2015, ha

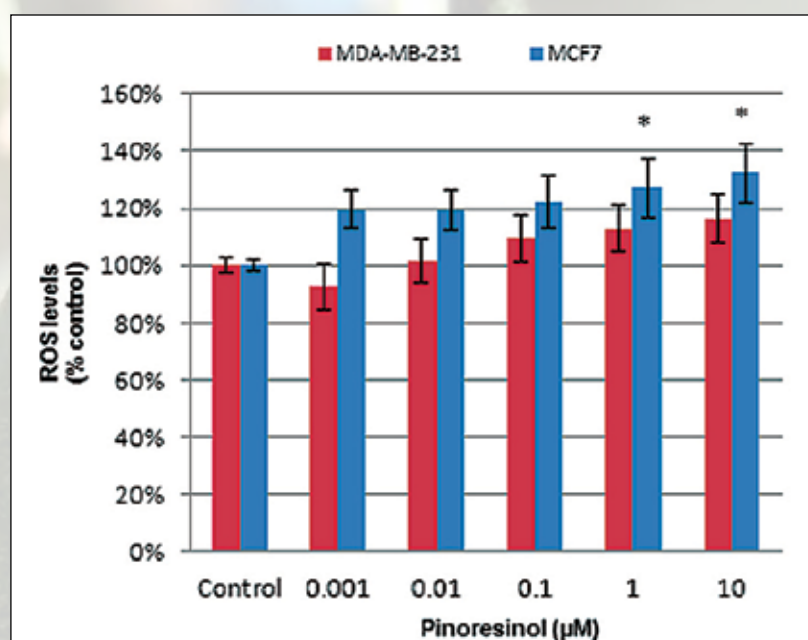


Figura 4. Livelli intracellulari di ROS rispetto al controllo sulle linee cellulari di cancro mammario MDA-MB-231 e MCF7 dopo il trattamento con pinosresinolo per 24 h. Lo stress ossidativo all'interno delle cellule aumenta proporzionalmente all'aumentare della concentrazione del pinosresinolo, (Lopez-Biedma *et al.*, 2015)

mostrato l'azione antitumorale del pinosresinolo verso linee cellulari del cancro mammario. Durante questa ricerca sono state impiegate linee cellulari del cancro della mammella MDA-MB-231 e MCF7. Entrambe sono state trattate con diverse concentrazioni di pinosresinolo per 24 h; questo lignano mostra citotossicità a basse concentrazioni verso ambedue le linee cellulari rispetto al controllo. L'effetto citotossico è maggiore nelle cellule MDA-MB-231 a concentrazioni comprese tra 0,001 e 0,01 µM. Inoltre è stato osservato che il pinosresinolo aumenta i livelli di ROS all'interno di queste linee cellulari con andamento concentrazione dipendente (figura 4).

L'effetto è più marcato sulle cellule MCF7. Lo stress ossidativo è stato indotto inizialmente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a cui poi è seguita l'aggiunta di pinosresinolo.

L'effetto è stato misurato considerando la fluorescenza emessa dall'ossidazione della 2,7-diclo-

rofluoresceina diacetato dovuta ai ROS prodotti in seguito all'esposizione dell'agente ossidante. Molti antitumorali incrementano lo stress ossidativo all'interno delle cellule tumorali, pertanto il pinosresinolo potrebbe essere impiegato come agente pro-ossidativo nelle terapie antitumorali.

