

UNIVERSITY OF CAMERINO

SCHOOL OF PHARMACY

Legumi: da alimento tradizionale a fonte di nutraceutici

SAURO VITTORI

VI CONGRESSO NAZIONALE DELLA SINut

Bologna, 27-28 Maggio 2016

2016: anno internazionale dei legumi

nutritious seeds for a sustainable future

2016
INTERNATIONAL
YEAR OF PULSES

Da: http://www.fao.org/pulses-2016/en

International Year of Pulses 2016

The 68th UN General Assembly declared 2016 the International Year of Pulses (IYP) (A/RES/68/231)

The Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) has been nominated to facilitate the implementation of the Year in collaboration with Governments, relevant organizations, non-governmental organizations and all other relevant stakeholders.

The IYP 2016 aims to heighten public awareness of the nutritional benefits of pulses as part of sustainable food production aimed towards food security and nutrition. The Year will create a unique opportunity to encourage connections throughout the food chain that would better utilize pulse-based proteins, further global production of pulses, better utilize crop rotations and address the challenges in the trade of pulses.

LENTICCHIE E LEGUMI

- Lenticchie (Lens culinaris L.)
- Fagioli (Phaseolus vulgaris L.)
- Piselli (Pisum sativum L.)
- Ceci (*Cicer arietinum L.*)
- Lupini (Lupinus spp)
- Fave (*Vicia Faba*)
- Soia (*Glicine max*)
- Cicerchia (*Lathyrus sativus*)



G. Caprioli, G. Cristalli, E. Ragazzi, L. Molin, M. Ricciutelli, G. Sagratini, R. Seraglia, Y. Zuo and S. Vittori. A preliminary matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight approach for the characterization of Italian lentil varieties. **Rapid Commun. Mass Spectrom. 2010**; 24: 2843-2848.

Famiglia delle **leguminose o fabacee**

Caratteristiche:

- ✓ Proteine ad alto valore biologico
- ✓ Carboidrati complessi
- ✓ Fibra alimentare
- ✓ Sali minerali
- ✓ Vitamine
- ✓ Basso contenuto in grassi
- ✓ Basso indice glicemico

Benefici:

- ✓ Diabete mellito
- ✓ Patologie cardiovascolari

Inconvenienti:

✓ Produzione di gas. Alcuni oligosaccaridi non vengono digeriti dagli enzimi del tratto gastrointestinale e sono fermentati dalla flora batterica del colon.

Inizio attività di ricerca sui legumi del Gruppo



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAMERINO FACOLTÀ DI FARMACIA

Corso di Laurea Specialistica in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche Classe 14/S

Dipartimento di Scienze Chimiche

Valutazione del tenore di soiasaponine I e VI nelle lenticchie mediante SPE-HPLC-MS

Tesi sperimentale in Chimica degli Alimenti

Laureanda

Relatori

Sara Quadrini

Prof. Sauro Vittori

Dr. Gianni Sagratini

Anno Accademico 2007-2008

La dr.ssa Sara Quadrini nell'anno 2008 ha ricevuto un premio di laurea dall'Alpro Foundation, fondazione della multinazionale Belga Alpro Soy, che produce prodotti alimentari con proprietà salutistiche basate prevalentemente sulla soia; cerimonia di consegna a Camerino il 25 Marzo 2009. Il bando prevedeva un premio di laurea per ognuna delle seguenti 5 nazioni: Belgio, Germania, Italia, Olanda, Gran Bretagna. La scelta tra i numerosi concorrenti è stata effettuata da una giuria internazionale di esperti.

G. Sagratini, Y. Zuo, G. Caprioli, G. Cristalli, D. Giardinà, F. Maggi, L. Molin, M. Ricciutelli, P. Traldi, S. Vittori. Quantification of Soyasaponins I and Bg in Italian Lentil Seeds by Solid Phase Extraction (SPE) and High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (HPLC-MS). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57, 11226-11233.

Studio preliminare con lenticchie

Ad 8 soggetti, selezionati per la loro ipercolesterolemia (239-297 mg/dl), non in terapia, è stato chiesto di modificare la loro dieta inserendo 50 gr of lenticchie 4 volte alla settimana. Controllo dopo 8 settimane.

