



DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102022000000581
Data Deposito	17/01/2022
Data Pubblicazione	17/07/2023

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	31	191

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	31	192

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	36	185

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	P	25	24

Titolo

Acido chinico per l'uso nel trattamento dei disturbi dell'umore - Quinic acid for use in the treatment of mood disorders

- 1 -

Acido chinico per l'uso nel trattamento dei disturbi
dell'umore

La presente invenzione riguarda l'acido chinico per l'uso nel trattamento dei disturbi dell'umore. In particolare, la presente invenzione riguarda l'acido chinico, un suo derivato o un suo precursore o una composizione farmaceutica comprendente acido chinico, un suo derivato o un suo precursore per l'uso nel trattamento dei disturbi dell'umore, in cui l'acido chinico può essere ottenuto da piante come il kiwi.

La depressione è un comune ed eterogeneo disturbo di salute mentale, contribuisce significativamente al carico globale di malattie e colpisce persone in tutte le comunità del mondo. Ad oggi, si stima che la depressione colpisca 322 milioni di persone (il 4.4% della popolazione mondiale), circa la metà di queste persone vive nella regione del Sud-est asiatico e nella regione del Pacifico occidentale, rispecchiando le popolazioni relativamente grandi di queste due regioni (che, per esempio, comprendono India e Cina) [1].

I disturbi depressivi sono le malattie mentali più comuni e la principale fonte di disabilità nel mondo, colpendo oltre il 10-15% della popolazione a qualche punto della loro vita.

Solo dagli ultimi quattro decenni ci sono criteri precisi per diagnosticare la depressione. I disturbi dell'umore sono attualmente classificati sulla base di sintomi, storia clinica (inclusa l'età di insorgenza, il decorso e l'esito), *pattern* di trasmissione familiare e

risposta al trattamento. Al giorno d'oggi, le malattie e quindi anche la depressione sono classificate con due sistemi diagnostici: il Manuale Diagnostico Statistico dei Disturbi Mentali - (DSM-V), dell'*American Psychiatric Association* (APA) e la *International Classification of Diseases* (ICD-11) dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) anche se il primo copre i disturbi mentali in dettaglio. Nel DSM-V i disturbi depressivi sono stati separati da quelli bipolari e correlati, rendendo obsoleta la classificazione in disturbi depressivi unipolari e bipolari (persone affette sia da depressione che da sintomi maniacali).

I due disturbi depressivi più frequenti sono MDD e distimia. La distimia è una forma cronica di depressione lieve, mentre la MDD è la forma più grave di depressione. I sintomi variano da un tipo di malattia mentale all'altro, ma sono principalmente caratterizzati da problemi relativi alle emozioni, ai modi di pensare e al modo in cui le persone si comportano e si relazionano tra loro nella società. Alcuni problemi di salute mentale sono anche in comorbidità con una o più condizioni di salute mentale come la depressione e l'ansia. I disturbi dell'umore e l'ansia sono in generale discussi insieme perché entrambi coinvolgono uno stato emotivo negativo. A seconda della gravità dei sintomi, l'episodio può essere ulteriormente classificato in lieve, moderato o grave:

- **Depressione lieve:** sono presenti pochi, se non nessuno, sintomi in eccesso rispetto a quelli necessari per fare la diagnosi, l'intensità dei sintomi è affliggente ma

gestibile e i sintomi provocano una lieve compromissione nel funzionamento sociale o professionale.

- Depressione moderata: il numero di sintomi, l'intensità dei sintomi, la compromissione funzionale o tutte queste variabili sono tra quelle specificate per "lieve" e "grave".

- Depressione grave: il numero di sintomi è sostanzialmente superiore a quello richiesto per fare la diagnosi, l'intensità dei sintomi è gravemente affliggente e ingestibile e i sintomi interferiscono marcatamente con il funzionamento sociale e professionale.

I trattamenti per la depressione possono essere divisi in tre; quelli che comportano l'uso di farmaci (indicati come farmacoterapia), quelli che utilizzano trattamenti biologici alternativi e quelli che usano la psicoterapia. I trattamenti classificati come parte della farmacoterapia includono farmaci antidepressivi, stabilizzanti dell'umore e antipsicotici. I trattamenti biologici alternativi possono essere la terapia elettroconvulsiva (ECT), la stimolazione magnetica transcranica (TMS), la stimolazione cerebrale profonda, la terapia della luce intensa, mentre la psicoterapia include la terapia cognitivo-comportamentale (CBT), il trattamento di attivazione comportamentale, la terapia interpersonale (IP) e la terapia familiare e coniugale.

Diversi antidepressivi si sono dimostrati efficaci nel trattamento della depressione. Tuttavia, i farmaci antidepressivi hanno un'efficacia clinica lenta, che è fondamentale per l'esito terapeutico e la *compliance* del

paziente, infatti le attuali farmacoterapie impiegano settimane o mesi per ottenere i loro effetti con un aumentato rischio di comportamento suicidario. Durante questo "ritardo terapeutico", il 15% dei pazienti che soffrono di MDD si suicida [1,2]. Questo è il motivo per cui la terapia elettroconvulsiva può essere il trattamento di scelta per i pazienti depressi agitati con un alto rischio di suicidio. Ulteriori problemi derivano dall'efficacia limitata di tutti i farmaci antidepressivi, poiché almeno il 20% di tutti i pazienti depressi sono refrattari a più antidepressivi diversi a dosi adeguate. In generale, se un paziente non risponde a un determinato antidepressivo dopo uno studio di 8 settimane su una dose adeguata, il passaggio a un altro antidepressivo con un diverso meccanismo d'azione è il ragionevole passo successivo (ad esempio, da SSRI a SNRI). Tutti questi problemi aumentano l'urgenza di trovare farmaci più attivi e con minori effetti collaterali.

I farmaci più comunemente usati, spesso indicati come antidepressivi di seconda generazione, sono gli inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina (SSRI) e gli inibitori della ricaptazione della serotonina-noradrenalina (SNRI), che hanno una maggiore efficacia e sicurezza rispetto ai farmaci più datati (cioè antidepressivi di prima generazione). Inibitori relativamente selettivi della ricaptazione della noradrenalina sono stati sviluppati anche come antidepressivi (ad esempio, maprotilina, reboxetina). Nei sistemi monoamminergici, la ricaptazione del

trasmettitore è il principale meccanismo con cui viene terminata la neurotrasmissione; pertanto, l'inibizione della ricaptazione può migliorare la neurotrasmissione, presumibilmente rallentando la *clearance* del trasmettitore e prolungandone il tempo di permanenza nella sinapsi. Gli inibitori della ricaptazione inibiscono SERT, NET, il trasportatore neuronale della noradrenalina (NE); o entrambi. Allo stesso modo, i farmaci di prima generazione, che includono inibitori delle monoammino ossidasi (IMAO) e gli antidepressivi triciclici (ATD), migliorano anche la neurotrasmissione monoaminergica: gli IMAO inibendo il metabolismo delle monoammine e migliorando così lo stoccaggio dei neurotrasmettitori nei granuli secretori, gli ATD inibendo la serotonina o 5-idrossitriptamina (5-HT) e la ricaptazione della noradrenalina. Sebbene efficaci, questi agenti di prima generazione mostrano effetti collaterali e interazioni farmacologiche e alimentari che limitano il loro uso rispetto ai farmaci più recenti. La crisi ipertensiva derivante da interazioni alimentari o farmacologiche è una delle tossicità potenzialmente letali associate all'uso degli IMAO. Gli alimenti contenenti tiramina sono un fattore causale. La MAO-A all'interno della parete intestinale e la MAO-A e la MAO-B nel fegato normalmente degradano la tiramina assunta con la dieta. Tuttavia, quando la MAO-A è inibita, l'ingestione di alcuni formaggi stagionati, vini rossi, crauti, fave e una varietà di altri alimenti contenenti tiramina porta all'accumulo di tiramina nelle terminazioni nervose adrenergiche e nelle vescicole dei

neurotrasmettitori inducendo il rilascio di noradrenalina ed epinefrina. Le catecolamine rilasciate stimolano i recettori postsinaptici periferici, aumentando la pressione sanguigna a livelli pericolosi (*cheese reaction*). Questi episodi possono essere revertiti da farmaci antipertensivi. Anche quando il paziente è molto attento, possono verificarsi disattenzioni dietetiche o l'uso di farmaci da prescrizione o da banco che contengono composti simpaticomimetici, con conseguente aumento potenzialmente letale della pressione sanguigna. Un altro problema grave e potenzialmente letale con la somministrazione cronica di IMAO è l'epatotossicità.

Alla luce di quanto sopra, è quindi evidente la necessità di fornire nuovi agenti terapeutici per i disturbi dell'umore in grado di superare i noti svantaggi della terapia dei disturbi dell'umore.

Gli effetti benefici di una dieta ricca di frutti, vegetali, frutta secca e ingredienti basati su vegetali (cereali integrali, olio di oliva, specialmente sulla prevenzione delle malattie cardiovascolari sono ben noti e generalmente riconosciuti [3]. In aggiunta, una nutrizione povera correla con alti livelli di colesterolo ematico, obesità, malattie cardiache, diabete e alcuni tipi di cancro.

In anni recenti, tuttavia, stanno emergendo evidenze di possibili effetti di una dieta ricca di frutta, vegetali, frutta secca, cereali integrali e olio d'oliva su vari aspetti della salute mentale.

Negli ultimi dieci anni, la psichiatria nutrizionale si

è sviluppata come area di ricerca promettente, in un ambito con grandi bisogni insoddisfatti. La nutrizione e la salute mentale sono interconnesse e si influenzano l'un l'altra. Si è visto che una nutrizione sana gioca un ruolo importante nell'inizio e nella severità di diversi disturbi della salute mentale, e infatti le persone con disturbi della salute mentale hanno spesso deficienze nutrizionali. Questo legame fra nutrizione e salute mentale è stato notato dapprima con la depressione [4].

I primi studi di osservazione e piccoli studi di intervento hanno puntato principalmente sui possibili effetti di una dieta ricca dei prodotti alimentari indicati sopra o sull'intero pattern dietetico che li contiene. Un esempio è la cosiddetta "dieta mediterranea", la dieta basata sui vegetali tipica delle regioni intorno al mar Mediterraneo dedite alla coltura dell'olivo. Questi reports hanno puntato maggiormente sulle performance cognitive [6], sulla prevenzione della depressione [7] e, genericamente, sul benessere psicologico [8]. Le evidenze disponibili suggeriscono che un aumentato consumo di frutta e vegetali è associato sia con benefici cognitivi che con benessere psicologico. Nel frattempo, nel fronte degli studi di intervento, hanno cominciato ad apparire sperimentazioni registrate, randomizzate e controllate [9]. Gli studi di osservazione e intervento sugli effetti dell'intero pattern dietetico sulla salute mentale, pur essendo strumenti molto potenti, non possono spiegare quali specifici frutti e vegetali né quali molecole sono

responsabili degli effetti osservati. Studi d'intervento con singoli frutti o vegetali sono necessari per valutare la possibile efficacia dei singoli tipi di frutti o vegetali sulla salute del cervello. Finora, vari studi in vitro e in vivo (questi ultimi su modelli animali e sull'uomo) hanno suggerito vari possibili effetti sul cervello di diversi frutti e vegetali freschi o processati, quali kiwi giallo (*Actinidia chinensis*, Planch.) [10], ribes nero, mirtillo, ciliegia, mirtillo rosso americano, uva, mele [11], succo d'arancia[12], cipolla e kiwi verde (*Actinidia deliciosa*) [13]. Le sperimentazioni in vivo consentono di testare i frutti/vegetali o le loro molecole (singole o in combinazione) nell'ambito del contesto complesso di un mammifero o anche di un umano ma, dall'altro lato, non sono generalmente in grado di occuparsi dei bersagli molecolari del trattamento. Le sperimentazioni in vitro possono fornire indicazioni precise su bersagli molecolari specifici ma non danno informazione sull'efficacia reale nell'intero organismo.

Circa il 25% dei pazienti con con dizioni neuropsichiatriche, inclusi disordini dell'umore e e schizofrenia, mostrano elevati livelli di infiammazione [14] e di stress ossidativo [15]. E' ampiamente riportato che una dieta salutare ha proprietà antiinfiammatorie, e potrebbe migliorare lo stress ossidativo fornendo composti con ben note proprietà antiinfiammatori e antiossidanti. Ad esempio, le vitamine, quali l'acido ascorbico (vitamina C) e l'alfa tocoferolo (vitamina E) hanno proprietà di *scavenging* diretto dei radicali

liberi [17]. Nutrienti quali il selenio, lo zinco e la cisteina sono co-fattori per i sistemi antiossidanti quale quello della glutatione perossidasi e della superossido dismutasi. Quindi, i frutti/vegetali possono agire su processi più generali che sono responsabili anche dei disordini neuropsichiatrici. Per quanto riguarda le possibili molecole responsabili delle attività osservate, pochissimi reports rivelano i precisi componenti molecolari che sono responsabili dell'attività di frutti/vegetali (un esempio è l'identificazione di due composti fitochimici in una preparazione da succo d'uva Concorde responsabili della riduzione dello stress e dell'infiammazione periferica [18]).

L'identificazione delle precise molecole attive di frutti/vegetali è complicata dal fatto che alcuni effetti biologici di frutti e vegetali possono dipendere da effetti additivi, sinergici e antagonisti fra componenti del fito-complesso, più che da molecole individuali, e questo rende la faccenda più difficile [19].

I frutti di Actinidia possono essere descritti come bacche con molti semi racchiusi da un pericarpo succoso. La revisione più recente del genere riconosce 55 specie e 20 varietà. Tradizionalmente, la composizione del frutto è stata considerata primariamente nei termini di componenti nutritivi (proteine, lipidi, carboidrati, vitamine e minerali). Il kiwi è spesso considerato come un frutto ad alto contenuto di fibra; tuttavia, se confrontato con altri frutti, il suo contenuto di fibre

non è particolarmente alto; con il suo 2-3% di fibre su peso fresco è simile a quello di mele, arance e banana. Il frutto è anche ricco di metaboliti secondari specializzati appartenenti alle classi chimiche dei carotenoidi, composti fenolici, flavonoidi, vitamine, clorofille e acidi organici. I metaboliti secondari giocano un ruolo nell'interazione della cellula col suo ambiente, rappresentato da altre cellule nell'organismo, o da organismi esterni o fattori abiotici, ad esempio, nel caso dell'intera pianta, possono attirare gli impollinatori o difenderla da pesti e malattie[20].

Come metaboliti secondari principali, il frutto di *Actinidia deliciosa* contiene composti fenolici e indolalcaloidi (triptamina e serotonina). I fenoli sono un ampio gruppo di composti caratterizzati da una struttura chimica contenente almeno un gruppo fenolico. I composti fenolici sono stati associati con attività antiossidante e sono stati intensamente studiati perché ritenuti salutari per i consumatori. Nel cibo derivato dalle piante i composti fenolici sono suddivisi in due grandi gruppi noti come acidi fenolici e flavonoidi.

La triptamina e la 5 idrossi triptamina sono metaboliti secondari appartenenti alla classe degli indolalcaloidi, e più in particolare sono indolamine formate da uno scheletro indolico con una catena laterale del tipo etilamina, entrambe derivate dall'aminoacido triptofano. Questi composti sono stati visti essere ampiamente diffusi nei regni dei viventi, dai batteri agli eucarioti superiori, con distribuzione e funzioni molto differenti [21].

Il frutto del kiwi è anche riconosciuto come una enorme fonte dietetica di vitamina C, potassio e acido folico, inoltre contiene livelli relativamente alti di vitamina E che sono associati con effetti antinfiammatori. Per molti anni si è assunto che la vitamina E del kiwi fosse contenuta in maniera predominante nei semi in associazione con il contenuto oleoso, e non fosse bio-disponibile dato che i semi generalmente esistono alla digestione. Tuttavia, analisi più recenti hanno mostrato che la forma principale di vitamina E, l' α -tocoferolo, è nella polpa, probabilmente associata con le membrane cellulari, e perciò potenzialmente bio-disponibile [22]. Le proteine rappresentano un componente minore ma significativo del frutto. Le proteine crude tipicamente rappresentano circa l'1% del peso fresco; tuttavia, le proteine solubili sono molto meno, intorno allo 0.3%. Nel kiwi verde, l'actinidina è la proteina solubile predominante, rappresentando fino al 40% delle proteine solubili.

A dispetto dei suoi componenti che sono benefici per la salute e per la nutrizione, il kiwi contiene un certo numero di elementi che possono essere dannosi per la salute, in particolare allergeni e ossalati.

È ben noto che la ricerca sugli animali è stata per decenni parte integrante della scoperta scientifica e dello sviluppo di farmaci terapeutici anche perché molte risposte agli stimoli sono ben conservate tra le specie di mammiferi. Per questo motivo, i modelli animali, in particolare i roditori, sono potenzialmente rilevanti per i disturbi umani. I risultati che sono stati

agevolati attraverso la modellazione animale della patologia sono inestimabili, dimostrando la loro necessità nel promuovere la comprensione della fisiopatologia e del trattamento umano.

Per testare le teorie neurobiologiche delle comuni malattie umane e per sviluppare nuovi bersagli per la scoperta di farmaci, sono necessari modelli animali validi. Ci sono stati solo pochi criteri proposti per ciò che costituisce un modello animale ideale, e piccoli adattamenti hanno sviluppato questi criteri per comprendere valutazioni e interpretazioni più complesse, infatti ci si aspetta che i modelli animali abbiano una validità di forma, di costrutto e predittiva. La questione dei criteri di validità è stata sollevata da McKinney & Bunney [23], gli autori hanno proposto che:

- un modello animale dovrebbe ricapitolare la maggior parte dei sintomi principali del disturbo da modellare (validità di forma);

- i sintomi indotti dal modello dovrebbero essere malleabili all'intervento farmacologico (validità predittiva) e dovrebbero essere simili, in base a ciò che è noto sul disturbo umano, sulla condizione modellata, all'eziologia della malattia (validità di costrutto).

Molti modelli soddisfano più di un criterio di validità e, man mano che la comprensione della biologia sottostante ai disturbi avanza, è possibile estendere i criteri per includere la "validità biologica". Recentemente c'è stata una spinta per modelli animali biologicamente più rilevanti il cui requisito principale

è quello di imitare i correlati neurobiologici delle malattie (validità patologica); tali modelli richiedono strumenti complessi, e questa è un'area di ricerca in rapida crescita [24].

Per quanto riguarda i modelli animali di depressione, ad oggi sono stati trovati molti diversi tipi di stress per indurre vari comportamenti simili alla depressione nei roditori. Una delle prime forme di modelli basati sullo stress è stata l'applicazione di scosse elettriche alla zampa che porta ad una risposta comportamentale chiamata "impotenza acquisita". Questo fenomeno comportamentale significa acquisizione di un approccio passivo per far fronte allo stress, che si verifica dopo diverse esposizioni in condizioni inevitabili e si manifesta come un fallimento nel fuggire dallo shock quando viene fornita una via di fuga.

Il coping passivo è diventato un punto focale dell'attenzione in un altro modello, il test di nuoto di Porsolt [25], comunemente indicato come test del nuoto forzato (FST). Porsolt ha scoperto che i ratti posti in un cilindro con acqua in una condizione inevitabile prima mostrano tentativi attivi di fuga e nuotano vigorosamente intorno al cilindro, tuttavia entro pochi minuti diventano meno attivi e infine ricorrono al galleggiamento passivo, con un movimento minimo quanto basta per mantenere la testa sopra l'acqua. Questa risposta è stata soprannominata "disperazione comportamentale", in quanto sembra riflettere gli animali che "rinunciano" alla loro possibilità di sfuggire all'acqua. La disperazione comportamentale può

anche essere innescata in un test di sospensione della coda (TST), in cui i topi appesi dalla coda passano da tentativi iniziali di lotta e arrampicata all'immobilità passiva [26]. La validità di questi modelli si basa principalmente sulla loro sensibilità al trattamento antidepressivo. In effetti, gli antidepressivi appartenenti alla maggior parte delle classi somministrati in modo acuto e cronico hanno dimostrato di ritardare l'insorgenza dell'impotenza acquisita e della disperazione comportamentale nel FST e nel TST [27,28]. Il principale punto di forza di questi modelli è la loro capacità di selezionare rapidamente nuovi composti e per questo motivo sono diventati un *gold standard* per lo screening precoce di nuove molecole con presunti effetti antidepressivi.

Secondo la presente invenzione è stato ora scoperto che l'acido chinico (QA), un metabolita secondario specializzato del kiwi, assunto da solo o in combinazione con lo stesso acido caffeico del kiwi, mostra attività antidepressiva in due modelli animali di riferimento per comportamento depressivo nei topi.

L'acido chinico [acido-(3R,5R)-1,3,4,5-tetraidrossicicloesancarbossilico] e i suoi derivati sono composti contenenti la struttura molecolare dell'acido chinico, formata da un anello di cicloesano recante un residuo acido carbossilico in posizione 1 e quattro gruppi idrossilici nelle posizioni 1,3,4 e 5 come illustrato nella Figura 1a. La prima scoperta dell'acido chinico si deve al chimico francese Nicholas-Louis Vauquelin che lo descrisse per la prima volta nella pianta medicinale *Chincona officinalis* L.. Successivamente, l'acido chinico venne ampiamente studiato

finchè nel 1932 Fischer e Dangschat ne delucidarono la struttura e le proprietà stereochimiche, studiando anche la relazione tra l'origine biogenetica degli acidi chinico, gallico e shikimico (Figura 1).

Essi scoprirono che questi tre acidi hanno una comune origine biogenetica e che la presenza dell'acido chinico, può essere correlata in veste di precursore alla via dello shikimato, un importante processo biochimico che si articola in più passaggi all'interno della cellula. La via dello shikimato è utilizzata come via di biosintesi da batteri, piante, archeobatteri e altri organismi e fornisce i precursori per la sintesi degli aminoacidi aromatici (Figura 2).

È interessante notare che l'acido chinico può costituire una fonte di carbonio, unica o alternativa, in diversi microrganismi (per esempio *Aerobacter aerogenes* e *Klebsiella pneumonia*). In natura, l'acido chinico è ampiamente diffuso all'interno delle piante, come nei chicchi di caffè, nella corteccia di *Cinchona* (L.), nella corteccia di *Eucalyptus globulus* (Labill.), nelle foglie di tabacco o di *Urtica dioica* L. [29]. Tuttavia, l'acido chinico si trova raramente nei vegetali in forma libera ed è principalmente e più abbondantemente presente in forma esterificata assieme ad altri metaboliti secondari, in particolare agli acidi idrossicinnamici, come l'acido caffeico, producendo in tal caso l'acido clorogenico (CGA) (Figura 2). In questa forma è diffuso all'interno del regno vegetale con un'attività protettiva contro gli attacchi microbici [30].

In natura, l'acido chinico può essere prodotto dal D-glucosio attraverso quattro reazioni enzimatiche, alcune in comune con la via dello shikimato. La via di biosintesi inizia convertendo il D-glucosio in D-eritrosio-4-fosfato tramite l'enzima transchetolasi. Ad esso viene aggiunto il fosfoenolpiruvato formando l'acido 3-desossieptulosonico

(DAHP). L'enzima DHQ sintasi converte il DAHP in acido 3-deidrochinico (DHQ), che viene a sua volta convertito in acido chinico dall'enzima DHQ deidrogenasi. L'acido chinico può anche essere prodotto dall'acido shikimico per azione dell'enzima chinato idrolasi, come mostrato in Figura 2.

I derivati dell'acido chinico, in particolare quelli derivati dagli acidi fenolici, hanno mostrato un ampio spettro di azioni antitumorali, antiossidanti, antinfiammatorie, neuroprotettive ed epatoprotettive nel trattamento di vari tipi di cancro e malattie correlate al sistema nervoso centrale [31]. Ad esempio, l'acido (-)-4-O-(4-O- β -D-glucopiranosilcaffeoil)chinico ha mostrato attività antitumorale contro il cancro del colon umano [32].

L'acido caffeico (acido 3-(3,4-diidrossifenil)-2-propenoico) (Figura 3) è un composto fenolico naturale appartenente alla classe degli acidi idrossicinnamici (acido cumarico, acido caffeico, acido ferulico e sinapico e loro derivati), una classe di acidi aromatici che ha una struttura fenilpropanoide (C6-C3) con un anello aromatico 3,4-diidrossilato recante un residuo di acido carbossilico alla fine di una catena di transetilene. Questi composti sono idrossiderivati dell'acido cinnamico prodotto dal metabolismo secondario dei vegetali, nei quali risulta ampiamente distribuito [33].

