

Caratterizzazione del castagno (*Castanea sativa* Mill.) come potenziale nutraceutico contro l'infiammazione gastrica

Enrico Sangiovanni¹, Stefano Piazza¹, Urska Vrhovsek², Marco Fumagalli¹, Saba Khalilpour¹, Domenico Masuero², Chiara Di Lorenzo¹, Luca Colombo³, Fulvio Mattivi², Emma De Fabiani¹, Mario Dell'Agli¹

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano

²Fondazione E. Mach, Dipartimento "Qualità Alimentare e Nutrizione" (QAN), San Michele all'Adige, Trento

³Consorzio Castanicoltori di Brinzio, Orino e Castello Cabiaglio, Società Cooperativa Agricola, Varese

La gastrite è una patologia a base infiammatoria dello stomaco causata prevalentemente dall'infezione del batterio *Helicobacter pylori*. Questo batterio colonizza la mucosa gastrica di circa l'80% della popolazione nei paesi in via di sviluppo e circa il 50% della popolazione mondiale (Rugge *et al.*). L'infezione può indurre una severa risposta immunitaria nell'ospite, caratterizzata dal rilascio di numerose citochine infiammatorie nella mucosa gastrica, tra cui IL-8 e TNF α . L'esposizione delle cellule epiteliali gastriche alle citochine, principalmente TNF α e IL-1 β , induce il rilascio di IL-8, una potente chemochina in grado di promuovere l'infiltrazione di neutrofilii. La secrezione di IL-8 è un tratto distintivo delle gastriti indotte da *Helicobacter pylori* (Shimada e Terano) e il suo rilascio è strettamente associato all'attivazione di NF- κ B, un fattore di trascrizione coinvolto in diversi processi pato-fisiologici, inclusi processi infiammatori, crescita cellulare e proliferazione.

Piante ricche in tannini hanno un uso tradizionale per il trattamento delle ulcere gastriche; inoltre, i tannini hanno mostrato attività antibatteriche in vitro contro *Helicobacter pylori* (Funatogawa *et al.*) e l'inibizione del rilascio di IL-8 a livello gastrico, sia in vitro che in vivo (Fumagalli *et al.*; Sangiovanni *et al.*). Studi epidemiologici indicano che il consumo di proantocianidine (tannini condensati) con la dieta ha effetti benefici su varie patologie croniche, inclusa la sindrome metabolica, aterosclerosi e cancro. Inoltre, le proantocianidine si sono dimostrate stabili dopo una digestione gastrico-simulata in vitro (Fumagalli *et al.*) e in vivo a livello gastrico (Tsang *et al.*), suggerendo una possibile attività biologica *in situ*.

Il castagno (*Castanea sativa* Mill., sin. *Castanea vesca* Gaertn.) è una ricca risorsa di tannini, specialmente nelle foglie, legno e corteccia, mentre i frutti sono una buona risorsa di nutrienti essenziali, ma con basso contenuto di polifenoli. Nonostante l'elevata produzione di castagne e relativo consumo alimentare,

nella letteratura scientifica si trovano solo dati limitati sulla composizione in tannini del frutto e sulle loro possibili proprietà benefiche. Alcuni studi condotti su sottoprodotti industriali di castagno hanno riportato un alto contenuto di fenoli e marcate proprietà antiossidanti (Squillaci *et al.*). I tannini sono stati identificati nei frutti, sebbene non siano stati riportati dettagli più precisi sulle loro caratteristiche chimiche.

Lo scopo di questo studio è stato quello di caratterizzare le possibili proprietà anti-infiammatorie dei frutti di castagno a livello gastrico, prendendo in considerazione diverse variabili (parti del frutto, varietà di castagno, anno di raccolta, stabilità chimica e termica). A questo fine è stato impiegato un approccio bio-guidato basato sulla secrezione di IL-8 in cellule AGS stimulate con TNF α , come modello semplificato in vitro di gastrite.