Paziente	Valore iniziale	Post Tratt.	differ mg/dl	differ %
G.R.	276	247	29	10,5
L.R.	297	248	49	16,5
M.M.	239	212	27	11,3
M.S.	242	227	15	6,2
M.C.	240	212	28	11,7
E.C.	240	221	19	7,9
C.N.	270	238	32	11,9
A.T.	254	224	30	11,8

228,62

28,62

11,0

media

257,25

LENTICCHIE E SAPONINE

Le lenticchie sono una fonte dietetica primaria di saponine (glicosidi triterpenici o steroidei), che sono naturalmente presenti nelle piante

PROPRIETA' SALUTISTICHE:

- 1) EFFETTI ANTIREPLICATIVI CONTRO IL VIRUS HIV
- 2) PROPRIETA' ANTICARCINOGENICHE induce apoptosisi delle cellule cancerose
- 3) RIDUZIONE DEI LIVELLI DI COLESTEROLO NEL SANGUE

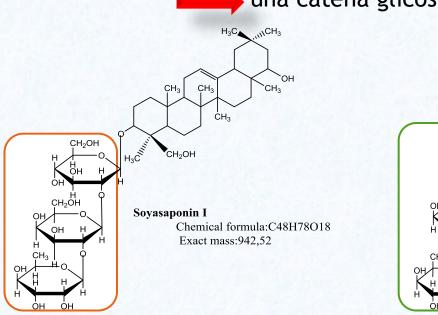
Oakenfull D.G., Sidhu G.S., Europ. J. Clin. Nutr., 44, 79-88, 1990

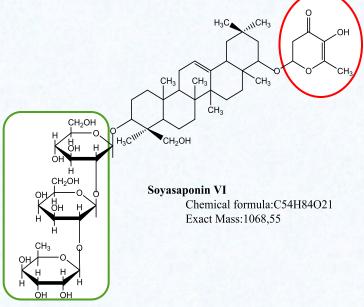
LE SAPONINE

Le saponine sono glicosidi naturalmente presenti nelle piante, dal sapore amaro. un nucleo agliconico (steroidico o triterpenico)

Strutturalmente presentano

una catena glicosidica





Le lenticchie sono considerate come la fonte dietetica primaria di saponine alimentari.

PROPRIETA' SALUTISTICHE:

- effetto antireplicativo contro HIV
- * proprietà anticarcinogeniche e antiepatotossiche
 - * riduzione dei livelli di colesterolo nel sangue





















niversità di Camerir

1336

AZIONI BIOLOGICHE DELLE SOIASAPONINE I e β g

➤ Azione IPOCOLESTEROLEMIZZANTE → Inibiscono l'assorbimento del colesterolo



Incremento dell'escrezione fecale di colesterolo

Le SS contenute negli alimenti (lenticchie) potrebbero essere utili per abbassare i livelli di colesterolo.



Indiretta:

Bloccano il circolo enteroepatico degli acidi biliari



Colesterolo endogeno
utilizzato per la sintesi di
acidi biliari che aumentano
sensibilmente



Simile ai fitoesteroli:

Competono con gli steroli per l'assorbimento



Minor captazione di colesterolo dagli enterociti e diminuiti livelli nel sangue

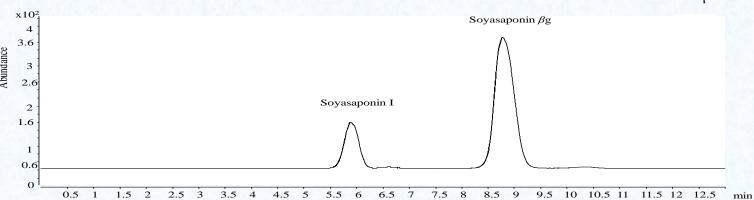
- Lee S.O., Simons A.L., Murphy P. A., Hendrich S. Exp. Biol. Med. 2005, 230:472-478.
- Oakenfull D., Gurcharn S. Eur. J. Clin. Nutr. 1990, 44:79-80.
- Lin Y., Meijer G.W., Vermeer M.A., Trautwein E.A. Nutr. 2004, 134: 143-148

Nuovo metodo sviluppato per l'analisi di SS

- a) Pesare e macinare 1 gr di lenticchie
- b) Estrazione 3 h mediante agitazione (10 ml 70 % EtOh acquoso)
- c) Filtrazione sul Gooch.
- d) Iniezione senza previa purificazione in UHPLC-MS/MS

Cromatogramma in HPLC-MS/MS di un mix standard a 50 mg L^{-1} di SS I e SS β g





CONTENUTO MEDIO DI SS I + SS β g : 1800-2500 mg KG⁻¹ NELLE LENTICCHIE CRUDE

<u>Caprioli, G.</u>, Vila -Donat, P., Conti, P., Maggi, F., Ricciutelli, M., Torregiani, E., Vittori, S, Sagratini, G. Rapid Quantification of Soyasaponins I and Bg in Italian Lentils by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)-Tandem Mass Spectrometry (MS/MS). Food Analytical Methods. (2014) 7 (5) pp. 1024-1031