### Possibile interazione del pinosresinolo sull'assorbimento intestinale di vitamina D

Un adeguato apporto di vitamina D è particolarmente utile nella prevenzione di patologie ossee, ma anche nella sarcopenia e persino in alcuni tipi di tumore. Se da un lato è noto che la luce solare contribuisce a stabilizzare i livelli di vitamina D, è altrettanto noto che essa deve essere integrata con la dieta soprattutto in inverno, quando l'esposizione alla luce solare è limitata. Tuttavia, una dieta corretta e bilanciata potrebbe non essere comunque sufficiente a garantire l'apporto giornaliero ri-



Cultivar	(+)-pinoresinolo (mg/kg)	(+)-1-acetossipinoresinolo (mg/kg)
Arbequina	2.8 - 46.2	5.1 - 77.3
Brisighella	12.4	23.4
Chemlali Sfax	1.7	6.2
Coratina	8.4	41.1
Cornicabra	4.4 - 74.5	1.2 - 4.9
Empeltre	11.7 - 19.0	31.5 - 40.0
Frantoio	4.2 - 55.1	40.7 - 82.0
Hojiblanca	7.0 - 53.2	3.4 - 78.2
Lechín de Granada	3.5	0.9
Lechín de Sevilla	0.6	26.8
Pical	6.9 - 36	0.2 - 4.9
Picudo	4.5 - 31.2	0.6 - 12.5
Riviera ligure	8.8	27.1
Sariulak	45.3 - 109.3	54.3 - 123.5
Tuscia	8.9	15.7

Tabella 4. Range di valori di (+)-pinoresinolo e (+)-1-acetossipinoresinolo in diverse cvs (Lopez-Biedma et al., 2016)

chiesto; infatti, si stima che il 75% della popolazione mondiale soffra di deficienza da vitamina D. Per questa ragione, le autorità alimentari consigliano l'assunzione di alimenti arricchiti in Vitamina D. Dati clinici dimostrano che l'assunzione di cibi arricchiti in vitamina D può contribuire ad aumentare i livelli di questa vitamina liposolubile in maniera dose dipendente. Esempi di alimenti arricchiti sono il latte vaccino, i cereali e le margarine. Inoltre, anche l'olio d'oliva potrebbe costituire un alimento ideale da arricchire con vitamina D.

Lo studio in esame (Goncavales et al., 2016) è scaturito da una precedente osservazione in cui è stato osservato che la naringenina, un composto fenolico presente in vari alimenti, inibisce l'assorbimento intestinale dell' $\alpha$ -tocoferolo da parte delle cellule Caco-2. Da queste osservazioni, e considerando che la via di assorbimento di vitamina D e  $\alpha$ -tocoferolo sono comuni, hanno voluto indagare l'influenza che le sostanze fenoliche dell'olio d'oliva possono esercitare sull'assorbimento intestinale della vitamina D. Inizialmente sono stati valutati gli effetti sull'assorbimento intestinale della vitamina D nei ratti. Sono stati impiegati due oli vergini d'oliva arricchiti di vitamina D, uno dei quali arricchito anche

con omega 3 (DHA). Si è notato che la combinazione di sostanze fenoliche e DHA riduce fino al 25% la biodisponibilità della vitamina D.

Alla luce di tale risultato, sono stati valutati anche gli effetti sinergici di tre costituenti fenolici dell'olio d'oliva (oleuropeina, idrossitirosole e pinoresinolo) in enterociti Caco-2 e i risultati sono stati simili a quelli ottenuti nei ratti. Successivamente, per comprendere se tale effetto fosse dovuto alla sinergia delle tre sostanze fenoliche oppure esclusivamente a una di esse, sono state fatte investigazioni successive impiegandoli prima a coppie, e poi singolarmente. I risultati hanno mostrato che l'effetto inibitorio sull'assorbimento della vitamina D dipende esclusivamente dal pinoresinolo. Gli autori hanno ipotizzato che questo lignano inibisce le proteine lipidiche di trasporto SR-BI che sono implicate nell'assorbimento della vitamina D, ma il meccanismo molecolare con cui ciò avviene non è ancora chiaro.

Come mostrato in tabella 4, il pinoresinolo è presente in quantità molto variabili nell'olio d'oliva (da valori inferiori a 1 mg/kg fino a superare i 100 mg/kg). Pertanto, nell'ottica di usare l'olio d'oliva come alimento da arricchire con vitamina D, si dovrebbero prendere in considerazione sia i risultati di questa indagine, sia il contenuto di pinoresinolo dell'olio che si vuole utilizzare e si dovrebbero prediligere oli poveri di (+)-pinoresinolo.