Il primo passo di questo lavoro è stata la preparazione di estratti acquosi e idroalcolici da frutti interi di cinque varietà di *Castanea sativa* Mill. (*Venégon*, *Paié*, *Russirö*, *Verdésa* e *Piliscé*). Le castagne sono state raccolte dal consorzio regionale castanicoltori nella area di Campo dei Fiori (Varese, Italia) e mantenute sottovuoto a 4 °C fino alla successiva lavorazione. Per la realizzazione degli estratti 2,5 grammi di frutto intero macinato sono stati sottoposti ad una procedura di doppia estrazione con 50 ml di acqua (estratto acquoso) o con una miscela etanolo/acqua 50:50 (estratto idroalcolico) rispettivamente per 4 e 16 ore, a temperatura ambiente, in condizioni di oscurità e infine liofilizzati.

Nessuno degli estratti in studio ha mostrato effetti citotossici in cellule AGS, valutati tramite test MTT. Una prima analisi degli estratti alla concentrazione di 10 μ g/ml ha evidenziato che solo gli estratti acquosi e idroalcolici di *Paié*, *Venégon* e *Verdésa* impedivano in modo significativo il rilascio di IL-8 indotto da TNF α (10 ng/mL), valutato attraverso saggio ELISA. Gli estratti delle tre varietà attive sono stati ulterior-

mente studiati in esperimenti di concentrazione-risposta con intervallo da 0,5 a 100 µg/mL per gli estratti acquosi e da 0,1 a 10 µg/mL per gli estratti idroalcolici. Come osservabile nella seguente tabella (tab. 1), gli estratti idroalcolici hanno mostrato un effetto inibitorio sempre maggiore rispetto ai corrispettivi estratti acquosi.

Il contenuto di fenoli totali negli estratti, espressi come equivalenti di acido gallico (AGE)/g di estratto, variava tra 32,38 e 96,67 mg, come mostrato in tabella 1, e il contenuto più elevato è stato trovato negli estratti di Verdésa e Venégon. Sulla base di questi risultati, gli estratti idroalcolici sono stati selezionati per ulteriori indagini.

Poiché l'espressione di IL-8 indotta da TNF α dipende dall'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B, le cellule AGS sono state trasfettate in modo transiente con il plasmide reporter NF- κ B-luc e trattate per 6 ore con gli estratti a 10 µg/ml in presenza di TNF α . Solo gli estratti idroalcolici delle varietà Venégon e Verdésa hanno inibito la trascrizione guidata da NF- κ B di circa il 50-60%, confermando il coinvolgimento di questa via di attivazione.

La caratterizzazione fitochimica degli estratti idroalcolici delle cinque varietà di castagne, condotta con analisi UPLC-MS/MS ha identificato diverse classi di composti, inclusi tannini condensati (proantocianidine), flavonoidi (ad es. catechine), stilbeni (ad es. resveratrolo) e acidi fenolici (ad es. acido gallico ed ellagico). Le varietà più attive, Venégon e Verdésa, contenevano livelli significativamente maggiori di proantocianidine ad alto peso molecolare (26,7 e 147,1 mg/g di estratto, rispettivamente).

Per studiare il contributo delle varie parti del frutto all'attività biologica, estratti idroalcolici da parti edibili (endosperma) e non edibili (pericarpo e episperma) sono stati preparati separatamente, con la tecnica precedentemente descritta, dalle varietà Venégon e Verdésa.

Tab. 1 - Valori di IC₅₀ ottenuti dagli estratti acquosi e idroalcolici delle varietà Paié, Venégon e Verdésa sull'inibizione di IL-8 indotta da TNF α in cellule AGS in comparazione con il corrispettivo contenuto di fenoli totali, misurati come equivalenti di acido gallico (AGE). I valori sono espressi come media \pm deviazione standard (s.d.).

| Varietà | Estratti acquosi | | Estratti idroalcolici | |
|---------|--|-------------------------------------|--|-------------------------------------|
| | IC ₅₀ sul rilascio di IL-8 (µg/mL \pm s.d.) | Fenoli totali (AGE) mg/g \pm s.d. | IC ₅₀ sul rilascio di IL-8 (µg/mL \pm s.d.) | Fenoli totali (AGE) mg/g \pm s.d. |
| Paié | 21,01 \pm 7,09 | 32,38 \pm 2,71 | 1,85 \pm 1,34 | 37,10 \pm 7,66 |
| Venégon | 10,22 \pm 2,54 | 45,00 \pm 6,61 | 1,5 \pm 0,52 | 42,80 \pm 8,25 |
| Verdésa | 1,44 \pm 0,32 | 44,07 \pm 2,38 | 0,75 \pm 0,09 | 96,67 \pm 8,13 |

Gli estratti ottenuti dall'endosperma non sono risultati attivi sul rilascio di IL-8 fino alla concentrazione massima valutata (100 µg/mL). Al contrario, gli estratti idroalcolici da pericarpo ed episperma mostravano un'attività inibitoria concentrazione dipendente (tab. 2).