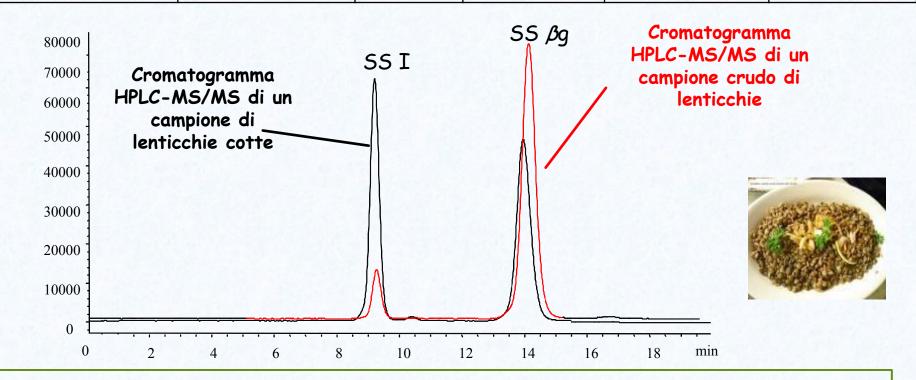


HPLC-MS/MS (Triplo quadrupolo) Colonna: Gemini FM: canale A $\rm H_2O+0.25\%$ CH $_3$ COOH (20%) canale B MeOH + 0.25% CH $_3$ COOH (80%) Flusso: 1 ml/min .

Corsa: 10 minuti Vol. iniez: 5 μl. **MRM**

LENTICCHIE COTTE

Campioni	Tipologia di campione	Lenticchia mg kg ⁻¹	Acqua di cottura mg kg ⁻¹	Rapporto cotto/crudo (%)	SS lost in water (%)
Lenticchie di Colfiorito	crude cotte	2541.7 2388.7	0 141.8	94	5.6
Lenticchie dell' Umbria	crude cotte	1781.7 1816.3	0 134	102	7.6



<u>G. Caprioli</u>, G. Sagratini, F. Maggi, G. Font, D. Giardinà, J. Mañes, G. Meca, M. Ricciutelli, V. Sirocchi, E. Torregiani, S. Vittori. **J. Agric. Food Chem**. 2013, 71, 1702-1709.

Studi di Bioaccessibilità

1336



Sample (10g)

Mouth phase 30 sec. at 37°C in stomacher

6 ml of simúlate saliva

Gastrointestinal digestion (GI)

Gastric phase 2h at 37°C, pH 2.0

0.5g of pepsin solution (1g of pepsin in 25 mL of HCl 0.1 N) +60 mL of deionized water

Duodenal phase 2h at 37°C, pH 6.5

1.25g of bile salt and pancreatin solution (0.1g of pancreatin and 0.6g of bile salt in 25 mL of NaHCO₃ 0.1 N)

Colonic phase 2h at 37°C, pH 6.5 **Large intestine compartment:**

Simulated duodenal intestinal fluid contaminated with several bacteria (1*10¹⁴ UFC/mL) characteristic of the gastrointestinal tract. Incubation 37°C, during 48h, pH 6.5

Centrifugation at 4000 rpm at 4°C during 1h

Supernatant=Bioaccessible fraction

RISULTATI:

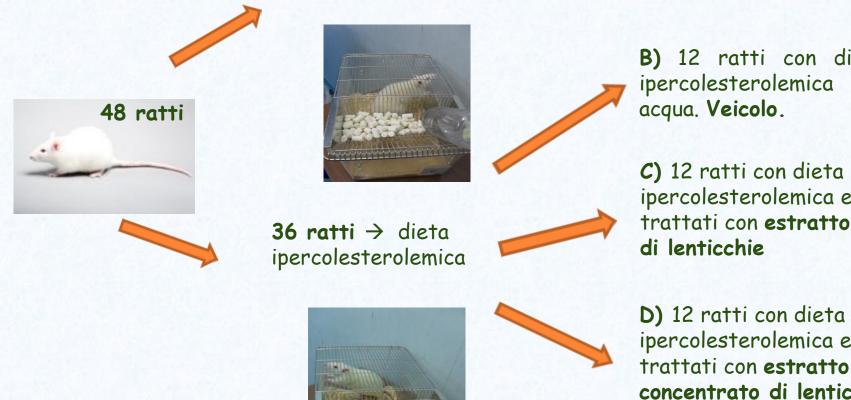
Nel duodeno si ha una bioaccessibilita' del 10% per la **SSI**, nel colon di circa lo 0,2%.

