

Development of analytical strategies for phytochemical investigation of «superfoods», with particular attention to Botanicals

Tutor: Prof.ssa Sonia Piacente

PhD student: Ciro Cannavacciuolo

Coordinator: Prof. Gianluca Sbardella

There is a great attention to functional foods exerting health benefits. In this frame the claim 'superfood' to characterize products with high nutritional value and bioactive phytochemicals is more and more used. In the course of current PhD project, the chemical and biological profile of food plants, selected on the basis of their growing interest, has been investigated.

During the first year, the chemical fingerprint of *Portuaca oleracea* L. (Portulacaceae), a widespread herbaceous plant typically appreciated in the Mediterranean and Asiatic diet, showed the presence of complex polar lipids and polyphenolic alkaloids, known as oleraceins. A deep investigation of both classes was carried out with articulate extraction procedures and chromatographic steps. The methanol extract was fractionated by SPE chromatography to obtain 2 lipid enriched fractions from leaves and stems. LC-HRMS analysis of the obtained fractions highlighted the occurrence of phospholipids, glycerolipids, oxylipins and sphingolipids, described in detail by accurate mass, molecular formulae and fragmentation pattern compared with literature data. The polyphenolic alkaloids were studied by choosing the extract with high yield of oleraceins, through HRMS flow injection analysis of several "green" extracts. The structures of oleraceins isolated by HPLC-UV were elucidated by 1D and 2D NMR experiments.

During the second year, the chemical profiles of the sprouts of *Raphanus sativus* L., better known as daikon and okra fruit (*Abelmoschus esculentus* L.), were studied. The methanol and "green" extracts of daikon showed the occurrence of polyphenolics and glucosinolates reported for anticancer and antioxidant activity. Preliminary studies about the radical scavenging activity of selected extracts were performed by Total Phenolic content, DPPH and TEAC assays, providing high activity of green extracts. Okra fruit is used in oriental traditional medicine for the treatment of diabetes. The inhibition of α -glucosidase in the intestinal tract could be a target for reducing the absorption of glucose. In this view, the ability to inhibit α -glucosidase along with antioxidant activity were evaluated. Moreover, the chemical profile of the species was investigated highlighting the occurrence of polar lipids and phenolic acid derivatives.

During the third year, a quali-quantitative analysis of mangosteen fruit (*Garcinia mangostana* L.), reported as source of bioactive xanthones, has been provided. In a first step, the isolation and the NMR characterization of the main xanthones was performed to select the specific NMR signals of each isolated compound for further quantitative approach. In the second step, several extracts, and commercially available supplements as capsules, tablets and juices, were submitted to ^1H and 2D NMR experiments and each compound was accurately quantified. The EtOH extracts and hydroalcoholic mixtures showed the highest amount of alpha and gamma mangostin, reported as bioactive xanthones. Regarding commercial food supplements, a certain variability in the amount of biologically active xanthones (i.e. α -mangostin and γ -mangostin) could be observed.

Moreover, in collaboration with the Division of Pharmacognosy of the University of Vienna, bioactivity assays on portulaca and daikon extracts were carried out. The "green" extracts of daikon, in agreement with the observed radical scavenging activity, showed a high capacity to activate Nrf2, involved in the transcription of detoxifying enzymes. The ability of portulaca extracts to interfere with Nrf2, NF- κ B and PPAR- γ targets was evaluated. The lipid enriched fractions resulted the most active in eliciting a concentration-dependent induction of Nrf2 and in promoting PPAR- γ activation.

Sviluppo di strategie analitiche per lo studio fitochimico di “Superfood”, con particolare attenzione ai Botanical.

Tutor: Prof.ssa Sonia Piacente

PhD student: Ciro Cannavacciuolo

Coordinator: Prof. Gianluca Sbardella

C'è una grande attenzione per gli alimenti funzionali che esercitano benefici per la salute. In questa visione viene sempre più utilizzato il claim “superfood” per caratterizzare prodotti ad alto valore nutritivo e sostanze naturali bioattive. Nel corso del presente progetto di dottorato è stato indagato il profilo chimico e biologico delle piante alimentari, selezionate in base al loro crescente interesse.