L'analisi fitochimica condotta sugli estratti delle diverse parti del frutto di Venégon e Verdésa ha mostrato un'alta percentuale di proantocianidine ad alto peso molecolare negli estratti di episperma (651,4 e 921,0 mg/g di estratto, rispettivamente) e pericarpo (150,2 e 378,9 mg/g di estratto, rispettivamente).

La varietà Verdésa è risultata la fonte più ricca di proantocianidine ad alto peso molecolare, che rappresentano circa il 90% dell'estratto di episperma. In nessun caso l'attività antinfiammatoria risultava correlata al grado medio di polimerizzazione (MDP) delle proantocianidine.

I risultati sopra riportati indicano che l'attività biologica è associata alle parti non commestibili della castagna (pericarpo e endosperma) in tutte le varietà valutate.

Le castagne sono ampiamente utilizzate nell'industria alimentare per la produzione di dolci e farina, attraverso procedure che richiedono trattamenti termici. L'esposizione degli estratti idroalcolici dei frutti interi di Verdésa e Venégon, a 50 °C fino a 6 ore, non ha alterato l'attività inibitoria sulla secrezione di IL-8. Tuttavia, entrambi gli estratti hanno mostrato una ridotta attività dopo un'esposizione a 100 °C in modo tempo-dipendente; l'effetto inibitorio su IL-8 è stato quasi completamente perso dopo 2 ore di incubazione a 100 °C.

I risultati finora descritti si riferiscono agli estratti preparati dai frutti raccolti nell'anno 2015. È noto che la composizione quali-quantitativa dei composti bioattivi delle piante cambia in base a molteplici variabili, incluso l'anno di raccolta. Data la scarsa disponibilità di frutti della varietà Verdésa, lo studio è proseguito sulla varietà Venégon con castagne raccolte nel 2016 e 2017. Le attività inibitorie esercitate

Tab. 2 - Valori di IC₅₀ ottenuti dagli estratti idroalcolici di episperma e pericarpo delle varietà Venégon e Verdésa sull'inibizione di IL-8 e sulla trascrizione guidata da NF- κ B indotta da TNF α in cellule AGS. I valori sono espressi come media \pm deviazione standard (s.d.).

| Varietà | Estratti idroalcolici – valori di IC ₅₀ (µg/mL \pm s.d.) | | | |
|---------|---|--------------------|------------------|--------------------|
| | Episperma | | Pericarpo | |
| | Rilascio di IL-8 | NF- κ B-luc | Rilascio di IL-8 | NF- κ B-luc |
| Venégon | 0,14 \pm 0,04 | 1,5 \pm 1,15 | 0,15 \pm 0,08 | 1,97 \pm 0,94 |
| Verdésa | 0,22 \pm 0,04 | 2,04 \pm 1,12 | 0,37 \pm 0,08 | 1,1 \pm 0,81 |

dagli estratti idroalcolici di frutti interi Venégon (2015) e Venégon (2016) erano paragonabili (IC_{50} $1,5 \pm 0,52$ e $1,34 \pm 0,8 \mu\text{g/mL} \pm \text{s.d.}$, rispettivamente) mentre l'estratto di Venégon (2017) è risultato meno attivo ($6,05 \pm 0,92 \mu\text{g/mL} \pm \text{s.d.}$). Sebbene si sia osservato un diverso grado di attività a seconda dell'anno raccolto le IC_{50} calcolate erano in tutti i casi inferiori a $10 \mu\text{g/mL}$.