LC-MS soyasaponins analysis

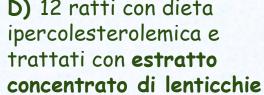
Studi in vivo nei ratti:

ratti soggetti a dieta ipercolesterolemica e poi trattati con estratti idroalcolici di lenticchie per dimostrare gli effetti ipocolesterolemizzanti delle soiasaponine

A) 12 ratti → Dieta normale, non trattati con estratto (controllo)

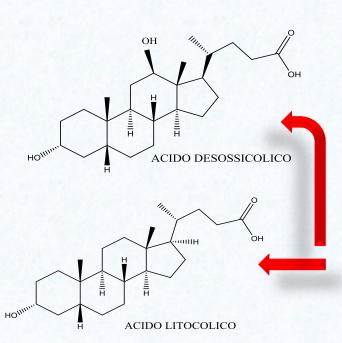


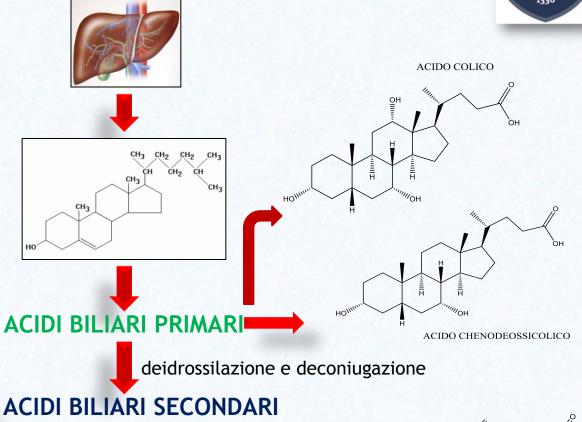
- B) 12 ratti con dieta
- ipercolesterolemica e trattati con estratto diluito



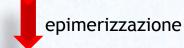
ACIDI BILIARI



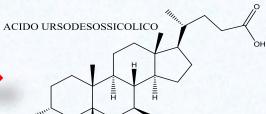








ACIDI BILIARI TERZIARI

















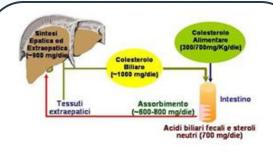






RUOLO FISIOLOGICO DEGLI ACIDI BILIARI



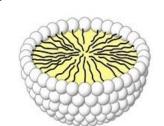


Omeostasi del colesterolo

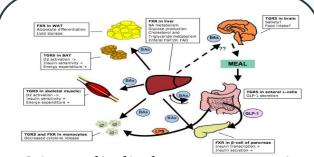
Stimolazione del flusso biliare

RUOLO FISIOLOGICO DEGLI ACIDI BILIARI

Favorire l'assorbimento di vitamine liposolubili



Assorbimento dei lipidi



Ligandi di due recettori specifici TGR5 e FXR



Indicatori di rischio di cancro al colon















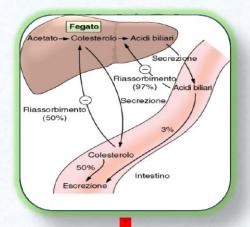






CIRCOLO ENTERO-EPATICO DEGLI ACIDI





Sono previsti 2 -3 cicli per pasto (5 - 15 cicli /die).

Circa 0,2 g - 0,6 g (15 % - 35%) di acidi biliari non vengono assorbiti al giorno e escreti con le feci.

Questa quantità è di norma reintegrata dalla sintesi epatica di



















Experimental Biology and Medicine

Soyasaponins Lowered Plasma Cholesterol and Increased Fecal Bile Acids in Female Golden Syrian Hamsters

Sun-Ok Lee, Andrean L. Simons, Patricia A. Murphy and Suzanne Hendrich

Experimental Biology and Medicine 2005, 230:472-478.

Fecal Bile Acids and Neutral Sterols. There were significant effects of treatment on bile acid and neutral sterol outputs (Table 2). Mean value of total fecal bile acid and neutral sterol outputs was significantly greater in hamsters fed group B soyasaponins (P < 0.05) compared with those fed casein (Table 2). Fecal excretion of cholic acid, cholestane, coprostanol, lathosterol, and campesterol was significantly greater in hamsters fed group B soyasaponins than in those fed casein (P < 0.05; Table 2). Hyodeoxycholic acid, hyocholic acid, ursodeoxycholic acid, and lanosterol

Table 2. Group B Soyasaponins Increased Daily Fecal Excretion of Bile Acids and Neutral Sterols (μmol) in Female Hamsters^a

	Casein	Group B soyasaponin
Total bile acids Cholic acid Total neutral sterols Cholestane Coprostanol Lathosterol Campesterol	22.5 ± 10.3^{b} 20.8 ± 12.7^{b} 29.2 ± 4.7^{b} 6.8 ± 2.6^{b} 1.8 ± 0.6^{b} 15.1 ± 9.5^{b} 1.3 ± 0.3^{b}	46.2 ± 21.9^{c} 43.5 ± 25.6^{c} 54.1 ± 8.7^{c} 9.7 ± 4.1^{c} 6.1 ± 3.4^{c} 25.9 ± 14.4^{c} 3.4 ± 1.6^{c}

^a Values represent means \pm SD. n = 10. Within a column, means with different superscripts are different (P < 0.05).