L'acido caffeico si trova in forma semplice (monomeric) come acidi organici esterificati, esteri di zuccheri, ammidi e glicosidi (ad esempio acido caffeico 3- β -D-glucoside), o in forme più complesse come dimeri, trimeri e derivati di flavonoidi, oppure possono anche essere legati a proteine e altri polimeri nella parete cellulare dei vegetali. CA partecipa al meccanismo di difesa delle piante contro predatori, parassiti e infezioni, in quanto ha un effetto inibitorio sulla crescita di insetti, funghi e batteri e promuove anche la protezione delle foglie delle piante contro

le radiazioni ultraviolette B (UV-B) [33].

La biosintesi di questo composto nelle piante avviene attraverso la via endogena dello shikimato, responsabile della produzione di aminoacidi aromatici dal glucosio. La biosintesi inizia con l'acido shikimico che subisce tre reazioni enzimatiche: la prima è una fosforilazione mediata dall'enzima shikimato-chinasi, seguita dalla coniugazione di una molecola di fosfoenolpiruvato, mediata dalla 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSP) sintasi ed infine la sintesi di acido corismico mediata dall'enzima corismato sintetasi, uno degli intermedi metabolici più importanti di questa via. Questo viene trasformato in acido pterfenico attraverso l'enzima corismato mutasi (un precursore della L-fenilalanina). La formazione di L-fenilalanina è mediata dal piridossalfosfato (PLP) come coenzima nel processo di deaminazione e dalla nicotinamide adenina dinucleotide (NAD) come scambiatore di elettroni. La deaminazione della L-fenilalanina da parte dell'enzima fenilalanina ammonio liasi (PAL), forma acido cinnamico. Questo viene poi convertito in acido p-cumarico dalla cinamato-4-idrossilasi (C4H) e infine in acido caffeico attraverso l'enzima 4-cumarato 3-idrossilasi (C3H) [33] (Figura 3).

L'acido caffeico mostra un'ampia gamma di effetti benefici per la salute tra cui proprietà antinfiammatorie, antitumorali, antitrombotiche, antipertensive, antifibrotiche, antivirali, antiossidanti e antitumorali [33]. L'attività antiossidante probabilmente deriva dalle proprietà di *scavenging* contro i radicali liberi. Inoltre, inibisce la perossidazione lipidica e protegge il DNA dal danno ossidativo. L'acido caffeico ha anche dimostrato di avere promettenti effetti benefici in modelli animali per il morbo d'Alzheimer [34].

Inoltre, l'acido caffeico ha dimostrato di prevenire la

neurotossicità indotta dall'acroleina *in vitro*. L'azione tossica dell'acroleina mima molti meccanismi che sono alla base dei percorsi neurodegenerativi, come quelli attivati nell'AD. Il pretrattamento delle cellule con acido caffeico ne riduce la neurotossicità, riduce il livello di ROS, ed esercita anche un'attività antiossidante indiretta proteggendo il glutathione, antiossidante endogeno essenziale[35].

Secondo la presente invenzione, è stata prima valutata e poi confermata la capacità del kiwi di ridurre il tempo di immobilità sia nel TST che nel FST, e quindi di esercitare un'attività antidepressiva, su topi trattati cronicamente per 10 giorni con succhi di frutta attraverso la somministrazione di gavage intragastrico (IG). Dopo aver completato i test comportamentali, i topi sono stati sacrificati per raccogliere campioni di siero e cervello per l'analisi metabolomica e i dati comportamentali sono stati quindi confrontati con i dati analitici. Inoltre, sono stati condotti esperimenti di farmacocinetica (PK) per stimare l'assorbimento e la clearance dei composti selezionati del kiwi.

A seguito dell'esecuzione di esperimenti in vivo in cui si è effettuata la somministrazione cronica di succo di kiwi in modelli animali, il soggetto proponente ha scoperto che solo pochissimi nuovi metaboliti possono essere trovati sia nel siero di topo che nel cervello dopo la somministrazione del succo. Tra essi, il soggetto proponente ha riconosciuto l'acido chinico (QA), un metabolita secondario specializzato del kiwi, e il solfato di acido caffeico (CA-solfato), un metabolita di topo prodotto dall'acido caffeico del kiwi. Quest'ultimo è abbondantemente presente nel metaboloma del succo di kiwi sotto forma di vari glucosidi ed esteri. Pertanto, secondo la presente invenzione, i possibili effetti

di queste due molecole sono stati analizzati più in dettaglio. In particolare, secondo la presente invenzione, il kiwi (cioè il frutto di *Actinidia deliciosa*, il kiwi "verde") è stato originariamente scelto proprio sulla base di precedenti fonti riportanti l'attività antidepressiva del frutto e del suo parente stretto *Actinidia chinensis* (il kiwi giallo) [10,13]. Inoltre, altre indagini hanno suggerito la capacità del kiwi verde di esercitare attività a livello cerebrale, come il miglioramento della qualità del sonno in giovani e adulti con problemi di sonno, e di mostrare attività antidepressiva in modelli pre-clinici (36,13). Inoltre, il kiwi verde contiene una quantità rilevante di serotonina e il suo precursore vegetale, la triptamina (dati non mostrati). In linea di principio, sia la serotonina che il suo derivato, la melatonina, potrebbero essere coinvolti nel miglioramento del sonno, anche se la melatonina non è mai stata rilevata nella presente analisi. Anche il precursore vegetale della serotonina, l'indolamina triptamina, potrebbe agire nello stesso contesto, poiché può comportarsi come agonista della serotonina [37].

La serotonina e la triptamina assunte tramite la dieta non sono generalmente biodisponibili perché diventano substrato degli enzimi MAO-A e B intestinali, ma non è possibile escludere un loro eventuale ruolo quando si consuma un fitocomplesso come quello presente in frutta e verdura e si considera l'attività sinergica tra i suoi diversi componenti o tra una combinazione di essi. Ad esempio, la birra sciamanica ayahuasca conserva le proprietà allucinogene della dimetiltriptamina (DMT) contenuta nell'erba *Psychotria viridis*, Ruiz & Pav grazie all'attività MAO-inibitoria delle β -carboline (armina, armalina e tetraidroarma) di *Banisteriopsis caapi*, (Griseb.) Morton [38]. Pertanto, in linea di principio, possibili componenti MAO-A MAO-B

inibitori presenti nel kiwi potrebbero cambiare il destino della serotonina e della triptamina del frutto rendendole più biodisponibili una volta consumato.

Come accennato in precedenza, i risultati sperimentali effettuati dal soggetto proponente e descritti nell'esempio indicano che la somministrazione orale di kiwi ha un effetto antidepressivo. Inoltre, in base alla presente invenzione, sono stati identificati i metaboliti del kiwi eventualmente candidati per questa attività. Secondo la presente invenzione, negli esperimenti comportamentali i dati di diversi gruppi di trattamento sono stati confrontati con il controllo negativo, che era una soluzione di veicolo, un mix dei metaboliti primari più abbondanti del kiwi senza alcuna attività.

TST e FST sono stati adottati come paradigma comportamentale per valutare il comportamento simil-depressivo anche se ci sono molti altri test comunemente usati per valutare questo tema poiché questi test sono altamente sensibili e vengono regolarmente utilizzati per valutare la potenza dei farmaci antidepressivi. Inoltre, la somministrazione intragastrica (IG) è stata scelta perché permette di controllare esattamente la dose somministrata, e perché imita la reale assunzione del fitocomplesso rispetto ad altri tipi di somministrazione.

L'estratto di kiwi riduce notevolmente il tempo di immobilità dei topi sia nel TST che nel FST anche rispetto al controllo positivo, farmaco comunemente utilizzato nel trattamento clinico della depressione, senza causare compromissione locomotoria, come riportato dai dati OFT.

Nell'esempio, la fluoxetina (FLX) a 20 mg/kg è stata usata come controllo positivo, poiché questa dose è paragonabile ai livelli plasmatici dei pazienti in trattamento con la stessa secondo Dulawa e colleghi [39] sia in regime acuto che cronico.

Tuttavia, nel FST il controllo positivo non ha funzionato come riportato in letteratura con questo ceppo di topi [40]. Ciò è probabilmente dovuto alla cosiddetta sindrome serotoninergica, una malattia grave che nell'uomo appare comunemente dopo sovradosaggio di antidepressivi o dopo aver combinato diversi farmaci psicotropi. Questa tossicità acuta dovuta alla 5-HT è stata caratterizzata nei topi dall'espressione di alcune risposte comportamentali e fisiologiche come: *hind limb abduction, forepaw treading, backward movement, straub tail, head weaving, tremor and low flat posture* [41]. Non è stata osservata alcuna compromissione locomotoria nel test OFT effettuato due giorni prima della fine del trattamento cronico (Giorno 8) anche se è riportato in letteratura che la compromissione motoria, se si verifica, potrebbe comparire dopo 3-4 giorni di trattamento cronico [39]. Per questo motivo, nei seguenti esperimenti il controllo positivo è stato cambiato con un altro farmaco SSRI, l'Escitalopram.

Secondo la presente invenzione, i dati analitici di UPLC-ESI-MS rivelano due potenziali molecole di kiwi (acido chinico e acido caffeico) candidate per l'attività comportamentale osservata, presenti nel siero e nel cervello di topi somministrati con il kiwi. Queste due molecole mostrano livelli sierici e cerebrali che

diminuiscono linearmente con l'aumento delle diluizioni di kiwi somministrate ($kiwi_1 > kiwi_2 > kiwi_3$).

Inoltre, la "farmacocinetica" di questi metaboliti del kiwi è stata eseguita in topi trattati con la più alta diluizione di kiwi ($kiwi_1$) e la quantificazione relativa in campioni di cervello e siero è stata valutata con la tecnica UPLC-ESI-MS per un periodo di 24 ore. L'accumulo è stato molto rapido, poiché i livelli di entrambi i metaboliti diminuiscono al livello basale tra 8 e 24 ore.

L'approccio di studiare la biodisponibilità di singole molecole dopo somministrazione/consumo di un intero frutto come strumento per identificare possibili candidati di neuroattività è già stato utilizzato positivamente da Wang e collaboratori [22] grazie al quale sono stati in grado di identificare due molecole attive, l'acido diidrocaffeico (DHCA) e la malvidina-3'-O-glucoside (Mal-gluc), dopo la somministrazione della soluzione di succo d'uva Concord.

Pertanto, è stato analizzato un gruppo di animali trattati con la stessa diluizione di kiwi ($kiwi_1$) sottoposti ad un approccio di perfusione per valutare la possibile penetrazione cerebrale dei due metaboliti di interesse; i livelli cerebrali dopo la perfusione erano circa la metà del livello degli animali non perfusi, confermando che parte di queste molecole è in grado di passare la BBB. Questi dati confermano il passaggio di entrambe le molecole nel parenchima cerebrale.

La tecnica di perfusione con soluzione salina fredda è ampiamente utilizzata per rimuovere il sangue

dal cervello o da altri tessuti bersaglio in varie indagini sul cervello, principalmente perché in molti casi il sangue potrebbe interferire con la successiva analisi [18, 42] o, nel caso del cervello omogeneizzato, le molecole presenti nei vasi cerebrali potrebbero influenzarne l'analisi.

Come in questo lavoro, Wang e collaboratori [43] hanno usato questa tecnica per valutare la capacità di vari metaboliti polifenolici di passare la BBB.

Come descritto nell'esempio della presente invenzione, in un trattamento cronico di 10 giorni con diverse diluizioni di kiwi su TST e FST nei topi, il kiwi alla massima diluizione, il cosiddetto Kiwi 1, ha fortemente ridotto il tempo di immobilità nei test sopra menzionati senza causare alcuna alterazione locomotoria. Inoltre, pochi metaboliti del kiwi sono stati trovati nel siero e nel cervello dei topi trattati con kiwi rispetto ai controlli, e due di questi sono stati identificati: uno, l'acido chinico, è un metabolita del kiwi, mentre l'altro, l'acido caffeico solfatato, è un metabolita organico dello stesso. Né la serotonina o la triptamina sono risultate diverse nel siero o nel cervello degli animali trattati con kiwi rispetto al gruppo di controllo.

I livelli di acido chinico e di acido caffeico solfato sono stati valutati mediante spettrometria di massa. Inoltre, sono stati condotti esperimenti PK su animali nutriti con kiwi per valutare l'assorbimento e l'eliminazione dei due composti. Inoltre, la penetrazione cerebrale è stata valutata in animali

trattati con i due metaboliti dopo tecnica di perfusione transcariaca. Il livello cerebrale post-perfusione di QA e CA-solfato era inferiore rispetto ai campioni non perfusi (circa la metà), ma ancora rilevabile, dimostrando che le due molecole superano la barriera emato-encefalica e sono in grado di entrare nel parenchima cerebrale.

Successivamente, i due singoli metaboliti specializzati del kiwi sono stati valutati negli stessi paradigmi comportamentali dopo un regime di 10 giorni in trattamento cronico.

A tal fine, è stata prima accuratamente determinata la quantità assoluta di questi metaboliti nel succo di kiwi e poi questi metaboliti sono stati somministrati, da soli o in combinazione, ai topi alla stessa concentrazione dell'estratto di kiwi non diluito (kiwi 1).

Il livello di acido chinico nel succo di kiwi utilizzato nell'esempio era di ~492 mg/100 g di frutto fresco, in linea con quello riportato in letteratura (390 mg/100 g di peso fresco) [44], mentre i livelli dei tre esosidi di acido caffeico rilevati nel kiwi erano di ~6,5 mg/100 g di frutto fresco. Per quanto noto al soggetto proponente, questo è il primo report ad attestare una quantificazione di acido caffeico 3- β -D-glucoside poiché in letteratura è già stato rilevato ma mai quantificato [45].

Quando QA e CA-glucoside sono stati somministrati ai topi, da soli e in combinazione, alla stessa concentrazione dell'estratto di kiwi non diluito, QA è stato in grado di mimare parzialmente l'effetto di kiwi 1 mostrando un effetto marcato, anche se non così elevato come quello del kiwi 1, nel ridurre il tempo di immobilità in entrambi i test

comportamentali. Invece, il CA-glucoside somministrato da solo non ha mostrato alcun effetto, mentre la combinazione delle due molecole ha mostrato un effetto sinergico nel TST. Poiché in precedenti esperimenti comportamentali si sono verificati alcuni problemi con il controllo positivo FLX, in questo esperimento il controllo è stato sostituito con escitalopram 10 mg / kg, un farmaco SSRI più selettivo che ha funzionato su entrambi i test. Tutti i gruppi trattati sono stati anche valutati per determinare il grado di compromissione motoria in OFT al giorno 8 e il fatto che non sia stata rilevata alcuna compromissione ha suggerito che la riduzione dell'immobilità fosse dovuta all'effetto antidepressivo.

Pertanto, il kiwi ha mostrato di possedere un'attività antidepressiva piuttosto forte, anche se la serotonina e la triptamina del frutto non sono state in grado di raggiungere il sangue o il cervello mentre un metabolita precedentemente non considerato, l'acido chinico, è risultato essere sia in grado di raggiungere il sangue e il cervello, passando la barriera emato-encefalica, sia di essere almeno parzialmente responsabile dell'attività antidepressiva del kiwi.

In forma libera, l'acido chinico libero si trova a bassi livelli (< 100 mg / 100 g di peso fresco) in frutta e verdura [46]. I frutti carnosì maturi generalmente accumulano gli acidi citrico e malico come principali acidi organici invece dell'acido chinico, e i frutti commestibili con alti livelli di acido chinico sono rari. Le eccezioni includono il chokeberry nero (*Aronia melanocarpa*, Michx., Elliot) [47] e il kiwi [44]. L'acido chinico in forma libera si trova anche in alcuni alimenti trasformati a causa dell'idrolisi degli esteri che avviene, ad esempio, durante la tostatura dei chicchi di caffè.

La letteratura negli ultimi anni ha ampiamente focalizzato

l'attenzione sui derivati dei CGA e sul loro metabolismo con studi sia *in vitro* che *in vivo* mentre il destino metabolico dell'acido chinico è stato finora trascurato. La biodisponibilità del QA puro non è riportata in letteratura, ma la sua rilevazione nel siero umano dopo il consumo di caffè suggerisce che può raggiungere il sangue [48]. Al giorno d'oggi, in letteratura è presente un solo articolo che quantifica il recupero dell'acido chinico dopo il consumo di frullati di mele nell'uomo [49].

Altri lavori si sono focalizzati sulle azioni di questo metabolita tramite approcci *in vitro* e *in vivo*. È stato così scoperto che QA è attivo, per esempio, nel rilascio di insulina dalle cellule β pancreatiche rendendolo un possibile strumento terapeutico contro il diabete, nella riduzione dell'attivazione dell'espressione mediata dal $\text{TNF}\alpha$ della molecola di adesione riducendo pertanto l'infiammazione vascolare e nell'aver anche attività radioprotettiva contro i raggi X [50,51,52]. Inoltre, il QA è già utilizzato nella creazione di nanoparticelle nelle quali svolge il compito di veicolare i farmaci verso i tumori solidi essendo in grado di interagire con le selectine endoteliali mimando i loro ligandi [53].

È interessante notare che quando QA e CA-solfato sono stati quantificati (quantificazione relativa) nel siero e nel cervello dei topi, i loro livelli nel trattamento singolo o combinato (entrambe le molecole) erano inferiori rispetto a quelli rilevati per la diluizione del kiwi 1, anche se le concentrazioni dei metaboliti somministrati agli animali erano le stesse. Ciò suggerisce che altre molecole presenti nel frutto intero siano necessarie per la stabilità e/o il "corretto" assorbimento intestinale dei due metaboliti. Tuttavia, gli esperimenti di perfusione hanno dimostrato che l'acido chinico somministrato da solo era in grado di

raggiungere il parenchima cerebrale, ma ha mostrato una minore penetrazione nel cervello rispetto all'intero trattamento con kiwi.

Inoltre, le analisi di "farmacocinetica" condotte in una finestra di 24 ore su siero e cervello di topi trattati con QA rivelano che il suo accumulo è stato molto rapido, poiché i livelli di questo metabolita diminuiscono alla linea di base tra le 8 e le 24 ore. Questi dati sono in linea con dati precedenti ottenuti su topi nutriti con kiwi anche se le quantificazioni relative sono inferiori.

Gli effetti dei metaboliti secondari presenti in frutta e verdura fresca sono difficili da rivelare non solo a causa del gran numero di molecole diverse, ma anche perché la loro attività potrebbe dipendere dalla biodisponibilità di ogni singolo metabolita e dagli effetti additivi, sinergici e antagonisti tra di essi [54]. Ci sono una serie di fattori che influenzano la biodisponibilità dei metaboliti in un individuo; per quanto riguarda i polifenoli, ad esempio, questa può essere influenzata da molti fattori tra cui la composizione microbica del colon, la dose consumata e la presenza di altri polifenoli e macronutrienti all'interno della matrice alimentare. Inoltre, sono limitati gli studi circa le interferenze che occorrono nella bioaccessibilità e biodisponibilità delle sostanze fitochimiche e dell'impatto che queste hanno sulla loro bioattività.

La sinergia e l'antagonismo sono notoriamente difficili da studiare in modo rigoroso poiché la metodologia di ricerca applicata alla chimica dei prodotti naturali è tipicamente dedicata ad una riduzione della complessità e all'identificazione dei singoli costituenti attivi per lo sviluppo di farmaci [55].

La sinergia nelle attività biologiche può derivare da combinazioni fitochimiche che possono favorire la solubilità,

la sicurezza, l'assorbimento, la stabilità o la biodisponibilità dei principali composti attivi.

Un fenomeno meno discusso è l'antagonismo, in cui gli effetti dei costituenti attivi sono mascherati da altri composti in una miscela complessa.

Questo spiega, in generale, perché nessun singolo composto possa sostituire la combinazione di sostanze fitochimiche naturali presenti in frutta e verdura per ottenere effetti benefici verso la salute.

In questo caso, i dati dimostrano che QA somministrato da solo possiede un effetto marcato in linea con l'estratto di kiwi non diluito, ma l'attività minore è ben correlata con i livelli più bassi sia nei campioni di siero che di cervello. Ciò conferma che l'intero fitocomplesso potrebbe essere importante nella stabilità e nell'assorbimento ma non necessariamente nell'attività.

Solo il QA ma non il CA-glucoside era attivo nel ridurre il tempo di immobilità in entrambi i test, sebbene fosse meno efficiente dell'intero fitocomplesso del kiwi. Inoltre, quando somministrate in combinazione, le due molecole sembravano avere un effetto sinergico che si manifesta solo nel TST. Gli esperimenti di PK e perfusione hanno dimostrato che il QA somministrato da solo aveva un assorbimento e una penetrazione nel cervello inferiori rispetto all'intero frutto. Pertanto, il QA somministrato da solo alla stessa concentrazione trovata nell'intero frutto può parzialmente mimare l'attività antidepressiva del kiwi nei topi, indicando che il QA è una delle molecole antidepressive attive sebbene la sua attività sia inferiore rispetto al kiwi.

La completa attività, la biodisponibilità e la penetrazione nel cervello dei due metaboliti del kiwi potrebbero richiedere altre molecole presenti nel frutto la cui presenza potrebbe essere fondamentale per il corretto assorbimento intestinale

e/o stabilità nei topi.

Inoltre, una combinazione di molecole aggiuntive, che si riteneva fossero presenti in tracce poiché non rilevate dalla piattaforma estremamente sensibile dell'UPLC-ESI-MS, potrebbe essere responsabile di parte dell'attività antidepressiva dell'intero frutto, probabilmente agendo in sinergia tra loro, chiarendo quindi i minori effetti comportamentali e analitici osservati nei trattamenti a singola molecola. L'attività sinergica dei metaboliti secondari è ben nota in letteratura e potrebbe spiegare i dati attuali ottenuti somministrando QA e CA-glucoside assieme.

Sulla base della dose efficace di succo di kiwi e dell'esatta quantificazione di QA e CA-solfato ottenuti mediante spettrometria di massa, si può ipotizzare di traslare questo effetto antidepressivo nell'uomo a circa 700 grammi di kiwi/giorno.

Una delle principali limitazioni nell'utilizzo di metaboliti secondari vegetali in terapia è la possibile bassa stabilità e biodisponibilità di queste molecole negli animali e nell'uomo, infatti l'acido chinico, l'acido caffeico e il CGA sono scarsamente assorbiti attraverso il sistema digerente nell'uomo e negli animali. In particolare, per quanto riguarda l'acido chinico, la flora intestinale svolge un ruolo cruciale nella conversione dell'acido chinico in acidi benzoico e ippurico, probabilmente diminuendo notevolmente la sua biodisponibilità. In tal modo, lo sviluppo di nuovi sistemi di somministrazione dei metaboliti della frutta, come ad esempio l'utilizzo di nanoparticelle come integratori alimentari, potrebbe superare questo problema.

Inoltre, poiché i prodotti nutraceutici di cui sopra mostrano una lunga storia di consumo sicuro, potrebbero essere prontamente utilizzati come coadiuvanti nel trattamento della depressione, poiché non richiedono il controllo da parte di

agenzie di regolamentazione come FDA ed EMA.

Pertanto, è un oggetto specifico della presente invenzione un prodotto consistente in

a) acido chinico, un suo derivato o un suo precursore,
o

b) una composizione farmaceutica comprendente o consistente in acido chinico, un suo derivato o precursore, come principio attivo, insieme a uno o più eccipienti e/o coadiuvanti farmaceuticamente accettabili per l'uso nel trattamento di un disturbo dell'umore.

Secondo la presente invenzione, il prodotto consistente in a) o b) non è un kiwi o un pompelmo di per sé, ad esempio sotto forma di estratto vegetale concentrato, tuttavia, detto acido chinico, un derivato o un suo precursore può essere isolato da kiwi o pompelmo nonché da altre piante comprendenti detti composti.