Durante il primo anno, il profilo chimico della *Portuaca oleracea* L. (Portulacaceae), pianta erbacea diffusa e apprezzata nella dieta mediterranea e asiatica, ha evidenziato la presenza di lipidi polari complessi e alcaloidi polifenolici, detti oleraceine. È stata condotta un'indagine approfondita di entrambe le classi con procedure di estrazione articolate e passaggi cromatografici. L'estratto metanolico è stato frazionato mediante cromatografia SPE per ottenere 2 frazioni arricchite di lipidi da foglie e steli. L'analisi LC-HRMS delle frazioni ottenute ha evidenziato la presenza di fosfolipidi, glicerolipidi, ossilipine e sfingolipidi, descritti in dettaglio da massa accurata, formule molecolari e patterns di frammentazione rispetto ai dati della letteratura. Gli alcaloidi polifenolici sono stati studiati scegliendo l'estratto ad alta resa in oleraceine, mediante analisi HRMS flow injection di diversi estratti “eco-sostenibili”. Le strutture delle oleraceine isolate mediante HPLC-UV sono state chiarite mediante esperimenti NMR 1D e 2D.

Durante il secondo anno è stato studiato il profilo chimico dei germogli di *Raphanus sativus* L., meglio noto come daikon e del frutto del gombo (*Abelmoschus esculentus* L.). L'estratto metanolico e gli estratti “eco-sostenibili” di daikon ha mostrato la presenza di polifenolici e glucosinolati noti per l'attività antitumorale e antiossidante. Studi preliminari sull'attività di neutralizzazione dei radicali dei diversi estratti sono stati condotti mediante saggi di contenuto fenolico totale, DPPH e TEAC, evidenziando un'elevata attività degli estratti eco-sostenibili. Il frutto di gombo è usato nella medicina tradizionale orientale per il trattamento del diabete. L'inibizione dell' α -glucosidasi nel tratto intestinale potrebbe essere un obiettivo per ridurre l'assorbimento del glucosio. In questa prospettiva, è stata valutata la capacità di inibire l' α -glucosidasi insieme all'attività antiossidante. Inoltre, è stato studiato il profilo chimico della specie evidenziando la presenza di lipidi polari e derivati dell'acido fenolico.

Nel corso del terzo anno è stata effettuata l'analisi quali-quantitativa del frutto del mangostano (*Garcinia mangostana* L.), riportato in letteratura come fonte di xantoni bioattivi. In una prima fase, è stato eseguito l'isolamento e la caratterizzazione NMR dei principali xantoni per selezionare i segnali NMR specifici di ciascun composto isolato per un ulteriore approccio quantitativo. Nella seconda fase, diversi estratti e integratori disponibili in commercio come capsule, compresse e succhi sono stati sottoposti a esperimenti NMR 1H e 2D e ciascun composto è stato quantificato accuratamente. Gli estratti Etanolici e le miscele idroalcoliche hanno mostrato la più alta quantità di mangostin alfa e gamma, segnalata come xantoni bioattivi. Per quanto riguarda gli integratori alimentari commerciali, si può osservare una certa variabilità nella quantità di xantoni biologicamente attivi (cioè α -mangostin and γ -mangostin).

Inoltre, in collaborazione con la Divisione di Farmacognosia dell'Università di Vienna, sono stati effettuati saggi di bioattività su estratti di portulaca e daikon. Gli estratti “eco-sostenibili” di daikon, in accordo con l'attività di radical scavenging osservata, hanno mostrato un'elevata capacità di attivare il pattern Nrf2, coinvolto nella trascrizione degli enzimi disintossicanti. È stata valutata la capacità degli estratti di portulaca di interferire con gli obiettivi Nrf2, NF-kB e PPAR- γ . Le frazioni arricchite di lipidi sono risultate le più attive nel suscitare un'induzione dipendente dalla concentrazione di Nrf2 e nel promuovere l'attivazione di PPAR- γ .