In conclusion, group B soyasaponins lowered plasmacholesterol levels by a mechanism involving the greater excretion of fecal bile acids and neutral sterols compared with casein. Greater production of soyasaponin metabolite in hamsters was associated with improved plasma cholesterol status. This study indicated that understanding the health effects of soyasaponins will require more knowledge of the metabolic fate and actions of metabolites of soyasaponins in animals and humans.

Mecc. Indiretto

Bloccano il circolo entero-epatico degli acidi biliari



Colesterolo endogeno
utilizzato per la sintesi
di acidi biliari che
vengono eliminati

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE PER LA QUANTIFICAZIONE DEGLI ACIDI BILIARI





Il campione di feci viene messo nel mortaio e pestato fino ad ottenere una polvere fine



Sono pesati alla bilancia 100 mg di feci



Vengono aggiunti 4,9 ml di MeOH per HPLC. La vial è messa nel vortex 2 volte per un minuto.



La vial è trasferita nel sonicatore per 30 minuti.





















QUANTIFICAZIONE DEGLI ACIDI BILIARI AL TO (dopo 6 settimane di trattamento con dieta ipercolesterolemica)



Gruppo 1	Conc. AB	Gruppo 2	Conc.AB	Gruppo 3	ConcAB	Gruppo 4	Conc.AB
n=3	Gruppo 1	n=3	Gruppo 2	n=3	Gruppo 3	n=3	Gruppo 4
1	421,506	14	1464,750	25	3192,792	37	3223,913
2	422,099	15	5123,536	27	4138,129	39	3460,467
3	506,979	16	1697,663	28	3343,468	40	3356,932
5	365,462	17	4361,323	29	3369,607	41	3524,936
6	280,331	18	4094,810	31	3641,512	42	3216,379
7	421,137	19	4990,628	32	3646,821	43	3409,287
9	306,100	20	4626,321	34	4142,691	46	3504,302
10	592,195	22	4190,097	36	2233,943	47	3357,611
Conc.media	414,476	Conc.media	3818,641	Conc.media	3463,620	Conc.media	3381,728
Dev Std	101,725	Dev Std	1428,123	Dev Std	608,280	Dev Std	117,068
RSD%	24,543	RSD%	37,399	RSD%	17,562	RSD%	3,462





















QUANTIFICAZIONE DEGLI ACIDI BILIARI AL T FINALE (71 giorni di trattamento con estratto di lenticchie)



Gruppo 1	Conc. AB	Gruppo 2	Conc. AB	Gruppo 3	Conc. AB	Gruppo 4	Conc. AB
n=3	Gruppo 1	n=3	Gruppo 2	n=3	Gruppo 3	n=3	Gruppo 4
1	501,509	14	3719,591	25	4440,477	37	4112,563
2	540,246	15	3809,863	27	5366,033	39	5364,431
3	293,654	16	3012,904	28	4813,430	40	4538,845
5	470,792	17	2141,494	29	4023,367	41	3688,881
6	353,179	18	4178,403	31	5123,678	42	3953,619
7	375,345	19	3627,910	32	3854,373	43	4101,895
9	304,138	20	4063,574	34	4399,593	46	4533,219
10	490,755	22	3845,429	36	3772,419	47	4472,477
Conc.media	416,202	Conc.media	3549,896	Conc.media	4474,171	Conc.media	4345,741
Dev Std	95,932	Dev Std	667,688	Dev Std	587,841	Dev Std	510,642
RSD%	23,049	RSD%	18,809	RSD%	13,139	RSD%	11,750

