Secondo la presente invenzione, il disturbo dell'umore, che può essere trattato con il prodotto della presente invenzione, può essere scelto dal gruppo costituito dal disturbo depressivo, come disturbo depressivo maggiore (MDD), disturbo depressivo persistente (distimia), disturbo depressivo indotto da sostanze/farmaci e disturbo depressivo dovuto a un'altra condizione medica, disturbi disforici premestruali, disturbo da disregolazione dell'umore dirompente.

In accordo con la presente invenzione, tali derivati possono essere scelti dal gruppo consistente di un estere o un etere dell'acido chinico con uno zucchero o di un estere dell'acido chinico con un acido organico, di un'amide dell'acido chinico con un metabolita contenente azoto, quali un aminoacido, di un sale dell'acido chinico farmacologicamente accettabile.

Secondo la presente invenzione, lo zucchero può essere un monosaccaride, come ad esempio un esoso, un pentoso, un desossiesoso, o un oligosaccaride.

Per quanto riguarda l'estere dell'acido chinico con uno zucchero, secondo la presente invenzione, può essere scelto dal gruppo consistente in chinoil glucosio, chinoil galattosio, mentre l'etere dell'acido chinico con uno zucchero è l'acido chinico glicoside.

Secondo la presente invenzione, l'acido organico può essere scelto dal gruppo consistente in acidi organici aromatici farmaceuticamente accettabili come l'acido cinnamico, gli acidi idrossicinnamici, gli acidi benzoico e idrossibenzoico, o acidi organici alifatici come l'acido malico, l'acido citrico, l'acido isocitrico, l'acido fumarico, l'acido lattico, l'acido malonico, l'acido succinico, l'acido tartarico, a condizione che l'acido caffeico sia escluso.

Pertanto, secondo la presente invenzione, l'estere dell'acido chinico con un acido organico può essere ad esempio un estere dell'acido chinico con acido cinnamico, con un acido idrossicinnamico, con un acido benzoico, con un acido idrossibenzoico, con acido malico, con acido citrico, con acido isocitrico, con acido fumarico, con acido lattico, con acido malonico, con acido succinico o con acido tartarico, a condizione che sia escluso l'estere dell'acido chinico con acido caffeico.

Secondo la presente invenzione, il sale dell'acido chinico può essere un sale di acido chinico con un metallo alcalino o un metallo alcalino-terroso

farmacologicamente accettabile.

Per quanto riguarda il precursore dell'acido chinico, secondo la presente invenzione, può essere acido shikimico.

Secondo la presente invenzione, la composizione farmaceutica può comprendere ulteriormente l'acido caffeico o altri acidi idrossicinnamici accettabili dal punto di vista farmaceutico.

Secondo un'espressione della presente invenzione, il prodotto può essere somministrato in una quantità tale che il dosaggio per giorno di acido chinico vari da 10 mg a 16 g, preferibilmente da 0,5 g a 8,5 g, più preferibilmente da 1 g a 8 g, ancora più preferibilmente da 2 g a 6,5 g, in modo ottimale da 3,5 g a 4,5 g.

In particolare, il prodotto, secondo la presente invenzione, può essere somministrato per via orale.

Pertanto, il prodotto o la composizione farmaceutica secondo la presente invenzione può essere in una forma adatta alla somministrazione orale, come nanoparticelle, compresse, capsule, sciroppo.

Inoltre, la presente invenzione riguarda un prodotto vegetale comprendente acido chinico, un derivato o un suo precursore da utilizzare nel trattamento di un disturbo dell'umore, a condizione che il prodotto vegetale non sia kiwi o uva. Ad esempio, il prodotto vegetale può essere lampone, mirtillo, mora, uva spina, una drupa quale ciliegia, pesca, albicocca, un pomo quale mela e pera, un pepo quale melone e anguria, un esperidio quale arancia, limone, kumquat, clementina.

Un ulteriore oggetto della presente invenzione è un prodotto vegetale comprendente acido chinico, un derivato o un suo precursore da utilizzare nel trattamento di un disturbo dell'umore, in cui il prodotto vegetale è somministrato in quantità tale che il dosaggio per giorno di acido chinico vari da 10 mg a 16 g, preferibilmente da 0,5 g a 8,5 g, più preferibilmente da 1 g a 8 g, ancora più preferibilmente da 2 g a 6,5 g, in modo ottimale da 3,5 g a 4,5 g.

Secondo la presente invenzione il termine prodotto vegetale comprende vegetali e frutta che contengono acido chinico sotto forma di polvere di materiale vegetale disidratato o in una forma di estratto vegetale concentrato. Il materiale vegetale disidratato può essere ottenuto, ad esempio, mediante essiccazione, liofilizzazione o spray-drying, mentre l'estratto vegetale concentrato può essere ottenuto concentrando o disidratando un estratto vegetale. Secondo una forma di realizzazione preferita il materiale vegetale da somministrare secondo il dosaggio sopra menzionato è il kiwi.

Come accennato in precedenza, secondo la presente invenzione, il disturbo dell'umore che può essere trattato può essere scelto dal gruppo consistente in disturbo depressivo, come il disturbo depressivo maggiore (MDD), il disturbo depressivo persistente (distimia), il disturbo depressivo indotto da sostanze/farmaci e disturbo depressivo dovuto a un'altra condizione medica, disturbi disforici premenstruali, disturbo da disregolazione dell'umore dirompente.

Secondo la presente invenzione, il precursore può essere l'acido shikimico.

Secondo una forma di realizzazione, il prodotto vegetale può ulteriormente comprendere acido caffeico o altri acidi idrossicinnamici accettabili dal punto di vista farmaceutico.

Secondo la presente invenzione, il prodotto vegetale da somministrare secondo il dosaggio sopra menzionato può essere un frutto carnoso come kiwi o altre bacche come uva, lampone, mirtillo, mora, uva spina, drupacee come ciliegia, pesca, albicocca, pomi come mela e pere, pepi come melon e anguria, esperidi come l'arancia, limone, pompelmo, kumquat, clementina, preferibilmente kiwi.

Secondo la presente invenzione, il prodotto vegetale può essere somministrato per via orale.

La presente invenzione riguarda anche una combinazione di acido chinico, un derivato o un suo precursore con acido caffeico o altri acidi idrossicinnamici farmaceuticamente accettabili per l'uso separato o sequenziale nel trattamento di un disturbo dell'umore.

Secondo la presente invenzione, il termine "uso separato" è inteso come la somministrazione, allo stesso tempo, dei due composti della combinazione secondo l'invenzione in forme farmaceutiche distinte. Il termine "uso sequenziale" è inteso come la successiva somministrazione dei due composti della combinazione secondo l'invenzione, ciascuno in una forma farmaceutica distinta.

Il disturbo dell'umore che può essere trattato con la combinazione della presente invenzione può essere scelto dal gruppo consistente in disturbo depressivo, come disturbo depressivo maggiore (MDD), disturbo depressivo persistente (distimia), disturbo depressivo indotto da sostanze/farmaci e disturbo depressivo dovuto a un'altra condizione medica, disturbi disforici premestruali, disturbo da disregolazione dell'umore dirompente.

In particolare, tale derivato può essere scelto dal gruppo consistente in un estere o un etere dell'acido chinico con uno zucchero o un estere dell'acido chinico con un acido organico, un'ammide dell'acido chinico con un metabolita contenente azoto, come un amminoacido, un sale farmaceuticamente accettabile dell'acido chinico.

Secondo la presente invenzione lo zucchero può essere un monosaccaride, per esempio esoso, pentoso, deossiesoso, o un oligosaccaride.

Secondo la presente invenzione, l'estere dell'acido chinico con uno zucchero da usare in combinazione può essere scelto dal gruppo consistente in chinoil glucosio, chinoil galattosio, mentre l'etere dell'acido chinico con uno zucchero può essere acido chinico glicoside.

Come menzionato in precedenza, l'acido organico può essere scelto dal gruppo consistente in acidi organici farmaceuticamente accettabili come acido cinnamico, acidi idrossicinnamici, acidi benzoici e

idrossibenzoici, o acidi organici alifatici come l'acido malico, acido citrico, acido isocitrico, acido fumarico, acido lattico, acido malonico, acido succinico, acido tartarico, a condizione che l'acido caffeico sia escluso.

Pertanto, secondo la presente invenzione, l'estere dell'acido chinico con un acido organico può essere per esempio un estere dell'acido chinico con l'acido cinnamico, con un acido idrossicinnamico, con un acido benzoico, con un acido idrossibenzoico, con l'acido malico, con l'acido citrico, con l'acido isocitrico, con l'acido fumarico, con l'acido lattico, con l'acido malonico, con l'acido succinico o con l'acido tartarico, a condizione che sia escluso l'estere dell'acido chinico con l'acido caffeico.

Secondo la presente invenzione, il sale dell'acido chinico che può essere usato in combinazione può essere un sale dell'acido chinico con un metallo alcalino o un metallo alcalino-terroso farmaceuticamente accettabile.

Come menzionato in precedenza, il precursore può essere l'acido shikimico.

Secondo una forma di realizzazione della presente invenzione, la combinazione è somministrata in modo che il dosaggio giornaliero di acido chinico vari da 10 mg a 16 g, preferibilmente da 0.5 g a 8.5 g, più preferibilmente da 1 g a 8 g, ancora più preferibilmente da 2 g a 6.5 g, ottimamente da 3.5 g a 4.5 g.

Secondo la presente invenzione, la combinazione può essere somministrata oralmente. Pertanto, la combinazione può essere in una forma adatta alla

somministrazione orale come nanoparticelle, compresse, capsule, sciroppo.

La presente invenzione ora verrà descritta in modo illustrativo, ma non limitativo, in base alle forme di realizzazione preferite, con particolare riferimento agli esempi e ai disegni allegati, quali:

Figura 1. Prodotti naturali con origine biogenetica comune. Struttura chimica dell'Acido chinico (a), Acido gallico (b) e Acido shikimico (c).

Figura 2. Biotrasformazione dell'acido chinico e via dello shikimato nelle piante. Le frecce in grassetto indicano le reazioni del ramo principale della via dello shikimato che porta alla produzione di corismato (non mostrato in figura, vedi figura 3). L'acido chinico è il precursore del CGA tramite l'aggiunta di caffeoil-CoA o tramite l'acido p-cumaroil chinico (non mostrato in figura).

Figura 3. Biotrasformazione dell'acido caffeico. Le frecce in grassetto indicano le reazioni del ramo principale della via dello shikimato che portano alla produzione di fenilalanina.

Figura 4. Grafico a barre che rappresenta l'effetto di estratto di Kiwi a diverse diluizioni sul tempo di immobilità nel TST e nel FST. I tempi di immobilità del TST (a) e del FST (b) sono stati valutati 90 minuti dopo la somministrazione di Veicolo, succo Neutro, Kiwi 1, Kiwi 2, Kiwi 3 a un volume di 10 ml/kg e 30 minuti dopo la somministrazione di 20 mg/kg di fluoxetina (FLX) a un volume di 10 ml/kg. I valori sono stati valutati attraverso una ANOVA a una via seguita da un test *post hoc* di Tukey ed espressi come media \pm SD (n=12/16 per gruppo). **p \leq 0.01, ****p \leq 0.0001 vs. gruppo trattato con veicolo; #p \leq 0.05, ###p \leq 0.001, ####p \leq 0.0001 vs. gruppo trattato con neutro.

Figura 5. Grafico a barre che rappresenta l'effetto di estratto di Kiwi a diverse diluizioni sulla distanza percorsa e velocità media dei topi nell'OFT. Distanza (a) e velocità media (b) sono state valutate in un test di 5 minuti in campo aperto 90 minuti dopo la somministrazione di Veicolo, Neutro, Kiwi 1, Kiwi 2, Kiwi 3 a volume di 10 ml/kg e 30 minuti dopo la somministrazione di 20 mg/kg di fluoxetina (FLX) a un volume di 10 ml/kg. Nessuna differenza è stata riscontrata tra i diversi gruppi di trattamento. I valori sono stati valutati attraverso una ANOVA a una via ed espressi come media \pm SD (n=12/16 per gruppo).

Figura 6. O2PLS-DA *score plot* e *S-loading plot* di campioni di siero analizzati in modalità di ionizzazione negativa con colonne C18 (a) e HILIC (b). Nello *score plot* ogni puntino rappresenta un campione, nel *S-loading plot* ogni puntino rappresenta un metabolita.

Figura 7. Quantificazione relativa dell'acido chinico e dell'acido caffeico solfato. Quantificazione relativa dell'acido chinico (a, c) in condizioni di cromatografia C18 rispettivamente nel siero e nel cervello, e dell'acido caffeico solfato (b) nel siero in condizioni HILIC. I valori sono stati valutati attraverso una ANOVA a una via seguita da un test *post hoc* di Dunnett ed espressi come media \pm SD (n=12/16 per gruppo). *p \leq 0.05 **p \leq 0.01, ***p \leq 0.001 ****p \leq 0.0001 vs. gruppo trattato con Kiwi 1. QA=acido chinico, CAS=acido caffeico solfato.

Figura 8. Quantificazione relativa dell'acido chinico e dell'acido caffeico solfato nel siero e nel cervello dei topi dopo la somministrazione di succo di kiwi. Quantificazione relativa dell'acido chinico (a,c) in condizioni di cromatografia C18 nel siero e nel cervello e dell'acido caffeico solfato (b,d) in condizioni di cromatografia HILIC nel siero e nel cervello. Ogni tempistica rappresenta la media

± SD di n=4 per gruppo. QA=acido chinico, CAS=acido caffeico solfato.

Figura 9. Quantificazione relativa dell'acido chinico e dell'acido caffeico solfato in esperimenti di PK dopo perfusione. Quantificazione relativa PK nel cervello dell'acido chinico in condizioni di cromatografia C18 (a) e dell'acido caffeico solfato in condizioni di cromatografia HILIC (b). I valori sono stati confrontati tramite *unpaired t-test* ed espressi come media ± SD (n=6 per gruppo). **p≤0.01.

Figura 10. Cromatogrammi UPLC-ESI-MS di metaboliti specializzati di kiwi e dei loro standard commerciali corrispondenti. I picchi contornati con trattini neri rappresentano gli standard autentici mentre quelli non contornati rappresentano i metaboliti specializzati trovati nel kiwi. Entrambe le molecole sono visibili solo in modalità di ionizzazione negativa. Nel pannello (a) è mostrato l'acido chinico mentre nel pannello (b) è mostrato l'acido caffeico 3-β-D-glucoside. Sopra ogni picco sono riportati il tempo di ritenzione e l'm/z (-).

Figura 11. Grafico a barre che rappresenta l'effetto del kiwi e dei suoi metaboliti sul tempo di immobilità nel TST e nel FST. Il tempo di immobilità del TST (a) e del FST (b) sono stati misurati 90 minuti dopo la somministrazione di Veicolo (controllo negativo), Kiwi 1, Acido chinico, Acido Caffeico e una soluzione di Acidi caffeico + chinico a un volume di 10 ml/kg, e 30 minuti dopo la somministrazione di 10 mg/kg di escitalopram (ESC, controllo positivo) a un volume di 10 ml/kg. I valori sono stati valutati attraverso una ANOVA a una via seguita da un test *post hoc* di Tukey ed espressi come media ± SD (n=12 per gruppo). *p ≤0.05, **p ≤0.01, ****p ≤0.0001 vs. gruppo trattato con veicolo; #p≤0.05, ####p≤0.0001 vs. gruppo trattato con kiwi 1.

Figura 12. Grafico a barre rappresentante l'effetto del

kiwi e dei suoi metaboliti sulla distanza percorsa e sulla velocità media dei topi nell'OFT. La distanza (a) e la velocità media (b) sono state misurate in un test di campo aperto di 5 minuti, 90 minuti dopo la somministrazione di Veicolo (controllo negativo), Kiwi 1, Acido Caffeico, Acido Chinico e una soluzione di Acidi Caffeico + Chinico a un volume di 10 ml/kg, e 30 minuti dopo la somministrazione di 10 mg/kg di escitalopram (ESC, controllo positivo) a un volume di 10 ml/kg. Nessuna differenza è stata rilevata tra i gruppi di trattamento. I valori sono stati valutati attraverso una ANOVA a una via ed espressi come media \pm SD (n=12 per gruppo).

Figura 13. Quantificazione relativa dell'acido chinico e dell'acido caffeico solfato. Quantificazione relativa dell'acido chinico (a,c) in condizioni di cromatografia C18 rispettivamente nel siero e nel cervello, e dell'acido caffeico solfato (b) nel siero in condizioni di cromatografia HILIC. I valori sono stati valutati attraverso una ANOVA a una via seguita da un test *post hoc* di Dunnett ed espressi come media \pm SD (n=12 per gruppo). **p \leq 0.01, ****p \leq 0.0001 vs. gruppo trattato con Kiwi 1. QA=acido chinico, CAS=acido caffeico solfato.

Figura 14. Quantificazione relativa di acido chinico nel siero e nel cervello di topo dopo singolo trattamento con acido chinico. Quantificazione farmacocinetica relativa dell'acido chinico nel siero (a) e nel cervello (b) in condizioni di cromatografia C18. Ogni tempistica rappresenta la media \pm SD di n=4 per punto temporale.

Figura 15. Quantificazione relativa dell'acido chinico in esperimenti PK dopo perfusione. Quantificazione PK relativa di acido chinico nel cervello in condizioni di cromatografia C18, i valori sono stati valutati con *unpaired t-test* ed espressi come media \pm SD (n=6 per gruppo). ****p \leq 0.0001 (a).

Confronto fra animali perfusi trattati con kiwi e con acido chinico 30 minuti prima del sacrificio. I valori sono stati valutati attraverso una ANOVA a due vie seguita da una comparazione *post hoc* di Newman-Keuls ed espressi come media \pm SD (n=6 per gruppo). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ (b).

ESEMPIO 1: *Studio degli effetti del kiwi e dei suoi metaboliti nella depressione*

Materiali e saggi animali

Animali

Sono stati utilizzati topi *naïve* maschi C57BL/6J01aHsd (Envigo RMS Srl, San Pietro al Natisone, Udine, Italia) di 5 settimane (n=12/16 per esperimento comportamentale, n=4 per esperimento PK e n=6 per esperimento di perfusione). All'arrivo i topi, del peso di 20-25 gr, sono stati alloggiati sei per gabbia in gabbie Optimice® (36,3x29,2x15,5) con segatura come lettiera a temperatura ambiente costante (21 ± 1 °C) e umidità relativa (60%) con un ciclo di luce di 12 ore (luce 7:00-19:00) con cibo (Mucedola NFM18) e acqua accessibili ad libitum. Gli animali sono stati lasciati ad adattarsi alle condizioni di laboratorio per almeno due settimane prima dell'inizio delle procedure sperimentali. Le procedure che coinvolgono gli animali sono state condotte presso l'Università degli Studi di Verona che aderisce ai principi enunciati nelle seguenti leggi, regolamenti e politiche che disciplinano la cura e l'uso degli animali da laboratorio: Legge (D.lgs 26/2014; Autorizzazione n.19/2008-A rilasciata il 6 marzo 2008 dal Ministero della Salute); la guida NIH per la cura e l'uso degli animali da laboratorio (edizione 2011) e le direttive e linee guida dell'UE (Direttiva

CEE del Consiglio 2010/63/UE).

Reagenti

Fluoxetina HCl (FLX) è stata ottenuta dai laboratori Alomone (Gerusalemme, Israele); acetonitrile (ACN), metanolo (MeOH) e acqua sono stati acquistati da Honeywell (Seezle, Germania); l'acido formico (HCOOH) da Biosolve (Dieuze, Francia) e la soluzione di leucina-encefalina dalla Waters (Milano, Italia). Tutti i solventi erano di LC-MS grade. L'escitalopram è stato ottenuto da MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, USA); l'acido D-(-)-chinico e l'acido caffeico 3-β-D-glucoside sono stati acquistati dalla Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germania). Tutti i solventi cromatografici (ACN, MeOH, Acqua e HCOOH) erano di grado LC-MS e acquistati da Honeywell (Seezle, Germania); soluzione di leucina-encefalina da Waters (Milano, Italia).

Campionamento di frutta e preparazione di succhi freschi

I kiwi (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward) sono stati ottenuti da produttori locali (Verona, Italia), preparati tagliando fette sbucciate di ciascun campione, congelandole immediatamente in azoto liquido e conservandole a - 80 °C. Il materiale congelato è stato polverizzato utilizzando un mulino analitico A11 (IKA-Werke, Staufen, Germania) e la polvere è stata conservata a - 80 °C. Il succo fresco è stato preparato pesando e scongelando 27 g di polvere omogeneizzata congelata e centrifugando a 3650× g per 15 minuti a 4 °C. Il surnatante è stato quindi trasferito in un nuovo tubo e centrifugato a 21.000× g per 15 minuti a 4 °C. Il

surnatante è stato poi fatto passare attraverso un filtro Millex PES da 0,22 μm (MilliporeSigma) per rimuovere l'alto contenuto di fibre del fitocomplesso.

Il kiwi è stato anche suddiviso in altre due diluizioni, a partire dal più concentrato e non diluito chiamato Kiwi 1 e con una diluizione 1:2 e 1:3 in acqua MilliQ® (MilliporeSigma) rispettivamente per Kiwi 2 e Kiwi 3 e somministrato agli animali ad un volume di 10 ml/kg.

Spettroscopia NMR

La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) è stata condotta in collaborazione con il gruppo di chimica organica dell'Università di Verona guidato dal professor Michael Assfalg. I campioni di succo di kiwi sono stati preparati scongelando 2-3 g di polvere di polpa di kiwi omogeneizzata come descritto in precedenza (Sezione: Campionamento della frutta e preparazione del succo fresco). Il frutto scongelato è stato prima accuratamente miscelato e poi sonicato per 15 minuti in un bagno di acqua fredda. La sospensione è stata quindi centrifugata a $15000 \times g$ per 10 minuti a 4°C e il surnatante è stato trasferito in una nuova provetta e centrifugato a $18000 \times g$ per 20 minuti a 4°C per rimuovere i detriti insolubili rimanenti. Quindi 0.56 ml degli estratti acquosi solubili sono stati diluiti ad un volume finale di 0.7 ml in tampone fosfato di potassio 0.15 M (pH 6.0), sodio azide 0.02% (p/v), 5% (v/v) D_2O (Cambridge Isotope Laboratories, Cambridge, Regno Unito) e 1 mM di acido 4,4-dimetil-4-silapentan-1-solfonico- d_6 (DSS- d_6) (MilliporeSigma). Gli spettri NMR

sono stati registrati a 298 K utilizzando uno strumento Bruker Avance III (Bruker, Karlsruhe, Germania) dotato di una sonda criogenica TCI a tripla risonanza e funzionante a una frequenza Larmor del ^1H di 600.13 MHz. Sono stati acquisiti spettri ^1H -NOESY con un tempo di mixing di 100 ms, un tempo di riciclo di 10 s, 64 transienti (FID), 64000 punti e una larghezza spettrale di 20 ppm. Gli spettri sono stati elaborati con Topspin v3.2 (Bruker) moltiplicando i FID con una funzione esponenziale con un allargamento di riga di 0.3 Hz prima della trasformazione di Fourier, della faseatura e della correzione della linea di base. Gli spettri sono stati quindi calibrati al segnale singoletto DSS- d_6 e analizzati utilizzando Chenomx NMR Suite v8.0 (Chenomx, Alberta, Canada) e confrontandoli con la Biological Magnetic Resonance Bank (<http://www.bmrb.wisc.edu/>). I metaboliti identificati sono stati quantificati integrando i segnali NMR utilizzando DSS- d_6 come standard interno. Il software Chenomx è stato utilizzato anche per quantificare i metaboliti aventi segnali sovrapposti, come il fruttosio. I valori risultanti sono stati quindi corretti con il fattore di diluizione e convertiti in milligrammi per 100 grammi di frutta fresca in base ai pesi e ai volumi iniziali.