Un aspetto critico per nutraceutici e integratori è la stabilità dei principi attivi a livello del tratto gastro-intestinale. La stabilità chimica nello stomaco è un fattore importante per estratti e composti che si desidera agiscano direttamente sull'epitelio gastrico. A tal fine abbiamo studiato l'effetto del pH acido e la presenza di enzimi digestivi sull'attività biologica precedentemente riscontrata. L'estratto idroalcolico del frutto intero della varietà Venégon (raccolto 2015) è stato sottoposto a digestione gastrica simulata in vitro ed il trattamento ha solo leggermente diminuito l'attività biologica dell'estratto, aumentando l' IC_{50} da $1,50 \pm 0,52$ a $4,13 \pm 1,83 \mu\text{g/mL} (\pm \text{s.d.})$.

I risultati sopra riportati indicano che, tenendo conto delle variabili critiche (trattamento termico, raccolto annuale, ambiente digestivo gastrico), la castagna di Venégon è risultata una valida fonte di composti bioattivi con potenziali attività antinfiammatorie a livello gastrico.

Per verificare l'applicazione pratica dei nostri risultati, abbiamo studiato l'attività biologica degli estratti idroalcolici da prodotti finiti (farina) e sottoprodotti ottenuti dalla lavorazione industriale delle castagne di Venégon (raccolto 2015). L'estratto preparato dal sottoprodotto, costituito dalle parti non commestibili (pericarpo ed episperma) e risultante dal peeling meccanico, mostrava un'attività inibitoria sulla secrezione di IL-8 in linea con i precedenti risultati (IC_{50} di $0,20 \pm 0,04 \mu\text{g/mL} \pm \text{s.d.}$). Come atteso, l'estratto preparato dalla farina industriale, costituita principalmente da endosperma, ha mostrato l'assenza di attività inibitoria.

Nell'ottica di migliorare le proprietà nutraceutiche della farina di castagne, abbiamo preparato un estratto idroalcolico a partire da una miscela di farina ed epi-

sperma, mantenendo il rapporto riscontrato nei frutti (22: 3, rispettivamente per l'endosperma e l'episperma, Venégon raccolto 2015). L'estratto preparato con farina arricchita con episperma (concentrazione finale 12%, w:w) ha mostrato attività inibitoria con un IC_{50} di $16,35 \pm 5,22 \mu\text{g} / \text{mL} (\pm \text{sd})$.

In conclusione, questo studio ha dimostrato che la farina di castagne è priva di qualsiasi attività anti-infiammatoria, mentre il sottoprodotto industriale mantiene la capacità di inibire la secrezione di IL-8. I risultati forniscono prove sperimentali a sostegno del potenziale uso di materiale derivato da castagne per la preparazione di nutraceutici e alimenti funzionali, ad esempio farina "fortificata".

Complessivamente, combinando un solido approccio bio-guidato con un'analisi completa della frazione tannica, questo studio ha fornito prove per l'uso potenziale di nutraceutici a base di castagno nella gastrite umana. I componenti bioattivi dei frutti di castagno inibiscono la secrezione di IL-8, molto probabilmente mediante molteplici meccanismi, inclusa l'inibizione della via di NF- κ B.

La scoperta che l'attività antinfiammatoria è mantenuta dopo il trattamento in condizioni acide e con enzimi digestivi, conferma ulteriormente l'applicabilità dei risultati sulla gastrite umana. Infine, lo studio offre suggerimenti utili per la valorizzazione di specifiche varietà di castagno e per stabilire le condizioni più appropriate per la preparazione di nutraceutici a base di castagne, con attività biologiche potenziali a livello gastrico.

Bibliografia

- RUGGE, M., ET AL., *Digestive and liver disease*. Official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver, 2011. 43 Suppl 4: p. S373-84.
- SHIMADA T., TERANO A., *GASTROENTEROL J.*, 1998. 33(5): p. 613-7.
- FUNATOGAWA, K., et al., *Microbiology and immunology*, 2004. 48: p. 251-61.
- FUMAGALLI, M., et al., *Pharmacol Res*, 2016. 111: p. 703-12.
- SANGIOVANNI, E., et al., *Plos One*, 2013. 8(8).
- TSANG, C., et al., *Br J Nutr*, 2005. 94(2): p. 170-81.
- SQUILLACI, G., et al., *Process Biochemistry*, 2018. 64: p. 228-236.