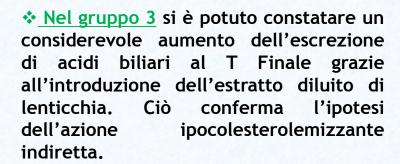


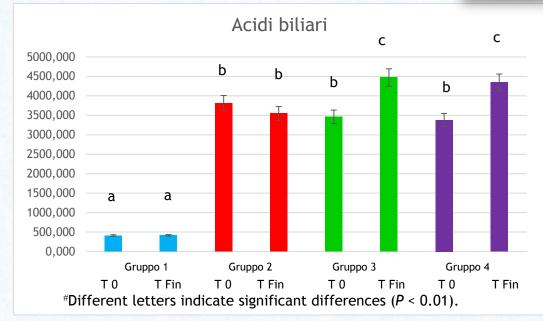


ISTOGRAMMA RIASSUNTIVO RELATIVO AGLI ACIDI BILIARI NEI CAMPIONI DI FECI NEI VARI GRUPPI DI RATTI AL TO E T FINALE



- Nel gruppo 1 il quantitativo di acidi biliari non varia nell'arco di tempo che intercorre tra TO e T Finale. Non modificando la dieta, l'omeostasi del colesterolo resta invariata.
- ❖ Nel gruppo 2 la statistica conferma che non è possibile affermare la presenza di differenze significative tra T0 e T Finale. L'acqua addizionata alla dieta non ha influenzato l'omeostasi del colesterolo.





* Nel gruppo 4 si osserva un chiaro aumento dell'escrezione degli acidi biliari al T Finale. L'estratto di lenticchia ricco in SS ha determinato un effetto ipocolesterolemizzante.





















ACIDI GRASSI



Gli acidi grassi sono i costituenti più importanti dei grassi alimentari, sono molecole composte da una catena di atomi di carbonio con un gruppo carbossilico all'estremità.

Lunghezza della catena

→ ACIDI GRASSI A CORTA CATENA (SCFAs)
 → ACIDI GRASSI A MEDIA CATENA (MCFAs)
 → ACIDI GRASSI A LUNGA CATENA (LCFAs)

SATURI = senza doppi legami
 Presenza di doppi legami
 INSATURI = con doppi legami





















SCFAs COME REGOLATORI DELLA MICROECOLOGIA E FISIOLOGIA DEL COLON.



Sono nutrienti per le cellule della mucosa Stimolano la proliferazione dei colonociti

Aumentano il flusso di sangue

Il butirrato ha un ruolo chiave nel trattamento e prevenzione di patologie del colon

RUOLO FISIOLOGICO DEGLI SCFAs

Abbassano il pH

Il propionato è il substrato per la gluconeogenesi epatica

L'acetato è il substrato primario per la sintesi del colesterolo Aumentano
l'assorbimento
dell'acqua e
l'uptake dei
minerali





















EFFETTI FISIOLOGICI DEGLI MCFAs



Aumentano il consumo di ossigeno postprandiale dal livello basale

Aumentano l'ossidazione dei grassi e riducono l'adiposità



Riducono il peso corporeo

Aumentano la spesa energetica

Aumentano la termogenesi postprandiale













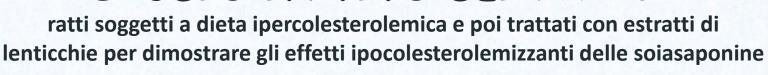




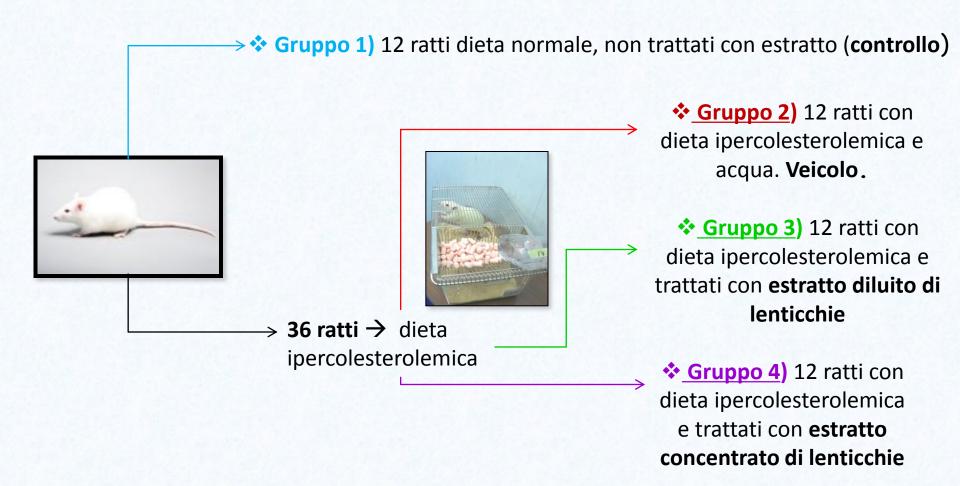




STUDIO IN VIVO DEI RATTI:



























ESTRAZIONE DEGLI ACIDI GRASSI A CORTA E MEDIA CATENA





Il campione di feci viene pestato nel mortaio fino ad una polvere fine



Sono pesati 250 mg di feci



Vengono aggiunti 250µl di H₂SO₄ al 50%



Vengono aggiunti 500 µl di dietiletere con SI iC6 a 50 ppm



Analisi in GC-FID



Centrifugazione per 5 min



Si miscela con vortex per 30 sec.