Preparazione del Veicolo

Sulla base delle analisi NMR del kiwi e per escludere la possibilità che i metaboliti primari principali (zuccheri, acidi organici e acido ascorbico) potessero avere qualche effetto sui test comportamentali, è stata creata una soluzione veicolo

che replicasse le concentrazioni di questi componenti principali. La composizione completa della soluzione veicolo era: 10.29 g/L di saccarosio, 33.5 g/L di fruttosio, 35.94 g/L di glucosio, 0.7 g/L di acido ascorbico, 9 g/L di acido citrico e 9 g/L di acido malico. Al fine di limitare il numero di molecole di kiwi candidate, il succo di kiwi non diluito (kiwi 1) è stato passato attraverso delle cartucce in modalità mista a scambio cationico (MilliporeSigma) seguendo le indicazioni del produttore per rimuovere una frazione dei metaboliti secondari. Brevemente, le colonnine sono state attivate con 15 ml di etanolo per 15 minuti, poi sono state equilibrate con 25 ml di una soluzione acquosa acida contenente acido malico 1 mM (pH 3.3) e infine i campioni sono stati caricati ed eluiti. La "composizione" del succo e del succo neutralizzato di kiwi, determinata tramite metabolomica *untargeted* (vedi sotto) basata su LC-MS è mostrata nella Tabella 1. M/Z, tempo di ritenzione e quantificazione relativa sono riportate sia per i metaboliti identificati che per quelli non identificati. Il veicolo e il succo neutralizzato sono stati somministrati agli animali a volume di 10 mg/kg.

La Tabella 1 contiene la matrice di dati di metabolomica *untargeted*. Le molecole sono elencate a partire dal rapporto kiwi/neutro più alto. ui=composti non identificati.

Tabella 1

id	RT	m/z (-) rilevato	m/z (-) massa attesa	Formula molecolare	Identificazione putativa	Frammenti principali	Rapporto succo di kiwi/succo neutro	media	
								Succo di kiwi	Neutro
115	5,014	441,196			ui		14621,9989	1172,77385	0,08020612

110	7,827	469,227			ui		10829,3501	1122,19352	0,1036252
105	4,023	363,164			ui		7861,37542	737,215243	0,09377688
117	3,648	339,07	339,071	C15H16O9	esculina (esculetina-6-O-glucoside)		2036,24821	1025,8143	0,50377665
39	5,116	449,238			ui		776,880078	966,110788	1,24357776
108	4,773	427,18			ui		697,008983	1004,28165	1,44084462
43	3,48	549,144	549,145	C21H28O14	acido caffeico diesoso		602,958738	1296,12739	2,14961209
7	3,991	341,087	341,087	C15H18O9	acido caffeico esoso	201.015, 179.033, 135.044	274,469619	15620,2417	56,91064
44	3,386	341,087	341,087	C15H18O9	acido caffeico esoso	179.034, 135.044	76,4586229	7278,69316	95,1978062
10	4,615	341,087	341,087	C15H18O9	acido caffeico esoso	135,044	41,3495194	4149,9543	100,362818
38	5,305	341,087	341,087	C15H18O9	acido caffeico esoso	135,043	29,7804075	659,370319	22,1410778
42	3,48	316,15			derivato dell'acido caffeico	179,033	22,734842	843,644215	37,1079867
101	15,288	387,153			ui	177,096	15,6442621	1392,99884	89,042157
129	16,423	484,319			ui		14,4766218	5659,36283	390,93118
100	6,033	461,165			ui		14,3444641	635,357046	44,2928395
103	6,117	509,222			ui		13,0311282	1150,83741	88,3144874
40	4,209	323,134			ui		11,6154597	1024,63654	88,2131711
114	0,062	192,022			ui		10,3092556	19737,2683	1914,51926
95	0,177	389,033			ui		9,42048091	2348,32876	249,279075
159	0,625	500,918			ui		7,74714206	638,103625	82,3663256
116	15,057	353,211			ui		7,24550565	3249,96017	448,548428
45	3,053	351,13			ui		6,94001307	700,774244	100,975926
36	0,03	474,093			ui		6,38432253	3815,09826	597,572922
107	0,187	391,061			ui		5,57041862	18064,7251	3242,97443
64	0,625	272,958			ui		5,36538602	4944,90182	921,630204
66	0,625	402,916			ui		4,52528337	4797,72209	1060,20368
160	17,757	421,224			ui		3,919419	2100,64988	535,959509
111	3,585	323,134			ui		3,54173811	2248,76056	634,93135
1	0,615	418,893			ui		3,47313461	3823,67862	1100,93015
2	0,615	516,895			ui		3,2413124	4099,71911	1264,83307
46	1,323	849,008			ui		2,83327622	2300,41899	811,92895
19	0,625	616,835			ui		2,80279255	2202,38369	785,78191
4	0,625	532,872			ui		2,52376271	2829,50597	1121,1458
15	1,333	855,023			ui		2,50471886	3096,55609	1236,28889

89	1,302	597,042			ui		2,48490733	643,537121	258,978318
97	16,111	339,23			ui		2,4654732	13679,071	5548,2538
65	0,625	288,935			ui		2,42474644	5839,69625	2408,37399
102	0,083	129,018			ui		2,35496714	1213,37936	515,242585
148	0,24	457,939			derivato/addotto dell'acido citrico	191.109, 111.007	2,26614054	8252,09414	3641,475
120	1,281	619,036			derivato/addotto dell'acido citrico	191,018	2,15315734	6478,16718	3008,68267
49	1,281	613,02			derivato/addotto dell'acido citrico	191,018	2,03364004	5543,05604	2725,682
90	0,125	391,066			derivato/addotto dell'acido chinico	191,056	1,93734486	25620,767	13224,6806
106	0,051	377,085			ui		1,87643306	10345,3577	5513,31028
150	0,25	111,008			ui		1,84507826	26348,5279	14280,4392
155	0,261	641,016			derivato/addotto dell'acido citrico	191.019, 111. 007	1,84215255	9598,27783	5210,35992
67	0,083	586,048			ui		1,83755121	9051,89968	4926,06662
158	0,625	434,87			ui		1,74123241	655,508006	376,462098
86	1,302	191,158			ui		1,73884436	5564,62806	3200,18754
153	0,835	455,101			ui		1,73104296	777,90401	449,384579
96	1,281	885,953			derivato/addotto dell'acido citrico	191,018	1,72265721	1138,49409	660,894161
82	0,73	96,966			ui		1,71267508	1172,48451	684,592497
112	0,051	379,085			ui		1,70612441	3961,38143	2321,85965
149	0,845	1145,288			ui		1,69721587	1460,90918	860,768044
142	0,187	549,167			ui		1,68748818	4805,08783	2847,4794
99	1,291	191,267			ui		1,67792026	2447,902	1458,89054
58	1,302	111,008			ui		1,64943617	6552,19188	3972,38281
3	1,281	405,029			ui		1,62770573	45101,404	27708,5736
51	0,845	555,117			ui		1,55720337	924,973687	593,996716
5	1,302	641,017			ui		1,55338642	5340,50067	3437,97307
87	1,302	857,957			ui		1,51419681	718,135547	474,2683
93	0,125	347,023			ui		1,48796786	7288,1089	4898,02844
28	0,772	579,182			ui		1,45778919	930,536968	638,320669
75	0,03	519,11			ui		1,41383857	658,402669	465,684472
118	1,281	420,996			derivato/addotto dell'acido citrico	191,018	1,41297721	2572,59217	1820,68907
128	0,793	586,068			ui		1,38961709	1766,31186	1271,07811
9	1,281	649,966			ui		1,37906886	8021,43271	5816,55707
134	0,761	412,03			ui		1,37279066	700,506742	510,279361
94	0,041	146,045			ui		1,36101218	1356,65236	996,796634
84	0,73	367,063			ui		1,31877672	964,938211	731,691874

85	1,302	191,338			ui		1,31205352	714,086172	544,250796
157	0,824	903,268			derivato/addotto del saccarosio	341.1088, 179.0550	1,29668643	1699,06098	1310,30983
13	0,751	367,105			ui		1,28489975	3353,57466	2609,98935
92	1,291	191,234			ui		1,27647105	976,205766	764,769219
63	0,24	649,964			derivato/addotto dell'acido citrico	191,019	1,27350526	15372,0906	12070,6927
14	1,302	191,02			ui		1,26577221	109864,979	86796,8015
69	0,051	367,064			ui		1,24555315	2639,53294	2119,16524
31	0,772	565,047			ui		1,24322512	3786,83582	3045,97757
26	0,761	223,045			ui		1,24078445	945,116335	761,708722
47	0,835	517,141			derivato/addotto del saccarosio	341.1088, 179.0550	1,23882033	1686,96127	1361,74813
60	0,793	613,128			ui		1,2335842	978,118766	792,907991
59	0,782	439,084			ui		1,23126207	13085,2494	10627,5096
144	1,168	306,076	306,075	C10H17N3O6S	glutazione		1,22196649	880,451422	720,520106
6	1,281	635,002			ui		1,2200472	6650,6246	5451,12074
57	0,751	237,061			ui		1,21675939	2109,04807	1733,33206
76	0,678	380,843			ui		1,20618015	1671,75364	1385,99002
56	0,835	736,135			derivato/addotto del saccarosio	341.1088, 179.0550	1,20132576	4768,22092	3969,13233
24	0,751	357,103			ui		1,20057691	1753,16123	1460,26566
25	0,793	405,101			ui		1,19753183	6797,72237	5676,44399
135	0,761	165,039			ui		1,18249702	1336,9714	1130,63405
53	0,845	133,014	133,013	C4H6O5	acido malico		1,1800926	9127,44322	7734,5144
73	0,678	464,805			ui		1,17999682	1364,37201	1156,25058
136	0,751	601,138			ui		1,17474426	2462,87791	2096,52262
81	0,73	355,087	355,066	C15H16O10	acido caffeico glucuronide	193,033	1,16759376	782,969064	670,583458
34	0,803	609,187			derivato/addotto dell'acido chinico	191,057	1,16738661	1639,09784	1404,07456
74	0,678	1474,343			ui		1,1665206	887,635444	760,92565
141	0,824	342,112			derivato/addotto del saccarosio	341.1088, 179.0550	1,16649307	1628,83206	1396,34954
83	0,751	195,05			ui		1,1660869	3438,8128	2949,01931
143	1,281	435,958			derivato/addotto dell'acido citrico	191,018	1,16528706	15727,402	13496,5903
154	0,261	448,99			derivato/addotto dell'acido citrico	191.019, 111.007	1,16152384	12174,6581	10481,6256
88	0,093	191,234	191,055	C7H12O6	acido chinico	191,056	1,15694106	2041,85228	1764,87148
133	0,772	207,05			ui		1,15352433	768,801645	666,480648
79	0,74	146,045			ui		1,1513081	603,555618	524,234668
130	0,678	1306,418			ui		1,14824916	970,343419	845,063472

121	0,678	548,766			ui		1,14795568	1808,49916	1575,40853
131	0,793	191,059	191,055	C7H12O6	acido chinico	173.044, 127.039, 111.043	1,14142519	40834,5784	35775,0809
137	0,74	517,14			ui		1,1392722	732,638743	643,076118
147	0,751	209,03	209,029	C6H10O8	acido glucarico		1,13834454	1943,75426	1707,52719
152	0,25	191,235	191,019	C6H8O7	acido citrico	111,007	1,13758472	1973,96149	1735,22153
68	0,667	296,881			ui		1,1365816	1272,26195	1119,37582
30	0,793	377,085			ui		1,13487574	3315,32487	2921,31091
48	1,291	448,985			derivato/addotto dell'acido citrico	191,018	1,1336286	2671,09352	2356,23335
80	0,678	1558,306			ui		1,12938317	696,155502	616,403289
124	0,814	533,176			derivato/addotto dell'acido chinico	191,057	1,12700307	83605,7429	74184,1309
113	0,051	579,176			ui		1,12688149	1358,48767	1205,52843
78	0,74	421,075			ui		1,1245786	1805,59493	1605,57469
55	0,835	839,225			ui		1,12077265	1148,73496	1024,94913
61	0,751	217,029			ui		1,11668581	2783,9518	2493,04843
32	0,772	221,029			ui		1,10495318	1082,5907	979,761605
52	0,845	475,13			ui		1,10143111	7077,11359	6425,38018
27	0,782	267,071			ui		1,10073911	1143,0842	1038,46969
132	0,73	245,035			ui		1,10027218	6342,4617	5764,44796
33	0,761	379,084			ui		1,10010951	944,698978	858,731763
146	0,969	391,07			ui		1,09737681	9598,90449	8747,13624
37	0,824	965,255			derivato/addotto del saccarosio	341.1088, 179.0550	1,09262052	1214,41339	1111,4686
18	0,824	663,197			derivato/addotto del saccarosio	341.1088, 179.0550	1,09077026	1413,0577	1295,46775
22	0,835	173,008			ui		1,08819371	12427,5601	11420,3565
156	0,824	1074,329			derivato/addotto del saccarosio	341.1088, 179.0550	1,08630307	879,520758	809,645836
17	0,73	277,033			ui		1,07925489	5371,10699	4976,68071
21	0,824	605,192			derivato/addotto del saccarosio	341.1088, 179.0550	1,0764819	6333,24989	5883,2851
72	0,041	357,103			ui		1,07101038	4029,28528	3762,13466
12	0,793	383,119			derivato/addotto dell'acido chinico	191,057	1,06953668	14945,6524	13973,9503
29	0,751	424,031			ui		1,0691259	867,899537	811,784222
70	0,062	165,04			ui		1,06895785	3209,89257	3002,82426
16	0,824	781,198			derivato/addotto del saccarosio	341.1088, 179.0550	1,06804237	939,330936	879,488455
151	0,25	129,018			ui		1,06602339	1005,68206	943,395864
8	0,678	1390,38			ui		1,06230014	1168,59358	1100,0597
11	0,667	466,803			ui		1,06168277	966,879623	910,704829

20	0,824	387,314	387,113	C12H22O11	derivato/addotto del saccarosio	341.1088, 179.0550	1,05925298	2018,27224	1905,37321
126	0,793	191,374			ui		1,05915965	772,93252	729,760162
98	1,281	665,932			derivato/addotto dell'acido citrico	191,018	1,05602682	708,339742	670,759232
35	0,824	549,166			derivato/addotto del saccarosio	341.1088, 179.0550	1,04892445	3286,34935	3133,06582
71	0,678	632,727			ui		1,0438021	1979,84303	1896,76093
145	1,084	965,259			ui		1,04058583	697,949838	670,727795
127	0,793	191,302			ui		1,0400438	1035,16921	995,313088
23	0,803	533,404			derivato/addotto dell'acido chinico	191,057	1,03853112	4121,52366	3968,60872
125	0,803	533,47			derivato/addotto dell'acido chinico	191,057	1,03774336	957,881345	923,042617
123	0,814	533,586			derivato/addotto dell'acido chinico	191,057	1,03662721	2337,44843	2254,85922
50	1,084	391,069			ui		1,02757265	10304,2304	10027,7391
62	0,219	420,995			derivato/addotto dell'acido citrico	191,019	1,02744274	14792,4328	14397,3305
77	0,709	225,061	225,061	C6H12O6	glucosio		1,0262993	1544,81346	1505,22704
119	0,937	275,021			ui		1,0249544	1511,67713	1474,87257
122	0,814	695,223			derivato/addotto del saccarosio	341.1088, 179.0550	1,02254831	2608,30273	2550,7868
54	0,835	637,182			ui		1,01652408	626,547433	616,362608
140	0,824	387,466			derivato/addotto del saccarosio	341.1088, 179.0550	1,01454638	939,692259	926,219121
91	0,093	609,187			derivato/addotto dell'acido chinico	191,056	1,01289415	2371,45026	2341,26169
138	0,824	683,224			derivato/addotto del saccarosio	341.1088, 179.0550	1,00772758	2687,26959	2666,66273

Forced swim test

I topi sono stati posti in un cilindro di plexiglass trasparente (altezza 46 cm x 20 cm di diametro) riempito con 30 cm di acqua ad una temperatura di 25 ± 1 °C per 6 minuti. Le dimensioni dei cilindri sono state selezionate per garantire che i topi non fossero in grado di toccare il fondo della vasca durante il test, né con le zampe né con la coda. Un divisore di legno rettangolare è stato utilizzato tra i cilindri per impedire ai topi di vedersi durante il test e potenzialmente alterare i loro comportamenti. Uno sfondo bianco è stato utilizzato per aumentare il contrasto nel

video registrato tra topi e parete. Il test consiste in 6 minuti, tuttavia vengono analizzati solo gli ultimi quattro minuti del test a causa del fatto che la maggior parte dei topi sia molto attiva all'inizio del FST [56]. Il tempo di immobilità è stato segnato manualmente da due osservatori addestrati.

Tail suspension test

Simile al test di nuoto forzato, il test di sospensione della coda comporta la registrazione dell'immobilità dei topi esposti a una situazione stressante inevitabile. In questo caso i topi erano sospesi dal suolo per le loro code attraverso un nastro di 17 cm che collega la coda ad una griglia sospesa a 60 cm dal bancone [26]. Un divisore di legno rettangolare viene utilizzato per impedire ai topi di vedersi durante il test e potenzialmente alterare i loro comportamenti. Uno sfondo bianco è stato utilizzato per aumentare il contrasto nel video registrato tra topi e parete. Questo test è stato ampiamente convalidato farmacologicamente [27] e può essere utilizzato insieme o in alternativa all'FST. Un ulteriore problema con questo test è la curiosa capacità dei topi del ceppo C57Bl/6J di arrampicarsi sulla propria coda, alterando così la valutazione dell'immobilità [40]. I topi che mostrano questo tentativo acrobatico di fuga di solito sono esclusi da ulteriori analisi, il che può portare ad errori nell'analisi. Per questo motivo, un *climbstopper* (4 cm di lunghezza, 1,6 cm di diametro esterno, 1,3 cm di diametro interno, 1,5 grammi) è stato utilizzato per prevenire questo comportamento secondo Can e colleghi

[57]. Il tempo di immobilità è stato segnato manualmente da due osservatori addestrati.

I test comportamentali sono stati ripetuti 2 volte e la somma dei due esperimenti è stata riportata.

Open field test

Poiché sia FST che TST sono fondamentalmente test che coinvolgono la locomozione, dovrebbero essere effettuate valutazioni indipendenti dell'attività locomotoria per garantire la selettività di eventuali cambiamenti nell'immobilità dati dai trattamenti. I topi sono stati valutati per l'attività in un'arena quadrata aperta di 40x40 cm per 5 minuti. Durante il test l'arena era illuminata uniformemente con scarsa illuminazione (~ 40 Lux). Ogni topo è stato prelevato dalla sua gabbia e posto in pre-stanza per l'acclimatamento alla nuova condizione almeno 1 ora prima del test. La distanza totale percorsa e la velocità media di ciascun topo sono state registrate e analizzate attraverso un *tool* di MATLAB®.

Preparazione, estrazione e analisi dei campioni

Dopo aver completato il test comportamentale, i topi sono stati sacrificati per raccogliere campioni di siero e cervello. Sono stati raccolti campioni di sangue dal seno retro-orbitale di animali sotto profonda anestesia indotta da isoflurano, attraverso un capillare di vetro non eparinato. Il sangue è stato lasciato coagulare a temperatura ambiente per 20 minuti e poi centrifugato a 6800× g per 5 minuti a 4°C. I surnatanti sono stati raccolti, congelati in azoto liquido e quindi conservati a -80°C. I campioni di cervello sono stati

estratti dal cranio, lavati in soluzione fisiologica allo 0,9%, immediatamente congelati in azoto liquido e quindi conservati a -80°C , fino a ulteriori analisi.

Estrazione dei metaboliti per analisi UPLC-MS mirate e non mirate

I campioni di siero sono stati scongelati a temperatura ambiente e, una volta scongelati, 10 volumi di metanolo freddo (-20°C), di grado LC-MS, sono stati aggiunti ad 1 ml di siero. La miscela è stata delicatamente mescolata utilizzando un "vortex" da banco per 30 s e poi centrifugata a $3650 \times g$ per 15 minuti a 4°C . Il supernatante è stato quindi trasferito in una nuova provetta e centrifugato a $21000 g$ per 20 minuti a 4°C . Il supernatante è stato poi fatto passare attraverso un Oasis® PRiME HLB 1 cc Vac, con 30 mg di materiale adsorbente per cartuccia (Waters, Milano, Italia), collegato a un collettore di estrazione a 20 posizioni di marca Waters (Waters, Milano, Italia), per rimuovere le interferenze comuni della matrice, come proteine e fosfolipidi, secondo le istruzioni del produttore. In breve, queste cartucce non hanno bisogno di essere attivate o equilibrate, semplicemente i campioni vengono caricati e raccolti immediatamente con un metodo definito "*pass-through*".

Per l'analisi metabolomica, gli estratti di metanolo sono stati diluiti 1:2 (v/v) con acqua di grado LC-MS (Honeywell) per l'analisi C18 e 1:2 con metanolo di grado LC-MS per l'analisi HILIC. Gli estratti sono stati quindi passati attraverso filtri Minisart RC4 con pori da $0,2 \mu\text{m}$ (Sartorius, Göttingen, Germania) e $3 \mu\text{L}$

sono stati iniettati nel dispositivo UPLC.

I campioni di cervello sono stati pesati e, successivamente, sono stati aggiunti 10 volumi di metanolo freddo (-20°C), di grado LC-MS. La miscela è stata omogeneizzata con un Precellys cryolys® evolution (Bertin, Montigny-le-Bretonneux, Francia) a 4°C , poi sonicata a 40 kHz in un bagnetto ad ultrasuoni (Sonica Ultrasonic Cleaner; SOLTEC, Milano, Italia) per 20 minuti, ai quali sono seguiti due cicli di centrifugazione condotti entrambi a 4°C , il primo a $3650 \times g$ per 15 min e il secondo a $21000 \times g$ per 15 min. Il supernatante è stato fatto passare attraverso una cartuccia Oasis® PRiME HLB 1 cc Vac, con 30 mg di materiale adsorbente (Waters, Milano, Italia) come descritto in precedenza, diluito e filtrato come prima, per l'iniezione nell'UPLC-ESI-MS.

Per l'estratto di kiwi e succo neutralizzato, i campioni sono stati preparati come descritto nelle sezioni "Campionamento della frutta e preparazione del succo fresco" e "Preparazione del succo del veicolo" e 100 μL di campione sono stati aggiunti a 900 μL di metanolo freddo (-20°C), di grado LC-MS. La miscela è stata delicatamente miscelata e centrifugata a $21000 \times g$ per 10 minuti a 4°C . Il surnatante risultante è stato raccolto, diluito e filtrato come precedentemente descritto, per l'iniezione nell'UPLC-ESI-MS.

Analisi UPLC-MS di metabolomica non mirata

Il sistema di analisi comprendeva un UPLC ACQUITY I CLASS (Waters, Milford, MA, USA), fornito di autocampionatore refrigerato, a cui è stato collegato uno spettrometro di

massa Xevo G2-XS qTOF (Waters, Manchester, Regno Unito), equipaggiato con una sorgente di ionizzazione elettrospray (ESI), operante nelle modalità positiva o negativa e controllato da MassLynx v4.1. Tutti gli estratti sono stati iniettati in una colonna Waters ACQUITY UPLC BEH C18 e HILIC (2,1 mm × 100 mm, 1,7 µm), entrambe mantenute a 30°C. Le fasi mobili impiegate per la separazione dei metaboliti con la colonna C18 erano costituite da acqua acidificata con acido formico (concentrazione finale dello 0.1%, v/v) (A) e acetonitrile (B). Le condizioni iniziali dell'analisi erano 99% A e 1% B ed è stato applicato il seguente profilo di eluizione: 0-1 min, 1% B; 1-10 minuti, 1-40% B; 10-13.50 min, 40-70% B; 13.50-15 min, 70-90% B; 15-16.50 min, 90-100% B, 16.50-20 min, 100% B, 20-20.1 min, 100-1% B (condizioni iniziali). Successivamente, il sistema è stato equilibrato in 99% A e l'eluizione è stata completata dopo 25 min. Le fasi mobili HILIC erano costituite da acqua con formiato di ammonio alla concentrazione finale di 20 mM (A) e 95% acetonitrile con 5% di acqua e 10 mM di formiato di ammonio (B). Le condizioni iniziali erano 0% A e 100% B ed è stato applicato il seguente profilo di eluizione: 0-3 min, 100% B; 3-7 minuti, 100-85% B; 7-10 minuti, 85% B; 10-15 min, 85-50% B; 15-20 minuti, 50% B; 20-20,10 min, 50-100% B (condizioni iniziali).