	% Emolisi					
Concentrazione ( $\mu\text{g/ml}$ )	100	50	25	12.5	6.25	3.125
(+)-Pinoresinolo	0	0	0	0	0	0
Amfotericina B	95.33	82.85	63.38	51.51	36.89	25.18

Tabella 5. Attività emolitica del (+)-pinoresinolo sugli eritrociti a confronto con un farmaco noto.

## Proprietà antifungine dei lignani

L'ampia diffusione degli antimicrobici classici ha determinato la nascita di nuovi patogeni farmaco-resistenti. I microrganismi responsabili di gravi infezioni ospedaliere, i patogeni a trasmissione sessuale e quelli di origine alimentare, sono diventati resistenti alla maggior parte dei farmaci antimicrobici disponibili. Di conseguenza numerose malattie sono sempre più difficili da trattare, e lo sviluppo di nuove classi di antimicrobici è assai difficile da attuare.

Attualmente, i prodotti naturali e i loro derivati impiegati in ambito clinico costituiscono più del 50% dei farmaci mondiali. In particolare, le piante sintetizzano una serie di composti chimici, noti come metaboliti secondari, che le proteggono da malattie dovute all'invasione microbica. Pertanto esiste un crescente interesse attorno a queste sostanze e al loro possibile impiego in terapie alternative, nonché per l'uso terapeutico di prodotti naturali in genere. In questo contesto Hwang et al. (2010) hanno isolato il (+)-pinoresinolo dall'erba *Sambucus williamsii*. Il genere *Sambucus* è ampiamente distribuito in Europa, Asia e Nord Africa ed è stato impiegato in medicina tradizionale come analgesico, antivirale, anti-infiammatorio, omeostatico, e anti-edema. In particolare hanno indagato il meccanismo d'azione e l'attività antifungina del (+)-pinoresinolo. La loro ricerca suggerisce che questa molecola potrebbe avere applicazioni cliniche nel trattamento delle infezioni fungine una-



ne. Per elucidare il meccanismo d'azione del (+)-pinoresinolo come antimicotico sono stati condotti esperimenti di fluorescenza sul patogeno fungino *Candida albicans*, che è l'agente eziologico di gravi infezioni sistemiche. L'analisi di fluorescenza, eseguita utilizzando 1,6-difenil-1,3,5-esatriene (DPH) ha messo in luce che il (+)-pinoresinolo danneggia la membrana plasmatica fungina. Nello studio di Hwang *et al.* (2010) l'attività antifungina del (+)-pinoresinolo è stata confrontata con quella dell'amfotericina B, un antimicotico impiegato nel trattamento di gravi infezioni fungine sistemiche. Quest'ultima possiede un'elevata affinità per gli steroli delle membrane cellulari, e in particolare per l'ergosterolo, che è un componente delle membrane fungine. Il legame dell'amfoteri-

cina B con l'ergosterolo causa la disorganizzazione della membrana fungina, con conseguente aumento di permeabilità di membrana e fuoriuscita di ioni e altri soluti intracellulari e quindi favorisce o induce la morte del micete. Questo antimicotico lega anche il colesterolo delle membrane cellulari dei mammiferi con conseguente emolisi e tossicità nell'uomo.

Il (+)-pinoresinolo, invece, testato a diverse concentrazioni, non causa emolisi (tabella 5). Per questa ragione si suggerisce l'uso della molecola in pratica clinica senza effetti citotossici sui globuli rossi (Hwang *et al.*, 2010).