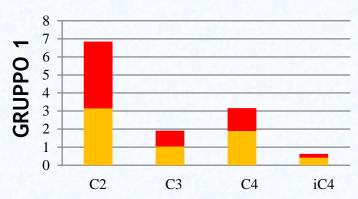




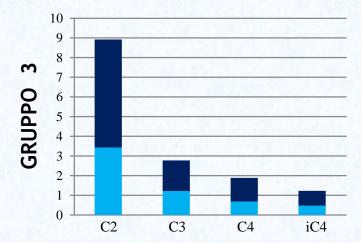




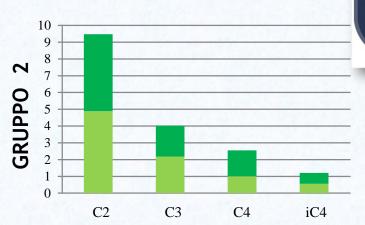
QUANTIFICAZIONE DEGLI SCFAs



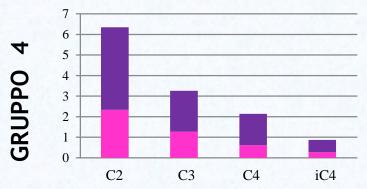
Non sono state osservate sostanziali differenze tra T0 e T Finale.



Tutti gli SCFAs hanno confermato un trend in crescita.



Non è stato possibile individuare un cambiamento rilevante nei livelli di questi acidi grassi a corta catena.



Ciascun acido grasso a corta catena al T Finale mostra un quantitativo superiore a quello del TO.













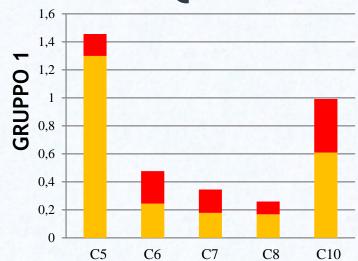




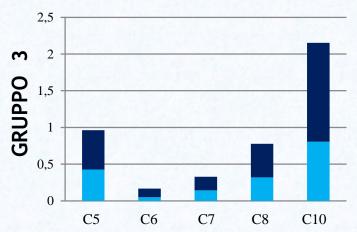




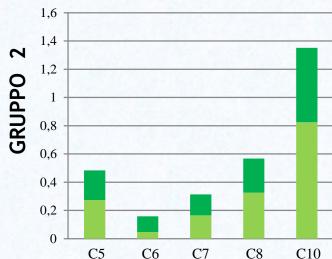
QUANTIFICAZIONE DEGLI MCFAs



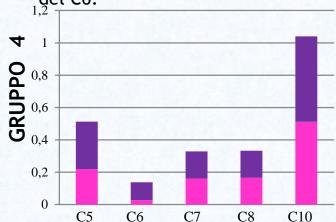
In generale ogni MCFAs ha subito un decremento al T Finale.



Tutti gli MCFAs sono stati trovati in quantitativi superiori al T Finale



Ciascun acido grasso al T Finale ha avuto un andamento negativo, ad eccezione del C6.



Benché l'incremento di questi analiti al T Finale sia minore, un andamento positivo è stato ugualmente riscontrato.





















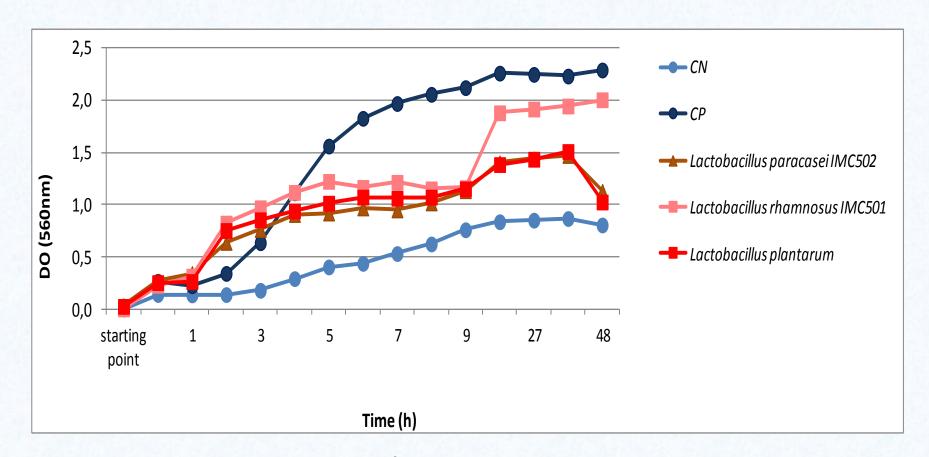
1336



ATTIVITA' PREBIOTICA DIRETTA

In vitro Fermentation test con estratto di lenticchie:

Very good ability of some Lactobacilli test strains (Lactobacillus rhamnosus IMC501, Lactobacillus paracasei IMC 502, Lactobacillus plantarum) to grow using the lentils extract as the only source of carbohydrates.