Successivamente, il sistema è stato equilibrato in 100% B e l'eluizione è stata completata dopo 30 min. Il flusso è stato impostato su 0,350 mL/min per entrambe le colonne. I campioni sono stati mantenuti a 8°C e la

sequenza dei campioni è stata randomizzata. Un campione, definito come controllo di qualità (QC), è stato preparato mescolando parti uguali di tutti i campioni, al fine di verificare le prestazioni UPLC-qTOF lungo l'intero esperimento. Il QC è stato iniettato dopo ogni nove campioni analizzati. I parametri della sorgente di ionizzazione erano: tensione del capillare 0,8 kV, tensione del cono di campionamento 40 V, tensione di offset della sorgente 80 V, temperatura della sorgente 120°C, temperatura di desolvatazione 500°C, portata del gas del cono 50 L/h e portata del gas di desolvatazione 1000 L/h. Il gas azoto è stato utilizzato per la nebulizzazione e desolvatazione, mentre l'argon è stato impiegato per condurre la dissociazione indotta dalla collisione. È stato creato un metodo MS per acquisire dati in modalità "profilo" utilizzando un'energia di collisione fissa in due funzioni di scansione. Nella funzione 1, l'energia di collisione bassa è stata disabilitata, mentre nella funzione 2 l'energia alta è stata impostata a 35 V. Per alcuni campioni, l'energia alta è stata aumentata a 45 V per ottenere una migliore frammentazione di alcuni metaboliti. In entrambe le funzioni, lo Xevo G2-XS è stato impostato per eseguire le analisi in modalità di sensibilità, facendo scansioni nell'intervallo di 50-2000 m/z e con un tempo di scansione di 0,3 s. La soluzione *lockmass* utilizzata come "calibratore", per verificare l'accuratezza dello spettrometro di massa, era costituita da una soluzione di leucina-encefalina (Waters) di 100 pg/μL, iniettata con un flusso di 10 μL/min e generando un segnale di

556,2771 in modalità positiva e 554,2615 in modalità negativa.

Elaborazione dei dati e identificazione dei metaboliti

L'analisi statistica dell'esperimento comportamentale è stata eseguita utilizzando il programma Prism v9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Differenze significative tra i campioni sono state determinate dall'analisi della varianza a una via (ANOVA), seguita dal test post hoc di Dunnett. I dati grezzi generati durante l'analisi metabolomica non mirata sono stati elaborati utilizzando il software Progenesis QI (Waters). Un'intensità ionica assoluta per la selezione del picco è stata impostata a 300 e un'ampiezza minima del picco cromatografico a 0,03 min. Una ricerca automatica online su database pubblici (MassBank, PlantCyc, Plant Metabolic Network e Human Metabolome Database) è stata utilizzata per l'identificazione provvisoria dei metaboliti confrontando rapporti m/z, somiglianze isotopiche e pattern di frammentazione, con i profili frammentazione, estrapolati dal software Progenesis QI, dei singoli composti. Ulteriori identificazioni sono state ottenute utilizzando Metlin (<https://metlin.scripps.edu>) con una tolleranza di 0,003 Da e una libreria interna di standard commerciali autentici. Infine, i dati riportati in letteratura sono stati utilizzati a supporto delle presunte annotazioni. Poiché non sono stati utilizzati gli standard interni, la quantificazione relativa (cioè il confronto tra campioni) è stata basata sull'area di

ciascuno dei segnali estratti dai cromatogrammi ed espressa in unità di intensità arbitrarie.

Quantificazione degli acidi chinico e caffeico nel kiwi

La quantificazione assoluta dei metaboliti mediante LC-MS richiede un'attenta valutazione dei possibili effetti matrice che possono comportare la soppressione o il potenziamento del segnale ionico. Utilizzando il metodo di diluizione mostrato da Cavaliere et al. [58], è stata determinata la diluizione in cui sono scomparsi gli effetti matrice per il metabolita di interesse.

Il succo di kiwi (kiwi 1) è stato diluito in sequenza e si è riscontrato che a una diluizione di 1:1600 per l'acido chinico e di 1:100 per l'acido caffeico, l'effetto matrice non era più presente, nonostante i due metaboliti fossero ancora ben rilevabili.

Successivamente, l'assenza di interferenze derivanti dall'effetto matrice è stata ulteriormente verificata, per entrambi i metaboliti nel succo di kiwi, mediante il metodo di addizione, come riportato da Toffali e collaboratori [59]. Sono state confrontate le aree dei picchi cromatografici in tre gruppi di campioni: (1) solo succo di kiwi diluito; (2) lo stesso succo di kiwi del gruppo 1 addizionato con 1,5 ng/ μ L di acido D-(-)-chinico e 125 pg/ μ L di acido caffeico 3- β -D-glucoside; (3) soluzione di composti standard puri, utilizzando gli stessi composti del gruppo 2 alle stesse concentrazioni. 1 μ L di ciascuna soluzione diluita è stato analizzato tre volte mediante UPLC-ESI-MS e non è

stato mai riscontrato alcun effetto matrice per entrambi i metaboliti. L'area del picco dei metaboliti di interesse è stata normalizzata per il fattore di diluizione e confrontata con una curva di calibrazione ottenuta utilizzando standard commerciali autentici.

Quantificazione dell'acido chinico nel siero

L'acido chinico è stato anche quantificato nel siero di animali perfusi e non perfusi trattati con kiwi e sacrificati dopo 30 minuti. È stata utilizzata una diluizione finale di 1:80. L'effetto matrice è stato determinato attraverso il metodo di addizione, come descritto da Toffali e collaboratori [59], e utilizzando i seguenti tre gruppi di campioni: (1) campione di solo siero; (2) lo stesso campione di siero del gruppo 1 addizionato con 18 pg/ μ L di acido D-(-)-chinico; (3) soluzione di acido chinico puro, utilizzando le stesse concentrazioni del gruppo 2. 1 μ L di ciascuna diluizione è stato analizzato tre volte mediante UPLC-ESI-MS e un piccolo effetto matrice è stato rilevato, determinato e utilizzato per ottenere una corretta quantificazione assoluta del metabolita.

Analisi dei dati

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando Prism v9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Differenze significative tra i campioni sono state determinate dall'analisi della varianza a una via (ANOVA), seguita dal test post hoc di Dunnett. L'elaborazione dei dati UPLC-ESI-MS è già stata descritta nella sezione dei "Materiali e Metodi" (vedere la sezione "Elaborazione dei dati e identificazione dei

metaboliti").

Risultati

Esperimenti in vivo su modelli comportamentali ben convalidati combinati con approcci metabolomici rivelano un'attività antidepressiva del kiwi

Il trattamento cronico con kiwi riduce il tempo di immobilità del topo in TST e FST

La possibile attività antidepressiva di diverse diluizioni di estratti di kiwi (kiwi 1, kiwi 2 e kiwi 3) è stata studiata sia con TST che con FST attraverso la valutazione della capacità di ridurre il tempo di immobilità. Gli animali, una volta arrivati, sono stati lasciati ad adattarsi alle condizioni di laboratorio per almeno 2 settimane. Dopo questo periodo gli animali sono stati pesati e maneggiati ogni giorno per abituarli e quindi per ridurre lo stress da manipolazione umana, infatti la somministrazione intra gastrica (IG) è molto stressante poiché provoca cambiamenti immediati nei parametri fisiologici indicativi di stress (aumento del corticosterone nel sangue, glucosio, ormone della crescita e aumento della frequenza cardiaca e della pressione sanguigna). Per questo motivo, 1 settimana prima di iniziare la procedura sull'animale, i topi sono stati lasciati ad adattarsi alla somministrazione di IG (IG di acqua due volte al giorno) poiché è riportato in letteratura che dopo 4 giorni c'è una diminuzione di tutti i parametri sopra menzionati. Per gli estratti di kiwi, il veicolo e il succo neutralizzato, i topi sono stati trattati cronicamente per 10 giorni attraverso la somministrazione di IG e testati dopo 90 minuti, mentre

la fluoxetina (Prozac®) è stata utilizzata come farmaco di controllo positivo e somministrata per via intraperitoneale (IP) 30 minuti prima del test ad una concentrazione di 20 mg/kg [60]. Tutti i gruppi sono stati confrontati con il controllo negativo, il gruppo trattato con il veicolo. Il kiwi 1 riduce fortemente il tempo di immobilità in entrambi i test rispetto al gruppo trattato con veicolo [$F(5,81)=16.00$, $p<0.0001$; $F(5,81)=15.29$, $p<0.0001$ rispettivamente per TST e FST] mentre kiwi 2 e kiwi 3 erano meno attivi, con attività del kiwi 3 che scompare completamente in FST (Figura 4). La fluoxetina, il controllo positivo non ha funzionato nel paradigma FST, ma questo problema è esaminato di seguito nel paragrafo di discussione. La presenza della possibile compromissione locomotoria è stata valutata il giorno 8 in un OFT, come descritto in precedenza. Non è stata riscontrata alcuna compromissione motoria tra i diversi gruppi di animali (Figura 5).

I risultati della comparazione dei campioni trattati con succo di kiwi e il veicolo hanno evidenziato che solo pochi metaboliti specifici del frutto erano presenti nel siero e nel cervello del topo. È stata condotta un'analisi statistica multivariata dei dati sulla matrice di quantificazione dei metaboliti, per discriminare le differenze tra questi due gruppi. La matrice di quantificazione dei metaboliti, ottenuta utilizzando Progenesis QI e contenente i valori di m/z e le loro abbondanze relative in ciascuno dei campioni, è stata sottoposta all'analisi discriminante ortogonale e bidirezionale dei minimi quadrati parziali (O2PLS-DA),

tramite SIMCA 13.0 (Umetrics), dopo le operazioni di ridimensionamento Pareto e centraggio dei dati. Anche a seguito dell'impiego di entrambe i tipi di analisi cromatografiche (basate sulle colonne C18 e HILIC, per includere il maggior numero possibile di metaboliti, da quelli altamente polari a quelli a polarità media e bassa), i metaboliti di kiwi riscontrati nei campioni di siero sono stati pochi e, in particolare, solo metaboliti rilevabili nel gruppo trattato con kiwi 1 rispetto ai topi alimentati con veicolo (Figura 6). La maggior parte di essi è stata presumibilmente identificata e due metaboliti sono risultati essere l'acido chinico, un metabolita secondario abbondantemente presente nei kiwi, e il solfato di acido caffeico, che è probabilmente il catabolita murino delle molecole a base di acido caffeico presenti nel frutto di kiwi (glucosidi ed esteri dell'acido caffeico, vedere la tabella 1). I parametri utilizzati per l'identificazione di questi due metaboliti sono discussi in dettaglio in seguito.

Altri due metaboliti che si trovano solo nei topi trattati con kiwi, presumibilmente identificati come indossil solfato e idrossibenzene solfato, non sono metaboliti del kiwi: potrebbero essere cataboliti di alcuni metaboliti del frutto o metaboliti endogeni di topo che aumentano a seguito del trattamento.

Gli stessi due metaboliti, acido chinico e solfato di acido caffeico, sono stati trovati anche in campioni di cervello. La quantificazione relativa, ottenuta dall'analisi UPLC-ESI-MS di cui sopra, dell'acido chinico e del solfato di acido caffeico nel siero e nel

tessuto cerebrale di topi trattati con tutte le diluizioni di succo di kiwi e con il succo di kiwi "neutralizzato", è riportata in Figura 7. L'acido chinico è stato rilevato solo con la condizione cromatografica C18, mentre il solfato di acido caffeico viene rilevato meglio con la condizione HILIC. Poiché i livelli di solfato di acido caffeico rilevati nel cervello utilizzando la tecnica HILIC erano inferiori al Limit of Detection (LOD, la quantità più bassa di una sostanza che può essere determinata con un livello almeno 5 volte superiore al fondo), essi non sono stati valutati.

Come previsto, entrambi i livelli delle molecole diminuiscono linearmente con l'aumentare delle diluizioni degli estratti di kiwi [$F(3,20)=46,35$, $p<0,0001$; $F(3,20)=9,644$, $p<0,0004$ di acido chinico, rispettivamente per siero e cervello, e di solfato di acido caffeico solo per siero $F(3,20)=16,34$, $p<0,0001$]. Inoltre, confrontando i metabolomi, già precedentemente caratterizzati, del kiwi con quello del kiwi "neutralizzato", è stato possibile vedere che i derivati dell'acido caffeico erano quasi assenti nel succo "neutralizzato" del kiwi e l'abbondanza di acido chinico era ridotta (Tabella 1). Queste osservazioni sono in linea con il recupero molto basso di questi metaboliti nei topi trattati con succo "neutralizzato". Inoltre, il basso livello di questi metaboliti nel succo "neutralizzato", che risultava non attivo nei test comportamentali TST e FST, rafforza l'ipotesi che una o entrambe queste molecole possano essere almeno

parzialmente responsabili delle attività comportamentali del succo di kiwi nei topi.

Le cinetiche di comparsa e di eliminazione dell'acido chinico e del solfato di acido caffeico nel siero e nel cervello dei topi, a seguito della somministrazione di kiwi, sono state seguite utilizzando un approccio farmacocinetico (PK) su diversi gruppi di topi trattati solo con kiwi non diluito (kiwi 1) e sacrificati in tempi diversi. I punti temporali utilizzati in questo esperimento sono i seguenti: 15min, 30min, 45min, 1h, 1h15 min, 1h30min, 2h, 4h, 8h e 24h. La Figura 8 mostra la quantificazione relativa, in unità arbitrarie, di acido chinico e solfato di acido caffeico in campioni di siero e cervello. Non sorprende che i livelli relativi delle due molecole diminuiscano col passare del tempo.

La presenza di acido chinico e solfato di acido caffeico nell'intero omogenato del tessuto cerebrale non è necessariamente indicativa della capacità delle molecole di superare la barriera ematoencefalica (BBB) e, conseguentemente, di raggiungere il parenchima cerebrale, in quanto la loro presenza può essere dovuta ai vasi sanguigni che irrorano il cervello. Per verificare la reale capacità di attraversamento della BBB da parte dell'acido chinico e del solfato di acido caffeico è stata utilizzata la tecnica della perfusione. Questa ha permesso di prelevare il sangue dal cervello e quindi di valutare la reale presenza di acido chinico e solfato di acido caffeico nel tessuto. Nella pratica, gli animali dopo il trattamento (somministrazione di

succo di kiwi) sono stati anestetizzati e l'intero volume del sangue è stato trascinato via mediante una soluzione salina fredda allo 0,9% e, dopo 5 minuti di perfusione, i campioni di cervello sono stati raccolti e congelati in azoto liquido. I campioni sono stati conservati a -80°C fino alle successive analisi LC-MS. La Figura 9 mostra la quantificazione relativa in unità arbitrarie di acido chinico e solfato di acido caffeico cerebrali dopo la perfusione: i livelli post-perfusione di entrambi i metaboliti sono inferiori rispetto ai campioni non perfusi (circa la metà), ma comunque rilevabili, provando che le due molecole attraversano la barriera ematoencefalica e sono in grado di entrare nel parenchima cerebrale [F(5,5)=6.112, p=0.0020 e F(5,5)=18.61, p=0.0014 per rispettivamente acido chinico e solfato di acido caffeico cerebrali].

Biodisponibilità degli indolalcaloidi del kiwi

La biodisponibilità della serotonina e della triptamina è stata valutata, dopo il trattamento cronico, in campioni di siero e cervello di topi attraverso l'analisi UPLC-ESI-MS.

In generale, la serotonina e la triptamina nella dieta sono solitamente degradate dagli isoenzimi MAO presenti nell'intestino e per questo motivo non sono biodisponibili, ma non si può escludere un ruolo per queste molecole quando mangiate all'interno di un fitocomplesso composito, a causa dell'attività sinergica tra le diverse componenti. Pertanto, in linea di principio, eventuali inibitori di kiwi delle MAO-A e B potrebbero cambiare il destino della serotonina e della

triptamina assunte con il frutto, rendendole più biodisponibili.

Nei dati contenuti nella presente invenzione, non è stata trovata triptamina in entrambi i campioni analizzati, mentre per la serotonina non sono state riscontrate differenze tra topi alimentati con kiwi 1 e gruppo di controllo. Per escludere definitivamente la biodisponibilità della serotonina del kiwi, è stata eseguita l'analisi PK di topi trattati con diluizione di kiwi 1 addizionata con una quantità rilevabile di serotonina deuterata (Serotonina-d4).

Nell'analisi farmacocinetica non sono state riscontrate differenze nella serotonina-d4 somministrata (dati non mostrati).

L'acido chinico è in grado di mimare gli effetti del succo di kiwi sui modelli murini di depressione

Identificazione e quantificazione dei putativi metaboliti attivi del kiwi

Negli esperimenti precedenti (Materiali e Metodi) sono stati trovati solo pochi metaboliti del frutto di kiwi nei sieri e nel cervello dei topi trattati con kiwi e presumibilmente identificati, vale a dire acido chinico e solfato di acido caffeico, un presunto metabolita murino degli acidi caffeici presenti nel frutto di kiwi.

L'acido chinico, abbondantemente presente nei frutti di kiwi in forma libera, è stato identificato utilizzando acido chinico autentico disponibile in commercio, sulla base del tempo di ritenzione (0,81 min) e del rapporto massa/carica (m/z) (atteso m/z: 191,0555,

rilevato m/z: 191,0550, errore di massa: 2,6 ppm) (Figura 10).

Il solfato di acido caffeico, un presunto metabolita murino derivante dagli acidi caffeici di kiwi, è stato identificato su sieri e cervelli sulla base del rapporto massa-carica (m/z) (m/z previsto: 258,991, m/z rilevato: 258,990, massa errore: 3,8 ppm) e pattern di frammentazione (ms/ms), in quanto lo standard commerciale non era disponibile: dopo la frammentazione, il metabolita ha generato un frammento di m/z 179,0330, corrispondente ad acido caffeico (m/z previsto: 179,0344) e un frammento di m/z 135,0423 (m/z atteso 135,0446), che è un tipico e diagnostico frammento dell'acido caffeico, generato dalla sua decarbossilazione (acido caffeico-COOH-H⁺).

Come mostrato nella Tabella 1, il succo di kiwi utilizzato nei test comportamentali conteneva quattro esosi dell'acido caffeico, un diesoso dell'acido caffeico, un glucuronide dell'acido caffeico e due derivati non identificati dell'acido caffeico. Gli esosi dell'acido caffeico sono stati identificati in base al loro rapporto massa-carica (m/z) (m/z previsto: 341,0872, m/z rilevato: 341,0873, errore di massa 0,29 ppm) e ai modelli di frammentazione (ms/ms, tutti hanno generato i frammenti con m/z 179,0344 +/-0,005, corrispondente ad acido caffeico, e 135,0446 +/-0,005, corrispondente ad acido caffeico -COOH-H⁺). Tre esosi di acido caffeico hanno mostrato una quantità interessante nel succo di kiwi e uno di questi, l'esoso di acido caffeico più abbondante, è stato identificato con

precisione come acido caffeico 3- β -D-glucoside utilizzando uno standard autentico disponibile in commercio e grazie al confronto con il tempo di ritenzione (4,6 min), rapporto massa/carica (m/z) e pattern di frammentazione (figura 10). Gli altri due picchi hanno mostrato un tempo di ritenzione di 3,98 min e 5,29 min. Sulla base del loro rapporto massa-carica (m/z) e dei profili di frammentazione, questi sono stati presumibilmente identificati come isomeri strutturali dell'acido caffeico 3- β -D-glucoside. D'altra parte, il rilevamento di uno degli altri due picchi nello standard commerciale autentico dell'acido caffeico 3- β -D-glucoside, suggerisce che il picco a 4,6 minuti e l'altro picco a 5,29 minuti sono isoforme che si convertono facilmente tra loro (Figura 10).

Al fine di verificare se l'attività antidepressiva del kiwi, studiata in "Materiali e Metodi", potesse derivare dall'acido chinico e dai glucosidi dell'acido caffeico, ovvero quelle molecole di kiwi che riuscivano a raggiungere sia i sierici che il cervello degli animali trattati, sono stati eseguiti i test comportamentali con le molecole pure, alla stessa concentrazione del frutto.

Pertanto, l'acido chinico e le due presunte isoforme dell'acido caffeico 3- β -D-glucoside nel frutto dovevano essere quantificati esattamente.

Per la quantificazione dell'acido chinico nel succo di kiwi è stata costruita una curva di calibrazione con concentrazioni dello standard commerciale comprese tra 0,5 e 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ con un R² di 0,9993. Tre misurazioni sono state eseguite con una diluizione di succo di kiwi 1:1600

e i dati sono stati confrontati con la curva di calibrazione, per ottenere una quantificazione esatta pari a $491,26 \pm 1,80$ mg/100 g di peso fresco di frutto.

La curva di calibrazione dell'acido caffeico 3- β -D-glucoside variava da 31,25 a 312,5 pg/ μ L con un R² di 0,9995. Tre diverse misurazione di una diluizione 1:100 di succo di kiwi sono state comparate con la curva di calibrazione per ottenere una quantificazione esatta pari a $6,475 \pm 0,026$ mg/100 g di peso fresco di frutto.

L'acido chinico è in grado di mimare parzialmente l'attività antidepressiva del kiwi nel trattamento cronico

La capacità dei suddetti metaboliti specializzati del kiwi di ridurre il tempo di immobilità è stata valutata sia nel paradigma TST che FST utilizzando l'esatta concentrazione dei metaboliti presenti nel frutto. L'estratto di kiwi alla diluizione kiwi, veicolo (controllo negativo), acido chinico e glucoside dell'acido caffeico alla stessa concentrazione del kiwi 1 e una combinazione dei due metaboliti sono stati usati per trattare cronicamente i topi per 10 giorni tramite somministrazione IG. I test TST e FST sono stati eseguiti al giorno 10, dopo 90 minuti dalla somministrazione di succo/metabolita, mentre Escitalopram (Cipralex®) è stato utilizzato come farmaco di controllo positivo e somministrato per via intraperitoneale (IP) 30 minuti prima del test, a una concentrazione di 10 mg/kg. Come nell'esperimento precedente (vedi sezione "*Il trattamento cronico del kiwi riduce il tempo di immobilità del topo in TST e FST*" e figura 4), il kiwi

1 ha confermato la sua capacità di ridurre fortemente il tempo di immobilità in entrambi i test rispetto al gruppo trattato con veicolo. Anche l'acido chinico somministrato da solo e in combinazione con l'acido caffeico aveva una forte capacità di diminuire il tempo di immobilità mentre l'acido caffeico da solo non era attivo, anche se in questo gruppo è stata osservata un'elevata variabilità inter-soggettiva [$F(5,66)=26.33$; $p<0,0001$; $F(5,66)=11,54$, $p<0,0001$ rispettivamente per TST e FST] (Figura 11). Escitalopram (ESC), in questo caso, è stato un buon controllo positivo per entrambi i test rispetto alla fluoxetina, che funziona solo sul TST (vedi Figura 4). L'attività locomotoria è stata valutata il giorno 8 in OFT, per verificare la possibile compromissione locomotoria, come descritto in precedenza (vedere la sezione "Test in campo aperto"). Non è stato riscontrato alcun danno motorio tra diversi gruppi di animali (Figura 12). Pertanto, la somministrazione di acido chinico alla stessa concentrazione trovata nel kiwi può mimare parzialmente l'attività antidepressiva del kiwi sui topi, indicando che l'acido chinico è una delle molecole antidepressive attive del frutto.

A seguito degli esperimenti comportamentali, sono stati raccolti i campioni di siero e cervello e analizzati mediante UPLC-ESI-MS. La Figura 13 mostra la quantificazione relativa, in unità arbitrarie, di solfato di acido caffeico e acido chinico in campioni sia di siero che di cervello di topi trattati con kiwi 1, acido chinico e una combinazione di acido chinico e glucoside dell'acido caffeico, che erano i trattamenti

efficaci nel TST e FST. Vengono mostrati entrambi i risultati ottenuti con le due condizioni cromatografiche (C18 e HILIC) [$F(2,33)=63,46$, $p<0,0001$; $F(2,33)=35,96$, $p<0,0001$ di acido chinico rispettivamente per siero e cervello e di solfato di acido caffeico solo per siero $F(2,33)=18,86$, $p<0,0001$].

Come riportato in precedenza in "Materiali e Metodi", l'acido chinico era rilevabile solo in condizioni cromatografiche C18, mentre il solfato di acido caffeico è rilevato meglio con la cromatografia HILIC. Tuttavia, i livelli di solfato di acido caffeico nel cervello non sono stati valutati in quanto, seppur ancora rilevabili, risultavano al di sotto del LOD (la quantità più bassa di una sostanza che può essere determinata con un livello almeno 5 volte superiore al fondo) dello strumento.