Il (+)-pinoresinolo agisce su diversi patogeni fungini come *Candida albicans*, *Trichosporon beigeli* e *Malassezia furfur* (tabella 6) con MIC (minima concentrazione ini-

Composto	MIC (µg/mL)		
	<i>C. albicans</i>	<i>M. furfur</i>	<i>T. beigeli</i>
(+)-Pinoresinolo	12,5	25,0	25,0
Amfotericina B	6,25	6,25	6,25

Tabella 6. Attività antifungina di (+)-pinoresinolo espressa come minima concentrazione inibente (MIC).

bitoria) compresa fra 12.5 e 25 µg/ml, con valori comparabili a quelli dell'amfotericina B.

L'attività antifungina del (+)-pinoresinolo è stata valutata anche misurando il rilascio di trealosio (1-α-glucopiranosile-1-α-glucopiranoside). Nei lieviti, nei batteri e nei funghi il trealosio si accumula a causa di stress ambientali come per esempio l'essiccazione, la disidratazione, l'ossidazione, il surriscaldamento, le basse temperature e il contatto con gli agenti tossici.

BIOLOGICO



SPECIALITÀ  
100% LEGUMI

Senza Glutine

NOVITÀ

- ✓ RICCO DI PROTEINE E FIBRE
- ✓ SENZA GLUTINE
- ✓ RICCO DI GUSTO

NON SOLO PASTA, NON SOLO COUSCOUS,  
MA 100% LEGUMI

Dai legumi nascono le specialità Probios: pasta e cous cous gustosi e facili da preparare. Scegli fra i diversi formati e gusti: caserecce 100% ceci, fusilli 100% lenticchie rosse, sedani rigati 100% fagioli neri, fusilli 100% piselli verdi e spaghetti 100% lenticchie gialle. Da oggi disponibile anche il cous cous di ceci e lenticchie rosse. Tutte le specialità di legumi Probios sono garantite senza glutine e prodotte in Italia!



Probios Group



www.probios.it

PROBIOS  
TI ASPETTA  
A SANA  
BOLOGNA

sana  
SPECIAL GUEST

SABATO 9 DOMENICA 10 - SETTEMBRE  
PAOLA MAUGERI  
PAD 26 STAND B29-C30



Quantità di trealosio e glucosio espresse come concentrazioni ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )		
Composto	Glucosio e trealosio intracellulare	Glucosio e trealosio rilasciati
Controllo	1.89	6.91
(+)-Pinoresinolo	10.83	11.32
Amfotericina B	5.70	20.79

Tabella 7. Concentrazioni di trealosio e glucosio incrementate dopo trattamento con (+)-pinoresinolo.

La concentrazione di glucosio aumenta in maniera significativa in cellule di *C. albicans* incubate con (+)-pinoresinolo rispetto a quelle non trattate. Si pensa che tale aumento sia alla base del successivo accumulo di trealosio misurato grazie all'attività antifungina del (+)-pinoresinolo (tabella 7).

Infine, è stato condotto un saggio di "killing time" su colonie di *Candida albicans*. Una colonia fungina è stata incubata con (+)-pinoresinolo a concentrazione due volte la MIC (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), mentre l'altra con amfotericina B (12,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Ogni due ore è stato determinato il numero di cellule sopravvissute per unità di colonia (CFUs o colony-forming units) espresso come percentuale di sopravvissuti come mostrato nella figura 5.

Le cellule fungine, in presenza di una concentrazione di (+)-pinoresinolo due volte la MIC, diminuiscono in maniera simile a quelle trattate con amfotericina B. Questi risultati confermano che il (+)-pinoresinolo possiede attività antimicotiche verso patogeni fungini umani.

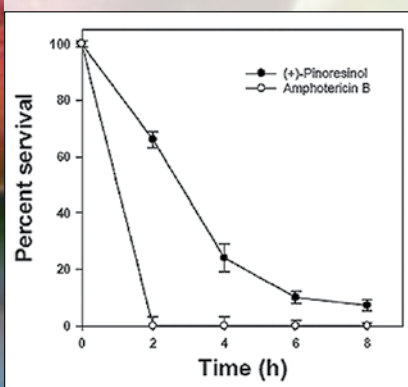


Figura 5. % di sopravvissuti in funzione del tempo

## Conclusioni

In conclusione, fra le potenzialità terapeutiche dei lignani, a oggi nella letteratura scientifica spiccano le proprietà antinfiammatorie del pinoresinolo, e visto che i processi infiammatori sono alla base di molte malattie, fra cui anche i tumori, il consumo di questa molecola potrebbe essere applicato a specifici target relativi a processi infiammatori.