Sala 3: Valutazione dell'attività prebiotica dell'estratto di lenticchie sul microbiota intestinale mediante modello di fermentazione in vitro **C. Cecchini**







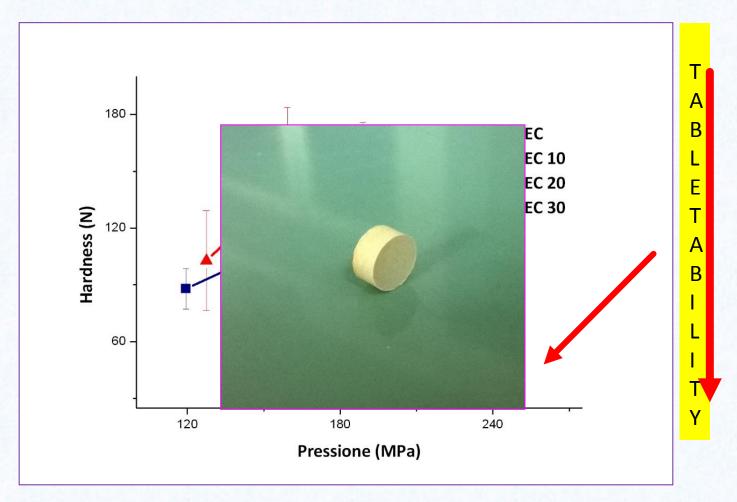
Ten-station rotary tablet press (Ronchi Cinisello Balsamo, Italy)

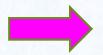




Hardness tester (TBH30, Erweka)







Buona comprimibilità 💠



Brevetto sull'estratto di Lenticchie

Spettabile Università degli Studi di Camerino Piazza Cavour 19/f 62032 Camerino (MC) Milano, 05 Novembre 2015

Oggetto: Domanda di brevetto italiano n 102015000069580 depositata il 05.11.2015 Titolo "ESTRATTO DI LENTICCHIE CON AZIONE IPOCOLESTEROLEMIZZANTE E PREBIOTICA"

Titolari "Università degli Studi di Camerino" Rapporto di deposito

Gentili Signori, Con riferimento a quanto in oggetto, Vi trasmettiamo la documentazione depositata in merito a: Domanda di Brevetto per Invenzione Industriale n. 102015000069580 del 05 Novembre 2015, come da copia autentica del verbale di deposito allegato.



CONCLUSIONI

❖ Questo estratto di lenticchie ricco in soiasaponine riduce il colesterolo nei ratti del 17% attraverso un meccanismo che prevede un'aumentata escrezione di acidi biliari a livello fecale. Questo costituisce un tassello a sostegno dell'esistenza di un meccanismo ipocolesterolemizzante indiretto.



* Risultati soddisfacenti sono stati ottenuti anche per lo studio preliminare dell'azione prebiotica degli FFAs a livello della microflora intestinale.

I livelli più elevati di acidi grassi a corta e media catena sono stati riscontrati nei ratti alimentati con estratto di lenticchie.

Ulteriori attività:

❖ commercializzare estratti di legumi (integratori) con azione ipocolesterolemizzante e prebiotica.

❖Sala 3: Analisi dei Polifenoli nei Legumi e Correlazione con Colore ed Attività Antiossidante F. Giusti

LENTICCHIE E LEGUMI SONO UN PREZIOSO ALLEATO PER LA SALUTE, ANCHE COME INTEGRATORI.













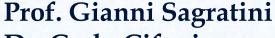








RINGRAZIAMENTI



Dr. Carlo Cifani

Dr. Maria Vittoria Micioni

Dr. Massimo Ricciutelli

Dr. Manuela Cortese

Dr. Pilar Vila-Donat

Dr. Elisabetta Torregiani

Dr. Veronica Sirocchi

Dr. Federica Giusti

Dr. Michele Genangeli

Dr. Adelaide Lausdei





Università di Camerino

1336

Prof. Jordi Mañes

Prof. Guillermina Font

Prof. Giuseppe Meca