È interessante notare che i livelli di acido chinico e di solfato di acido caffeico nei sieri e nel cervello erano inferiori in tutti i trattamenti con i metaboliti puri (QA, CA o QA+CA) rispetto ai livelli delle stesse molecole nei campioni trattati con kiwi non diluito (kiwi 1). Poiché l'acido chinico e i glucosidi dell'acido caffeico sono stati somministrati esattamente alla stessa concentrazione del fitocomplesso, ciò suggerisce che nel frutto siano presenti altre molecole o componenti che potrebbero aumentare l'adsorbimento e/o la stabilità dei metaboliti nell'organismo vivente. Pertanto, la minore attività dell'acido chinico puro e della combinazione acido chinico-glucoside acido caffeico rispetto al trattamento con kiwi 1 può essere dovuta

all'attività di altre molecole di kiwi di basso livello e non rilevabili o ad un limitato assorbimento e/o stabilità dell'acido chinico e caffeico quando vengono presi come molecole pure.

Analisi cinetica e quantificazione del siero in topi trattati con acido chinico

Gli esperimenti PK sono stati eseguiti su diversi gruppi di topi trattati con acido chinico e sacrificati a diversi *timepoint*. I *timepoint* utilizzati in questo esperimento sono i seguenti: 15min, 30min, 45min, 1h, 1h15 min, 1h30min, 2h, 4h, 8h e 24h. La Figura 14 mostra la quantificazione relativa in unità arbitrarie di acido chinico sia nel siero che nei campioni di cervello. Ovviamente e come visto con il trattamento con kiwi, i livelli relativi dell'acido chinico diminuiscono nel tempo.

Anche in questo caso come per l'intero fitocomplesso di kiwi la reale penetrazione cerebrale è stata valutata utilizzando la tecnica della perfusione in tampone salino freddo allo 0,9% per 5 minuti (maggiori dettagli sono presentati in *Materiali e Metodi*). La Figura 15 mostra la quantificazione relativa in unità arbitrarie di acido chinico cerebrale in condizioni cromatografiche C18. I livelli cerebrali dopo la perfusione erano, come previsto, più bassi rispetto ai campioni non perfusi (vedere anche figura 9). Inoltre, sono stati confrontati i livelli cerebrali dei topi trattati con QA e con kiwi dopo la tecnica di perfusione. I livelli dei topi trattati solo con QA erano molto più bassi rispetto all'altro gruppo [$F(5,5)=6.189$, $p<0.0001$]

per l'acido chinico cerebrale (a) e $F_{\text{interaction}}(1,20)=1.147$, $p=0.2970$; $F_{\text{trattamento}}(1,20)=18.03$, $p=0.0004$; $F_{\text{perfusione}}(1,20)=43.25$, $p<0.0001$ (b)].

Inoltre, è stata anche provata l'esatta quantificazione dell'acido chinico nel siero e nel cervello di animali trattati con una somministrazione acuta di acido chinico alla stessa concentrazione del kiwi 1 (kiwi non diluito). È stata creata una curva di calibrazione con concentrazioni di standard autentico di acido chinico che vanno da 6 a 60 pg/ μ l con un R^2 di 0,9969. Otto diversi campioni di siero di diluizioni 1:80 in tre repliche sono stati plottati rispetto alla curva di calibrazione. Questa diluizione è stata scelta perché era la forma più diluita che ci permette di rilevare chiaramente l'acido chinico nei campioni di siero anche se era ancora presente un piccolo effetto matrice. Per questo motivo, l'effetto matrice è stato determinato attraverso esperimenti di spiking e i dati sono stati corretti per ottenere la quantificazione esatta che era $1,451 \pm 0,318$ ng di acido chinico/ μ l di siero.

La quantificazione nel cervello non è stata possibile perché durante la diluizione degli estratti cerebrali il segnale dovuto all'acido chinico è scomparso alle diluizioni in cui l'effetto matrice era ancora troppo alto per consentire una quantificazione accurata. Questo non è sorprendente, dato che i fosfolipidi sono tra i principali responsabili dell'effetto matrice e dato che il cervello contiene quantità molto rilevanti di fosfolipidi. Per l'acido

caffeeico l'accurata quantificazione assoluta non era possibile sia nei sieri che nei cervelli.

References

1. WHO. Depression and Other Common Mental Disorders – Global Health Estimates; World Health Organization: 2017.
2. Nock, M.K.; Borges, G.; Bromet, E.J.; Alonso, J.; Angermeyer, M.; Beautrais, A.; Bruffaerts, R.; Chiu, W.T.; de Girolamo, G.; Gluzman, S., et al. Cross-national prevalence and risk factors for suicidal ideation, plans and attempts. *Br J Psychiatry* 2008, 192, 98-105.
3. Oyebode, O.; Gordon-Dseagu, V.; Walker, A.; Mindell, J.S. Fruit and vegetable consumption and all-cause, cancer and CVD mortality: analysis of Health Survey for England data. *J Epidemiol Community Health* 2014, 68, 856-862, doi:<https://doi.org/10.1136/jech-2013-203500>.
4. Marx, W.; Lane, M.; Hockey, M.; Aslam, H.; Berk, M.; Walder, K.; Borsini, A.; Firth, J.; Pariante, C.M.; Berding, K., et al. Diet and depression: exploring the biological mechanisms of action. *Mol Psychiatry* 2020, <https://doi.org/10.1038/s41380-020-00925-x>.
5. Vitiello, V.; Germani, A.; Capuzzo Dolcetta, E.; Donini, L.M.; Del Balzo, V. The New Modern Mediterranean Diet Italian Pyramid. *Ann Ig* 2016, 28, 179-186.
6. Nooyens, A.C.; Bueno-de-Mesquita, H.B.; van Boxtel, M.P.; van Gelder, B.M.; Verhagen, H.; Verschuren, W.M. Fruit and vegetable intake and cognitive decline in

middle-aged men and women: the Doetinchem Cohort Study. *Br J Nutr* 2011, 106, 752-761.

7. Sanchez-Villegas, A.; Henriquez-Sanchez, P.; Ruiz-Canela, M.; Lahortiga, F.; Molero, P.; Toledo, E.; Martinez-Gonzalez, M.A. A longitudinal analysis of diet quality scores and the risk of incident depression in the SUN Project. *BMC Med* 2015, 13, 197.

8. White, B.A.; Horwath, C.C.; Conner, T.S. Many apples a day keep the blues away--daily experiences of negative and positive affect and food consumption in young adults. *Br J Health Psychol* 2013, 18, 782-798.

9. Conner, T.S.; Brookie, K.L.; Carr, A.C.; Mainvil, L.A.; Vissers, M.C.M. Let them eat fruit! The effect of fruit and vegetable consumption on psychological well-being in young adults: A randomized controlled trial. *Plos One* 2017, 12, e0171206.

10. Carr, A.C.; Bozonet, S.M.; Pullar, J.M.; Vissers, M.C. Mood improvement in young adult males following supplementation with gold kiwifruit, a high-vitamin C food. *J Nutr Sci* 2013, 2, e24.

11. Bell, L.; Lamport, D.J.; Butler, L.T.; Williams, C.M. A Review of the Cognitive Effects Observed in Humans Following Acute Supplementation with Flavonoids, and Their Associated Mechanisms of Action. *Nutrients* 2015, 7, 10290-10306.

12. Kean, R.J.; Lamport, D.J.; Dodd, G.F.; Freeman, J.E.; Williams, C.M.; Ellis, J.A.; Butler, L.T.; Spencer, J.P.E. Chronic consumption of flavanone-rich orange juice is associated with cognitive benefits: an 8-wk, randomized, double-blind, placebo-controlled trial

in healthy older adults. *American Journal of Clinical Nutrition* 2015, 101, 506-514.

13. Muzammil, M.; Satish, S.; Praveenkumar, C.; Salyan, T.; Shabaraya, A. A study on anti-depressant activity of fresh fruit juice of *actinidia deliciosa* in experimental mice *International Journal of Pharma And Chemical Research* 2019, 5, 5.

14. Bauer, M.E.; Teixeira, A.L. Inflammation in psychiatric disorders: what comes first? *Ann N Y Acad Sci* 2019, 1437, 57-67.

15. Moylan, S.; Berk, M.; Dean, O.M.; Samuni, Y.; Williams, L.J.; O'Neil, A.; Hayley, A.C.; Pasco, J.A.; Anderson, G.; Jacka, F.N., et al. Oxidative & nitrosative stress in depression: why so much stress? *Neuroscience and biobehavioral reviews* 2014, 45, 46-62.

16. Liao, Y.; Xie, B.; Zhang, H.; He, Q.; Guo, L.; Subramaniapillai, M.; Fan, B.; Lu, C.; McLntyre, R.S. Efficacy of omega-3 PUFAs in depression: A meta-analysis. *Transl Psychiatry* 2019, 9, 190.

17. Traber, M.G.; Stevens, J.F. Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radic Biol Med* 2011, 51, 1000-1013.

18. Wang, J.; Hodes, G.E.; Zhang, H.; Zhang, S.; Zhao, W.; Golden, S.A.; Bi, W.; Menard, C.; Kana, V.; Leboeuf, M., et al. Epigenetic modulation of inflammation and synaptic plasticity promotes resilience against stress in mice. *Nat Commun* 2018, 9, 477.

19. Liu, R.H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am J Clin Nutr* 2003, 78, 517S-520S.

20. Verpoorte, R.; Choi, Y.H.; Kim, H.K. NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. *Phytochemistry Reviews* 2007, 6, 3-14.
21. Ramakrishna, A.; Giridhar, P.; Ravishankar, G.A. Phytoserotonin: a review. *Plant Signal Behav* 2011, 6, 800-809.
22. McGhie, T.K. Secondary metabolite components of kiwifruit. *Adv Food Nutr Res* 2013, 68, 101-124.
23. McKinney, W.T., Jr.; Bunney, W.E., Jr. Animal model of depression. I. Review of evidence: implications for research. *Arch Gen Psychiatry* 1969, 21, 240-248.
24. Krishnan, V.; Nestler, E.J. Animal models of depression: molecular perspectives. In *Molecular and functional models in neuropsychiatry*, Hagan, J.J., Ed. Springer Verlag.: Berlin, Heidelberg, 2011.
25. Porsolt, R.D.; Bertin, A.; Jalfre, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1977, 229, 327-336.
26. Steru, L.; Chermat, R.; Thierry, B.; Simon, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* 1985, 85, 367-370.
27. Cryan, J.F.; Mombereau, C.; Vassout, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 2005, 29, 571-625.
28. Cryan, J.F.; Page, M.E.; Lucki, I. Differential behavioral effects of the antidepressants reboxetine,

fluoxetine, and moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment. *Psychopharmacology* 2005, 182, 335-344.

29. Barco, A.; Benetti, S.; Risi, C.D.; Marchetti, P.; Pollini, G.P.; Zanirato, V. D-(-)-Quinic acid: a chiron store for natural product synthesis. *Tetrahedron: Asymmetry* 1997, 8, 3515-3545.

30. Clifford, M.N.; Jaganath, I.B.; Ludwig, I.A.; Crozier, A. Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity. *Nat Prod Rep* 2017, 34, 1391-1421.

31. Chung, I.-M.; Kim, M.-Y.; Park, W.-H.; Moon, H.-I. Quinic acid derivatives from *Saussurea triangulata* attenuates glutamate-induced neurotoxicity in primary cultured rat cortical cells. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 2009, 24, 188-191, doi:10.1080/14756360802051230.

32. Liu, Z.H.; Zhang, S.Y.; Yu, Y.Y.; Su, G.Q. (-)-4-O-(4-O- β -D-glucopyranosylcaffeoyl)quinic acid presents antitumor activity in HT-29 human colon cancer in vitro and in vivo. *Molecular & Cellular Toxicology* 2015, 11, 457-463.

33. Espindola, K.M.M.; Ferreira, R.G.; Narvaez, L.E.M.; Silva Rosario, A.C.R.; da Silva, A.H.M.; Silva, A.G.B.; Vieira, A.P.O.; Monteiro, M.C. Chemical and Pharmacological Aspects of Caffeic Acid and Its Activity in Hepatocarcinoma. *Front Oncol* 2019, 9, 541.

34. Scapagnini, G.; Sonya, V.; Nader, A.G.; Calogero, C.; Zella, D.; Fabio, G. Modulation of Nrf2/ARE Pathway by Food Polyphenols: A Nutritional Neuroprotective

- Strategy for Cognitive and Neurodegenerative Disorders. *Molecular Neurobiology* 2011, 44, 192-201, doi:10.1007/s12035-011-8181-5.
35. Huang, Y.; Jin, M.; Pi, R.; Zhang, J.; Chen, M.; Ouyang, Y.; Liu, A.; Chao, X.; Liu, P.; Liu, J., et al. Protective effects of caffeic acid and caffeic acid phenethyl ester against acrolein-induced neurotoxicity in HT22 mouse hippocampal cells. *Neurosci Lett* 2013, 535, 146-151.
36. Lin, H.H.; Tsai, P.S.; Fang, S.C.; Liu, J.F. Effect of kiwifruit consumption on sleep quality in adults with sleep problems. *Asia Pac J Clin Nutr* 2011, 20, 169-174.
37. Kay, D.C.; Martin, W.R. LSD and tryptamine effects on sleep/wakefulness and electrocorticogram patterns in intact cats. *Psychopharmacology* 1978, 58, 223-228.
38. McKenna, D.J.; Towers, G.H.; Abbott, F. Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants: tryptamine and beta-carboline constituents of ayahuasca. *J Ethnopharmacol* 1984, 10, 195-223
39. Dulawa SC, Holick KA, Gundersen B, Hen R (2004) Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 29: 1321-30.
40. Mayorga, A.; Lucki, I. Limitations on the use of the C57BL/6 mouse in the tail suspension test. *Psychopharmacology (Berl)* 2001, 155, 110-112.
41. Diaz SL, Maroteaux L (2011) Implication of 5-HT2B receptors in the serotonin syndrome. *Neuropharmacology* 61: 495-502.

42. Vingtdoux V, Giliberto L, Zhao H, Chandakkar P, Wu Q, Simon JE, Janle EM, Lobo J, Ferruzzi MG, Davies P, Marambaud P (2010) AMP-activated protein kinase signaling activation by resveratrol modulates amyloid-beta peptide metabolism. *J Biol Chem* 285: 9100-13.
43. Wang J, Tang C, Ferruzzi MG, Gong B, Song BJ, Janle EM, Chen TY, Cooper B, Varghese M, Cheng A, Freire D, Bilski A, Roman J, Nguyen T, Ho L, Talcott ST, Simon JE, Wu Q, Pasinetti GM (2013) Role of standardized grape polyphenol preparation as a novel treatment to improve synaptic plasticity through attenuation of features of metabolic syndrome in a mouse model. *Mol Nutr Food Res* 57: 2091-102.
44. Lintas C, Adorisio S, Cappelloni M, Monastra E (1991) Composition and Nutritional-Evaluation of Kiwifruit Grown in Italy. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 19: 341-344.
45. Guo J, Yuan Y, Dou P, Yue T (2017) Multivariate statistical analysis of the polyphenolic constituents in kiwifruit juices to trace fruit varieties and geographical origins. *Food Chem* 232: 552-559.
46. Flores P, Hellín P, Fenoll J (2012) Determination of organic acids in fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem-mass spectrometry. *Food Chemistry* 132: 1049-1054.
47. Denev P, Kratchanova M, Petrova I, Klisurova D, Georgiev Y, Ognyanov M, Yanakieva I (2018) Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot) Fruits and Functional Drinks Differ Significantly in Their Chemical Composition and Antioxidant Activity. *Journal*

of Chemistry 2018: 1-11.

48. Guertin KA, Loftfield E, Boca SM, Sampson JN, Moore SC, Xiao Q, Huang WY, Xiong XQ, Freedman ND, Cross AJ, Sinha R (2015) Serum biomarkers of habitual coffee consumption may provide insight into the mechanism underlying the association between coffee consumption and colorectal cancer. *American Journal of Clinical Nutrition* 101: 1000-1011.

49. Hagl S, Deusser H, Soyalan B, Janzowski C, Will F, Dietrich H, Albert FW, Rohner S, Richling E (2011) Colonic availability of polyphenols and D-(-)-quinic acid after apple smoothie consumption. *Mol Nutr Food Res* 55: 368-77.

50. Jang SA, Park DW, Kwon JE, Song HS, Park B, Jeon H, Sohn EH, Koo HJ, Kang SC (2017) Quinic acid inhibits vascular inflammation in TNF- α -stimulated vascular smooth muscle cells. *Biomed Pharmacother* 96: 563-571.

51. Heikkilä E, Hermant A, Thevenet J, Bermont F, Kulkarni S, Ratajczak J, Santo-Domingo J, Dioum EH, Canto C, Barron D, Wiederkehr A, De Marchi U (2019) The plant product quinic acid activates Ca²⁺-dependent mitochondrial function and promotes insulin secretion from pancreatic beta cells. *Br J Pharmacol*. 176:3250-3263. *Food and Chemical Toxicology* 53:359-363.

52. Cinkilic N, Cetintas SK, Zorlu T, Vatan O, Yilmaz D, Cavas T, Tunc S, Ozkan L, Bilaloglu R (2013) Radioprotection by two phenolic compounds: Chlorogenic and quinic acid, on X-ray induced DNA damage in human blood lymphocytes in vitro.

53. Xu J, Lee SS, Seo H, Pang L, Jun Y, Zhang RY, Zhang

- ZY, Kim P, Lee W, Kron SJ, Yeo Y (2018) Quinic Acid-Conjugated Nanoparticles Enhance Drug Delivery to Solid Tumors via Interactions with Endothelial Selectins. *Small* 14: e1803601.
54. Phan MAT, Paterson J, Bucknall M, Arcot J (2018) Interactions between phytochemicals from fruits and vegetables: Effects on bioactivities and bioavailability. *Crit Rev Food Sci Nutr* 58: 1310-1329.
55. Caesar LK, Cech NB (2019) Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1 + 1 does not equal 2. *Nat Prod Rep* 36: 869-888.
56. Petit-Demouliere, B.; Chenu, F.; Bourin, M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology* 2005, 177, 245-255.
57. Can, A.; Dao, D.T.; Terrillion, C.E.; Piantadosi, S.C.; Bhat, S.; Gould, T.D. The tail suspension test. *J Vis Exp* 2012.
58. Cavaliere, C.; Foglia, P.; Gubbiotti, R.; Sacchetti, P.; Samperi, R.; Lagana, A. Rapid-resolution liquid chromatography/mass spectrometry for determination and quantitation of polyphenols in grape berries. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2008, 22, 3089-3099.
59. Toffali, K.; Ceoldo, S.; Stocchero, M.; Levi, M.; Guzzo, F. Carrot-specific features of the phenylpropanoid pathway identified by feeding cultured cells with defined intermediates. *Plant Sci* 2013, 209, 81-92.
60. Lucki, I.; Dalvi, A.; Mayorga, A.J. Sensitivity to the effects of pharmacologically selective antidepressants in different strains of mice.

Psychopharmacology 2001, 155, 315-322.

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

RIVENDICAZIONI

1) Prodotto consistente in

a) acido chinico, un suo derivato o un suo precursore, o

b) una composizione farmaceutica comprendente o consistente in acido chinico, un suo derivato o precursore, come principio attivo, insieme a uno o più eccipienti e/o coadiuvanti,

per l'uso nel trattamento di un disturbo dell'umore.

2) Prodotto secondo la rivendicazione 1, per l'uso secondo la rivendicazione 1, in cui detto disturbo dell'umore è scelto dal gruppo consistente in disturbo depressivo, come disturbo depressivo maggiore (MDD), disturbo depressivo persistente (distimia), disturbo depressivo indotto da sostanze/farmaci e disturbo depressivo a causa di altra condizione medica, disturbi disforici premestruali, disturbo da disregolazione dell'umore dirompente.

3) Prodotto secondo la rivendicazione 1 per l'uso secondo una qualsiasi delle indicazioni 1-2, in cui detto derivato è scelto dal gruppo consistente in un estere o un etere di acido chinico con uno zucchero o un estere di acido chinico con un acido organico, un'amide di acido chinico con un metabolita contenente azoto, come un amminoacido, un sale di acido chinico farmaceuticamente accettabile.

4) Prodotto secondo la rivendicazione 3 per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-2, in cui l'estere dell'acido chinico con uno zucchero è scelto

nel gruppo consistente in chinoil glucosio, chinoil galattosio, mentre l'etere dell'acido chinico con uno zucchero è il glicoside dell'acido chinico.

5) Prodotto secondo la rivendicazione 3 per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-2, in cui l'acido organico viene scelto dal gruppo consistente in acidi organici aromatici farmaceuticamente accettabili come acido cinnamico, acidi idrossicinnamici, acidi benzoico e idrossibenzoico o acidi organici alifatici come acido malico, acido citrico, acido isocitrico, acido fumarico, acido lattico, acido malonico, acido succinico, acido tartarico, a condizione che l'acido caffeico sia escluso.

6) Prodotto secondo la rivendicazione 3 per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-2, in cui il sale dell'acido chinico è un sale di acido chinico con un metallo alcalino o alcalino-terroso farmaceuticamente accettabile.

7) Prodotto secondo la rivendicazione 3 per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-2, in cui il precursore è l'acido shikimico.

8) Prodotto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-7, per l'uso secondo la rivendicazione 1-7, in cui la composizione farmaceutica comprende ulteriormente acido caffeico o altri acidi idrossicinnammici accettabili dal punto di vista farmaceutico.

9) Prodotto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-8, per l'uso secondo la rivendicazione 1-8, in cui il prodotto viene somministrato in una

quantità tale che il dosaggio per giorno di acido chinico vari da 10 mg a 16 g, preferibilmente da 0,5 g a 8,5 g, più preferibilmente da 1 g a 8 g, ancora più preferibilmente da 2 g a 6,5 g, in modo ottimale da 3,5 g a 4,5 g.

10) Prodotto secondo la rivendicazione 9 per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-8, in cui il prodotto viene somministrato per via orale.

11) Prodotto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-10, per l'uso secondo la rivendicazione 1-10, in cui la composizione farmaceutica è in una forma adatta per la somministrazione orale, come nanoparticelle, compressa, capsula, sciroppo.

12) Prodotto vegetale composto da acido chinico, un derivato o un suo precursore da utilizzare nel trattamento di un disturbo dell'umore, a condizione che il prodotto vegetale non sia kiwi o uva.

13) Prodotto vegetale comprendente acido chinico, un derivato o un suo precursore per l'uso nel trattamento di un disturbo dell'umore, in cui il prodotto vegetale viene somministrato in una quantità tale che il dosaggio per giorno di acido chinico vari da 10 mg a 16 g, preferibilmente da 0,5 g a 8,5 g, più preferibilmente da 1 g a 8 g, ancora più preferibilmente da 2 g a 6,5 g, in modo ottimale da 3,5 g a 4,5 g.

14) Prodotto vegetale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 12-13 per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 12-13, in cui detto disturbo dell'umore è scelto dal gruppo consistente in disturbo depressivo, come disturbo depressivo maggiore (MDD),

disturbo depressivo persistente (distimia), disturbo depressivo indotto da sostanze/farmaci e disturbo depressivo a causa di un'altra condizione medica, disturbi disforici premenstruali, disturbo da disregolazione dell'umore dirompente.

15) Prodotto vegetale secondo la rivendicazione 12, per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 12-13, in cui il precursore è l'acido shikimico.

16) Prodotto vegetale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 12-13 per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 12-13, in cui il prodotto vegetale comprende ulteriormente acido caffeico o altri acidi idrossicinnamici accettabili dal punto di vista farmaceutico.

17) Prodotto vegetale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 13-16, per l'uso secondo le rivendicazioni 13-16, in cui il prodotto vegetale è un frutto carnoso come kiwi o altre bacche come uva, lampone, mirtillo, mora, uva spina, drupacee come ciliegia, pesca, albicocca, pomi come mela e pere, pepi come melone e anguria, esperidi come arancia, limone, pompelmo, kumquat, clementina, preferibilmente kiwi.