A oggi, la letteratura scientifica ha evidenziato ampie potenzialità farmacologiche dei lignani, e in particolare del pinoresinolo, che possono essere riassunte nei punti che seguono:

- attività antinfiammatoria: il (+)-pinoresinolo inibisce la formazione del monossido d'azoto (NO) e della prostaglandina E2 (PGE2) in modelli murini, mentre causa un decremento di IL-6 e PGE2 in linee cellulari di adenocarcinoma del colon;
- effetto antitumorale: il pinoresinolo induce l'arresto del ciclo cellulare in fase G2/M e l'apoptosi in linee cellulari RKO e HCT di cancro colon rettale che presentano l'asse p53 attivo. Inoltre, mostra citotossicità verso linee cellulari di cancro della mammella MDA-MB-231 e MCF7 e potrebbe essere impiegato come agente pro-ossidativo nelle terapie antitumorali; sempre in questo contesto i lignani mostrano attività anti-estrogenica e questo suggerisce che possano essere sfruttati nella prevenzione del tumore al seno estrogeno dipendente nelle donne obese; infatti inibiscono la sintesi degli estrogeni nel tessuto adiposo e aumentano i livelli di SSBG con conseguente riduzione dei livelli di estrogeni

liberi;

- attività antifungina: il pinoresinolo possiede azione antifungina paragonabile a quella dell'amfotericina B, un antimicotico di sintesi. Saranno necessari ulteriori studi per capire meglio alcuni aspetti critici quali le differenze interindividuali nell'assorbimento e nella biodisponibilità dei lignani, il loro meccanismo d'azione, e la possibile interazione con alimenti e farmaci. Inoltre, vista l'importanza alimentare e commerciale dell'olio d'oliva, e visto che il (+)-1-acetossipinoresinolo è un lignano esclusivo di questo olio è auspicabile approfondire gli effetti di questa molecola.

La ricerca oggetto di questo articolo è parte del progetto COMPE-TITIVE, finanziato dal Progetto AGER - Agroalimentare e Ricerca

\* UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FIRENZE, Dipartimento di Neuroscienze, Psicologia, Area del Farmaco e Salute del Bambino (NEUROFARBA); Ce.R.A. - Centro Interdipartimentale di Ricerca per la Valorizzazione degli Alimenti

## Bibliografia

- Fini, Hotchkiss, Fogliano, Graziani, Romano, Edward, De Huanying, Selgrad, Boland, Ricciardello. Chemopreventive properties of pinoresinol-rich olive oil involve a selective activation of the ATM-p53 cascade in colon cancer cell lines. *Carcinogenesis*, 2008, 29 (1), 139-146.
- Goncalves, Margier, Tagliaferri, Lebecque, Georé, Wittrant, Coxam, Amiot, Reboul. Pinoresinol of olive oil decreases vitamin D intestinal absorption. *Food Chem.* 2016, 206, 234-238
- Hwang Lee, Liu, Woo, Lee. Antifungal effect of (+)-Pinoresinol isolated from *Sambucus williamsii*. *Molecules*, 2010, 15(5), 3507-3516
- López-Biedma, Sánchez-Quesada, Gaforio. Immunology division, Health sciences department, University of Jaén, Spain. Center for Advanced Studies in Olive Grove and Olive Oils, Science and Technology Park Geolit, 2015, Spain.
- López-Biedma, Sánchez-Quesada, Delgado-Rodríguez, Gaforio. The biological activities of natural lignans from olives and virgin olive oil: a review. *J. Funct. Food*, 2016, 26, 36-47.