18) Prodotto vegetale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 12-17, per l'uso secondo le rivendicazioni 12-17, in cui il prodotto vegetale viene somministrato per via orale.

19) Combinazione di acido chinico, un derivato o un suo precursore con acido caffeico o altri acidi idrossicinnamici accettabili dal punto di vista farmaceutico per l'uso separato o sequenziale nel

trattamento di un disturbo dell'umore.

20) Combinazione secondo la rivendicazione 19 per l'uso secondo la rivendicazione 19, in cui detto disturbo dell'umore è scelto dal gruppo consistente in disturbo depressivo, come disturbo depressivo maggiore (MDD), disturbo depressivo persistente (distimia), disturbo depressivo indotto da sostanze/farmaci e disturbo depressivo a causa di altra condizione medica, disturbi disforici premenstruali, disturbo da disregolazione dell'umore dirompente.

21) Combinazione secondo la rivendicazione 19 per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 19-20, in cui detto derivato è scelto dal gruppo consistente in un estere o un etere di acido chinico con uno zucchero o un estere di acido chinico con un acido organico, un'amide di acido chinico con un metabolita contenente azoto, quale un amminoacido, un sale di acido chinico farmaceuticamente accettabile.

22) Combinazione secondo la rivendicazione 19 per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 19-20, in cui l'estere dell'acido chinico con uno zucchero è scelto dal gruppo consistente in chinoil glucosio, chinoil galattosio, mentre l'etere di acido chinico con uno zucchero è un glicoside dell'acido chinico.

23) Combinazione secondo la rivendicazione 21 per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 19-20, in cui l'acido organico è scelto dal gruppo consistente in acidi organici aromatici accettabili dal punto di vista farmaceutico come acido cinnamico, acidi idrossicinnamici, acidi benzoico e idrossibenzoico o

acidi organici alifatici come acido malico, acido citrico, acido isocitrico, acido fumarico, acido lattico, acido malonico, acido succinico, acido tartarico, a condizione che l'acido caffeico sia escluso.

24) Combinazione secondo la rivendicazione 21 per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 19-20, in cui il sale dell'acido chininico è un sale di acido chinico con un metallo alcalino o alcalino-terroso accettabile dal punto di vista farmaceutico.

25) Combinazione secondo la rivendicazione 21 per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 19-20, in cui il precursore è l'acido shikimico.

26) Combinazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 19-25, per l'uso secondo la rivendicazione 19-25, in cui l'acido chinico, un derivato o un suo precursore viene somministrato in una quantità tale che il dosaggio per giorno di acido chinico vari da 10 mg a 16 g, preferibilmente da 0,5 g a 8,5 g, più preferibilmente da 1 g a 8 g, ancora più preferibilmente da 2 g a 6,5 g, in modo ottimale da 3,5 g a 4,5 g.

27) Combinazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 19-26, per l'uso secondo la rivendicazione 19-26, in cui la combinazione è somministrata per via orale.

28) Combinazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 19-27, per l'uso secondo la rivendicazione 19-27, in cui la combinazione è in una forma adatta per la somministrazione orale, come

nanoparticelle, compressa, capsula, sciroppo.

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

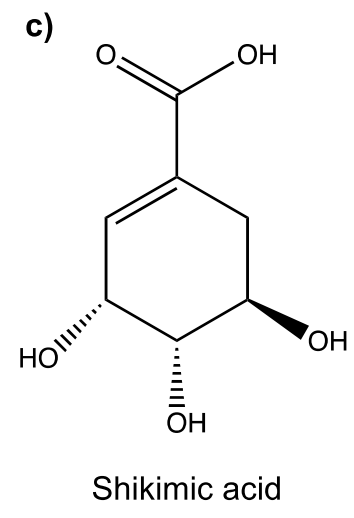
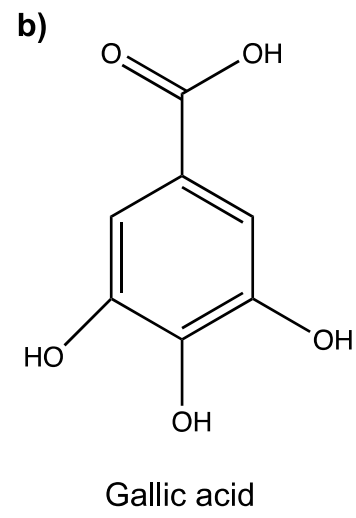
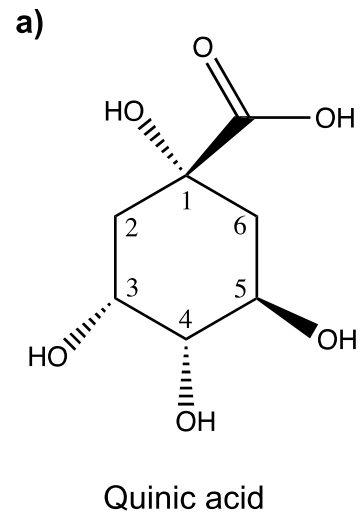


Figure 1

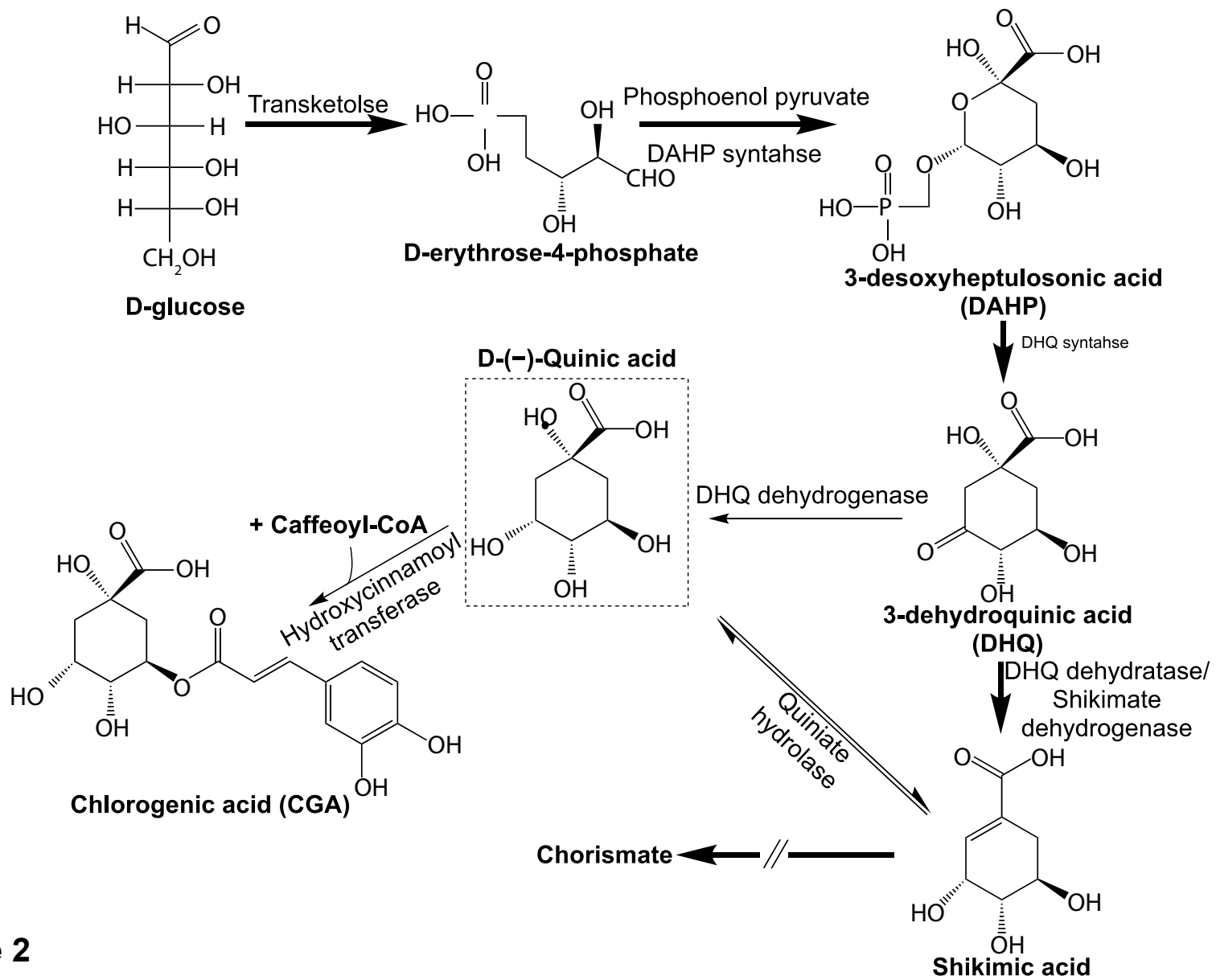


Figure 2

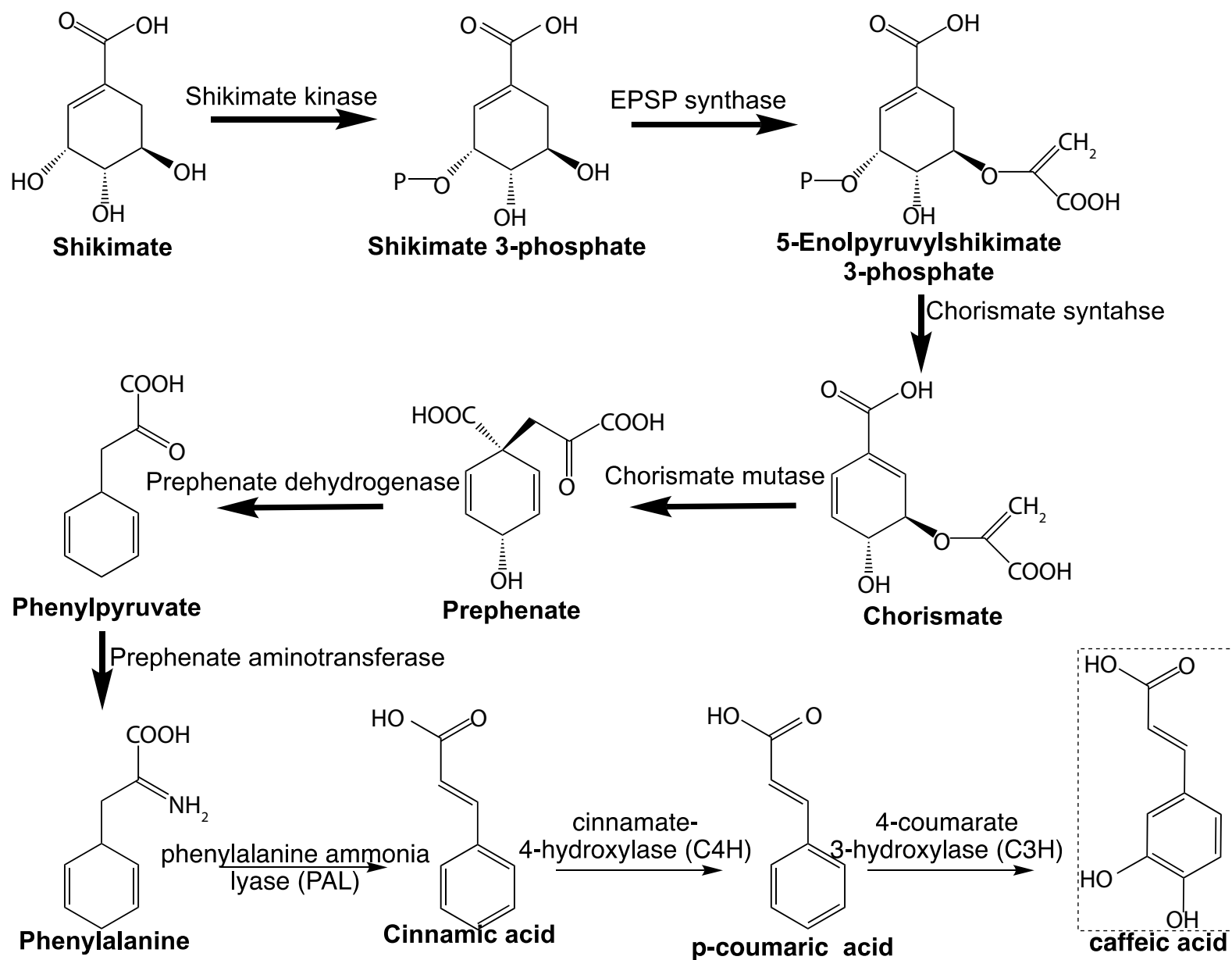


Figure 3

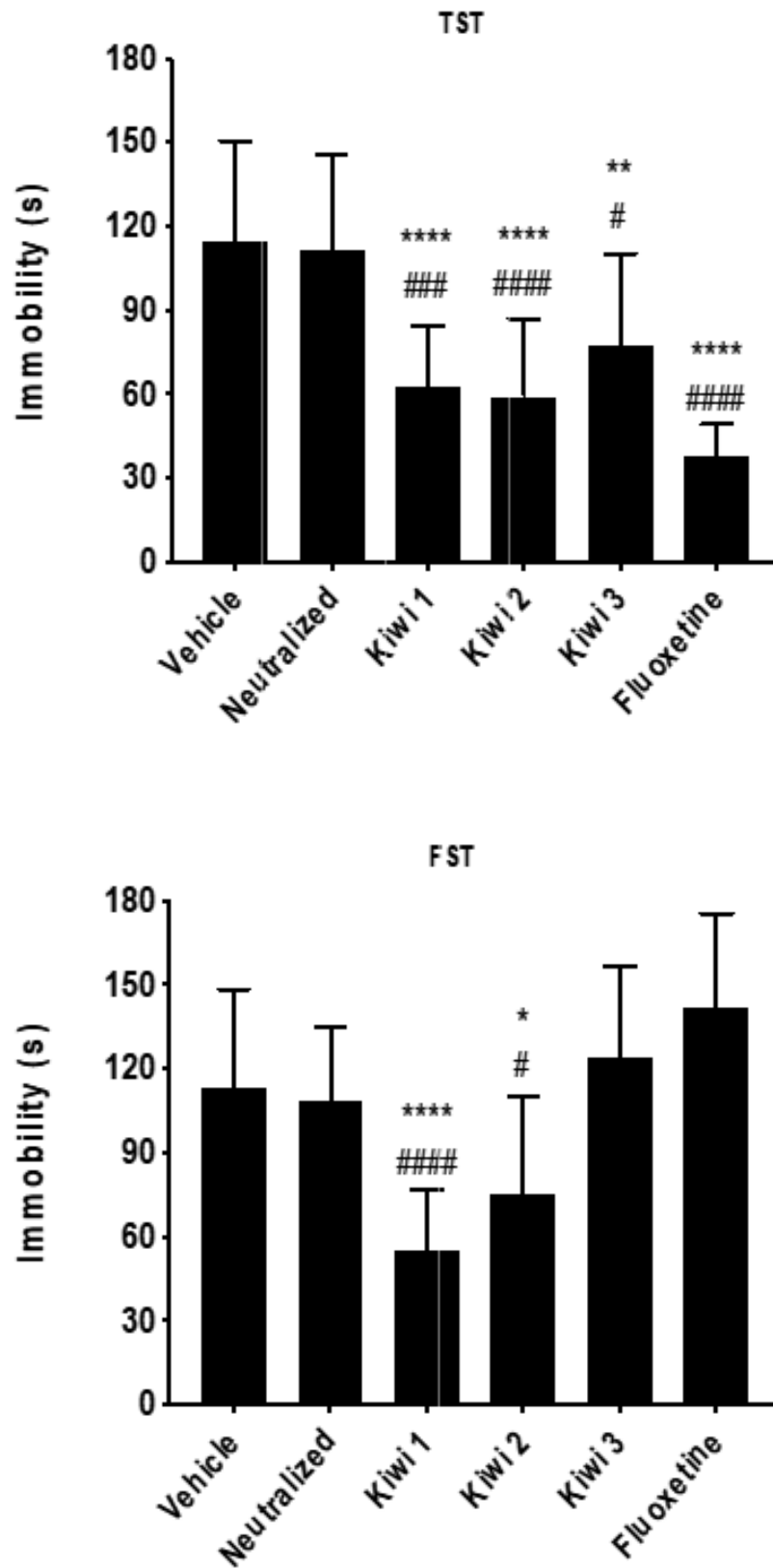


Figure 4

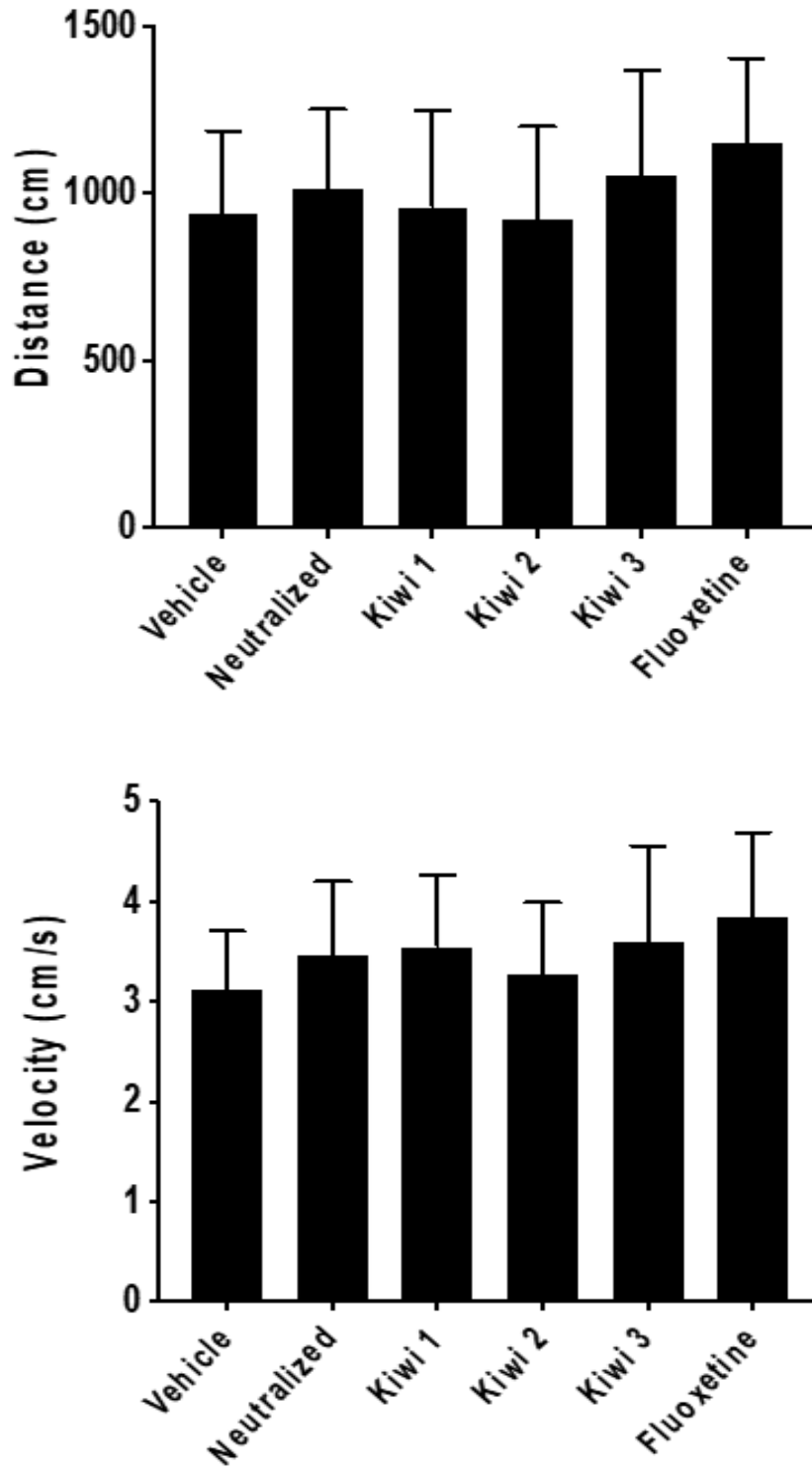


Figure 5

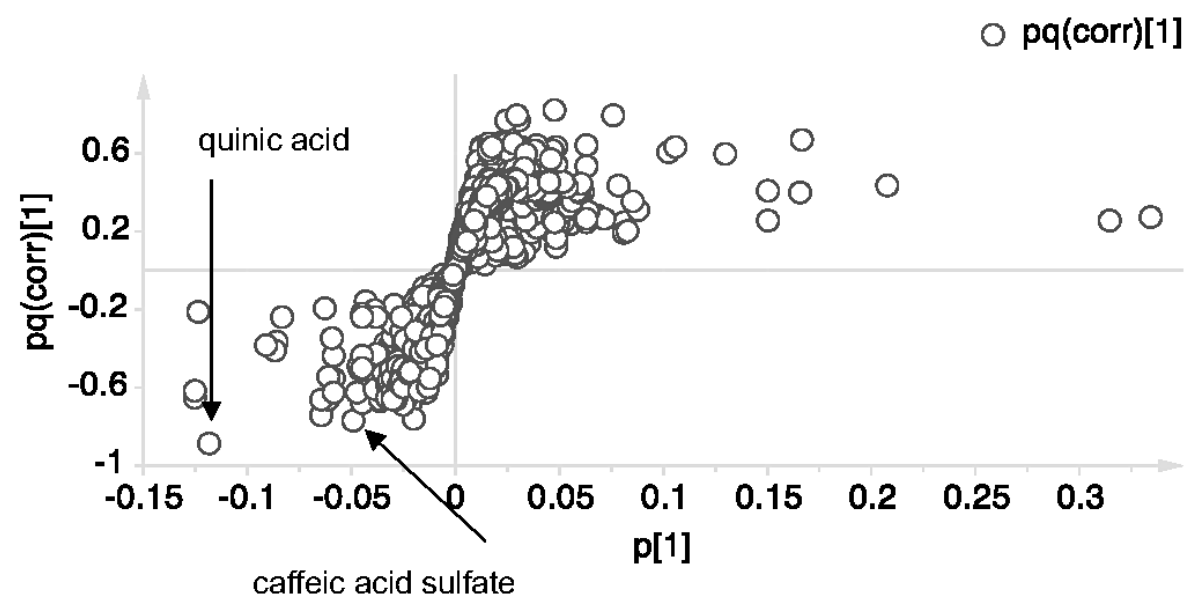
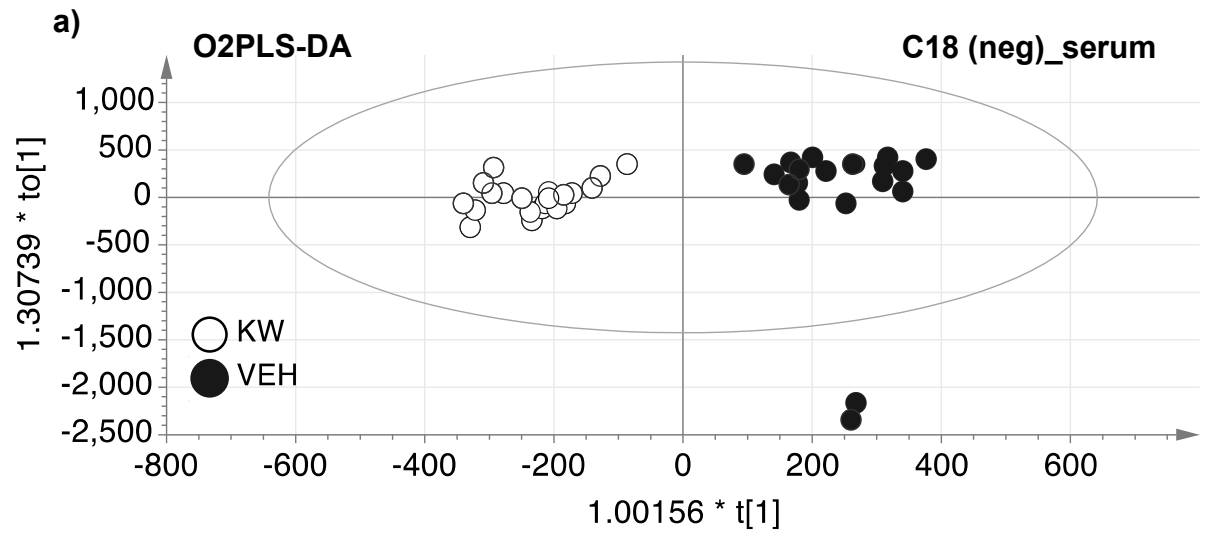


Figure 6

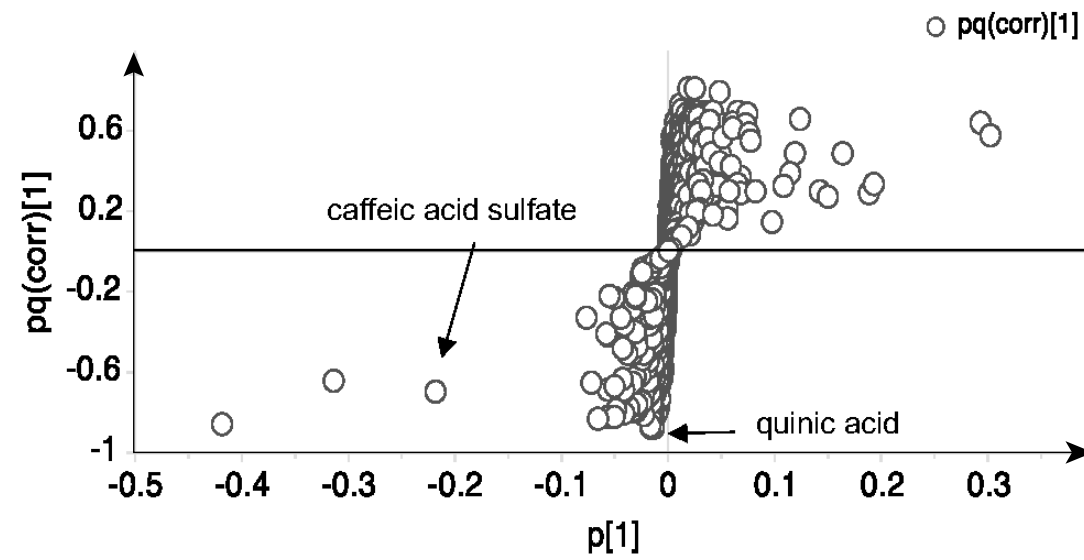
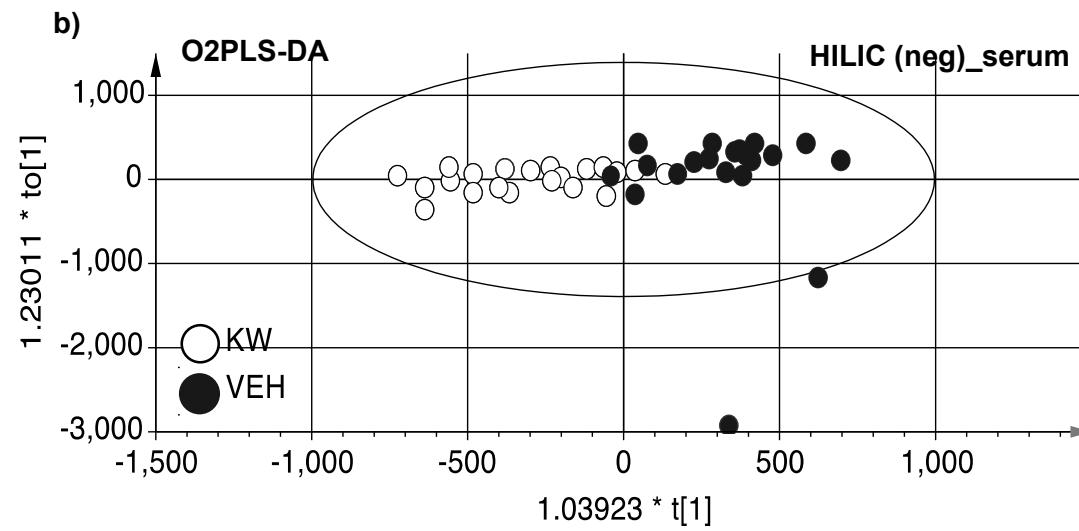


Figure 6

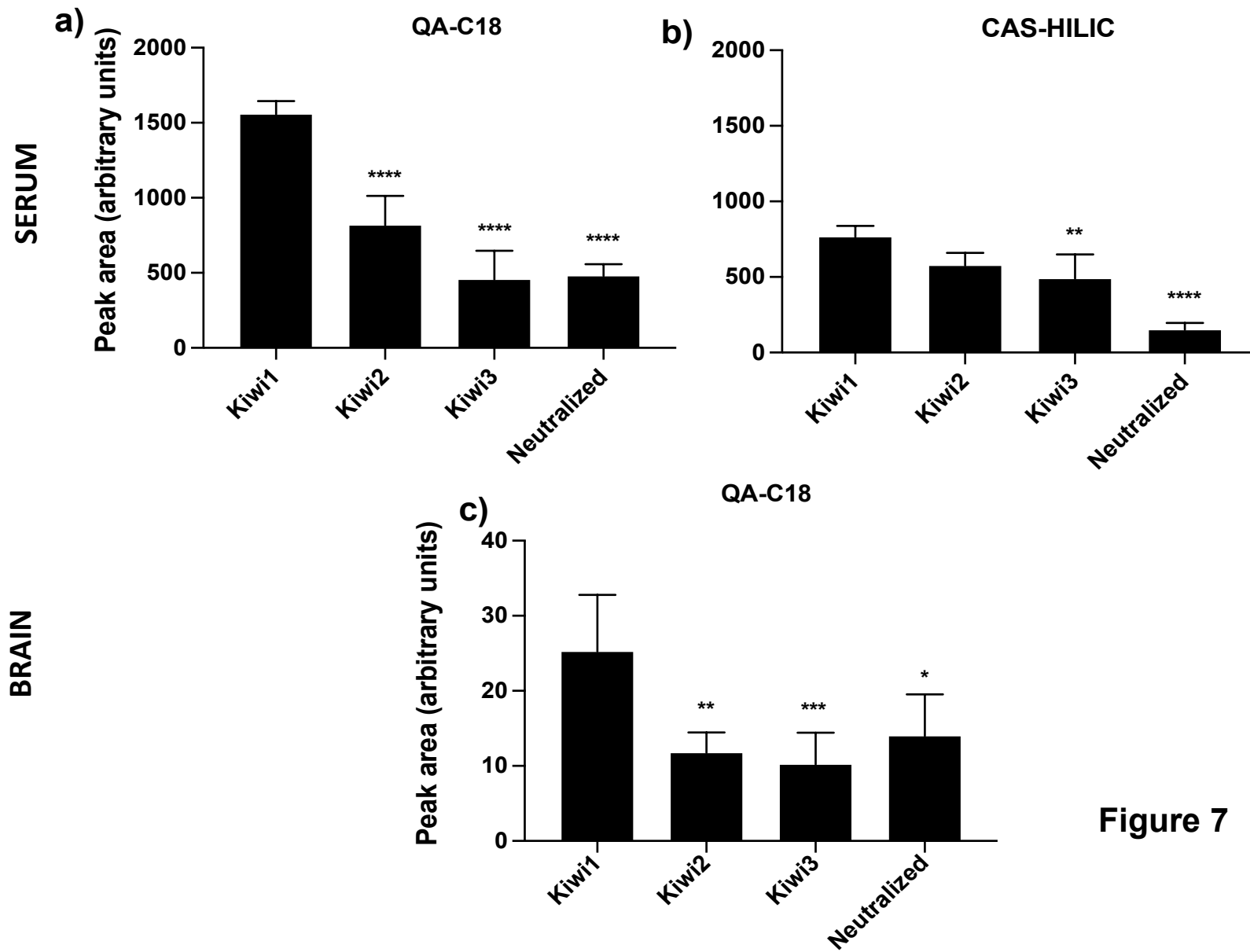


Figure 7

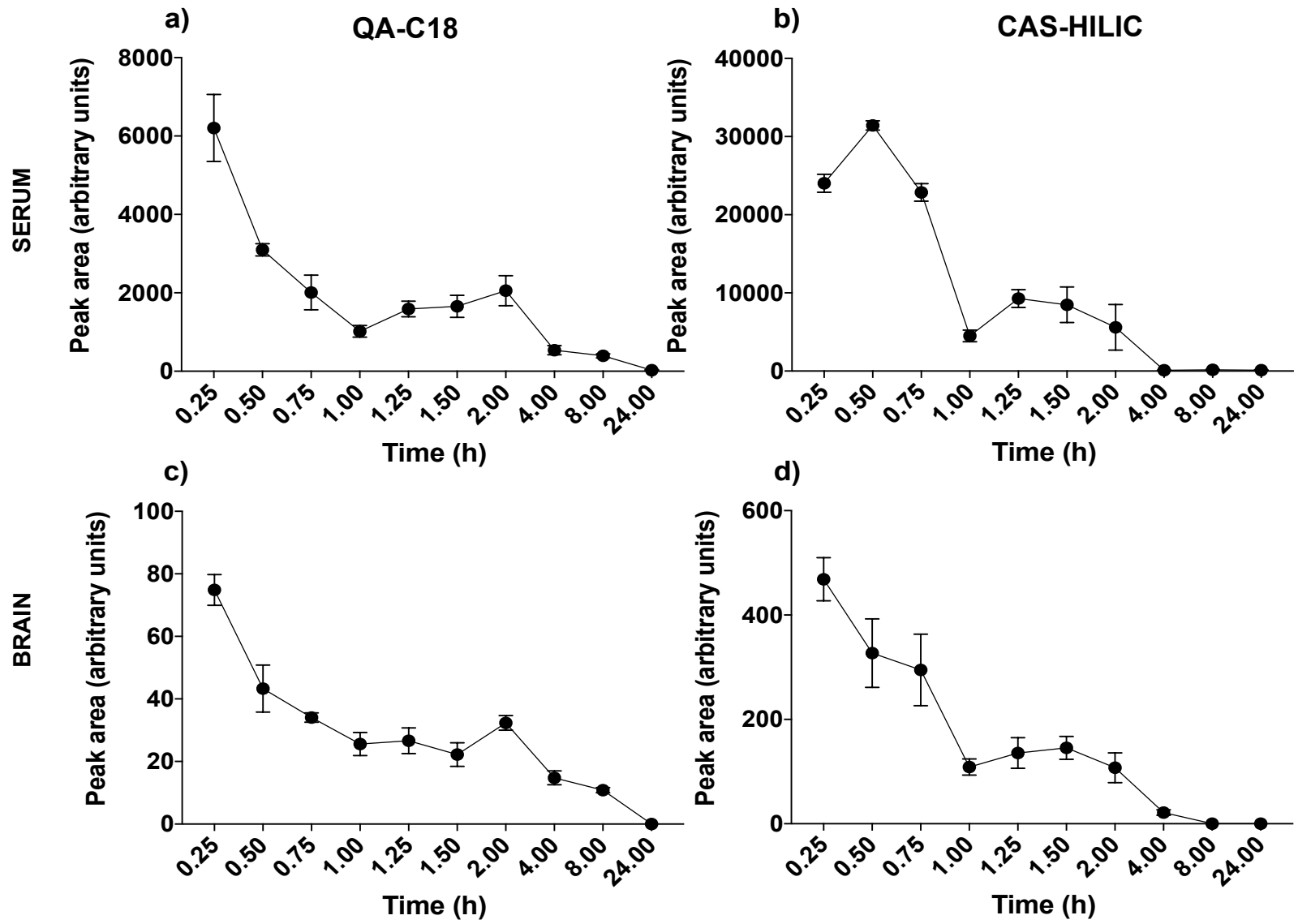


Figure 8

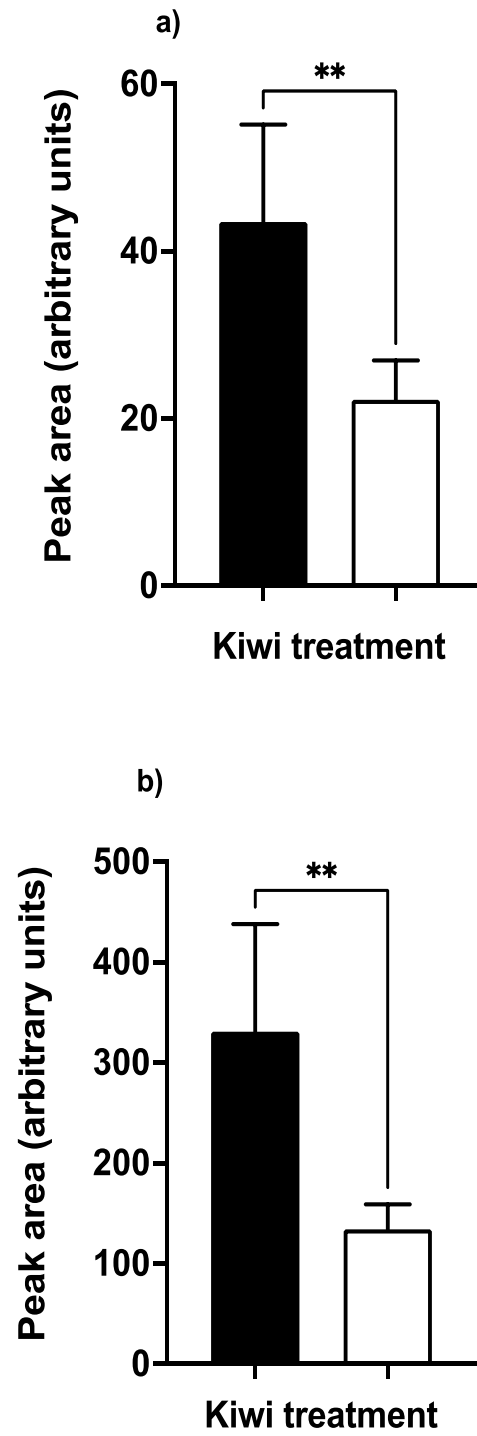


Figure 9

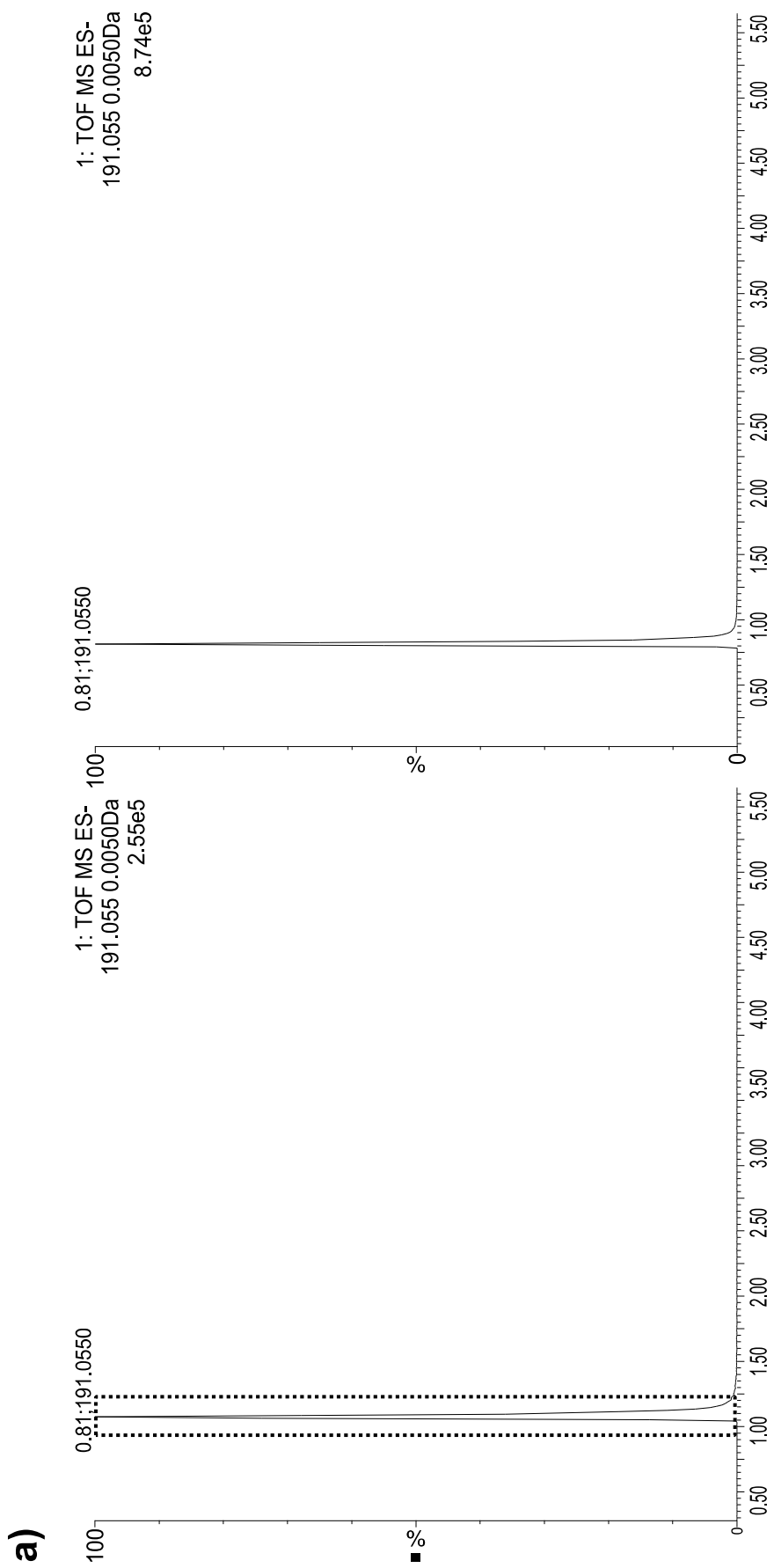


Figure 10

b)

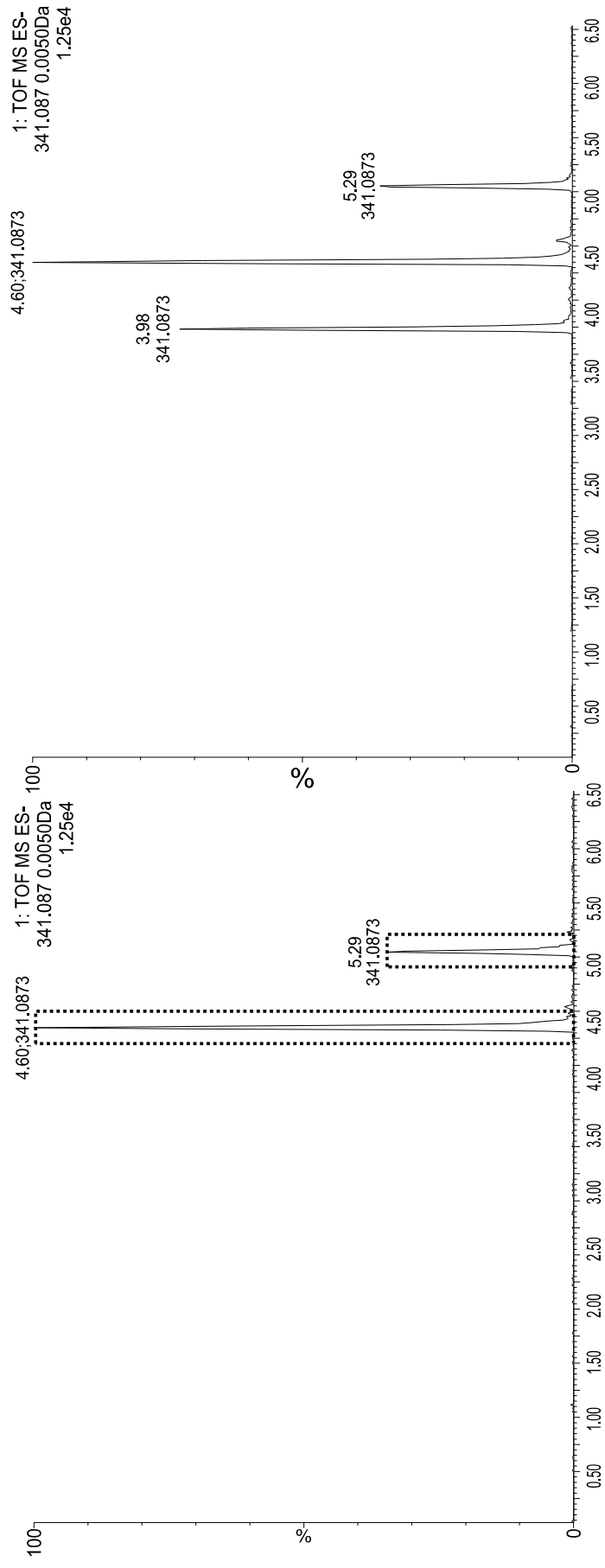


Figure 10

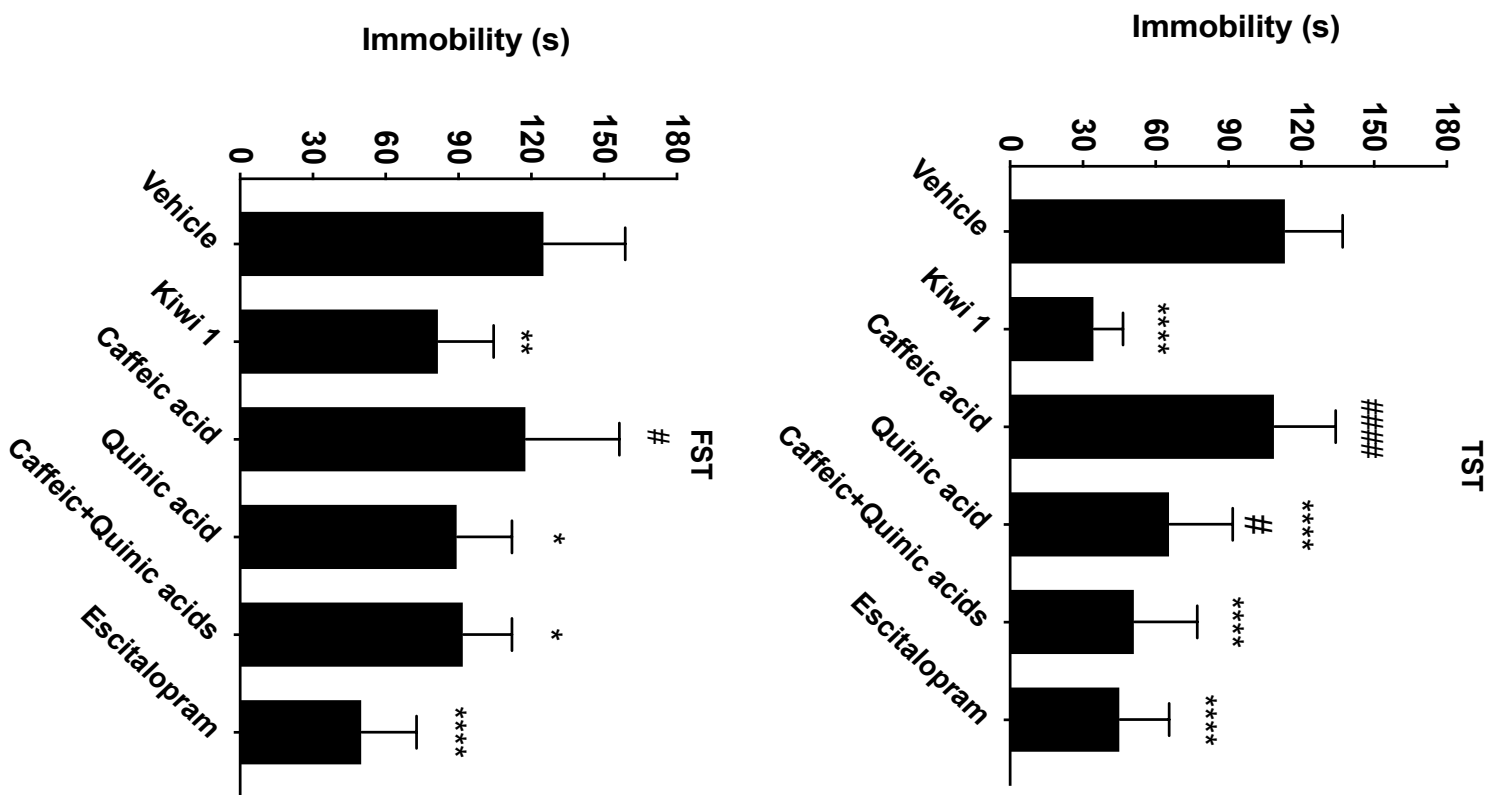


Figure 11

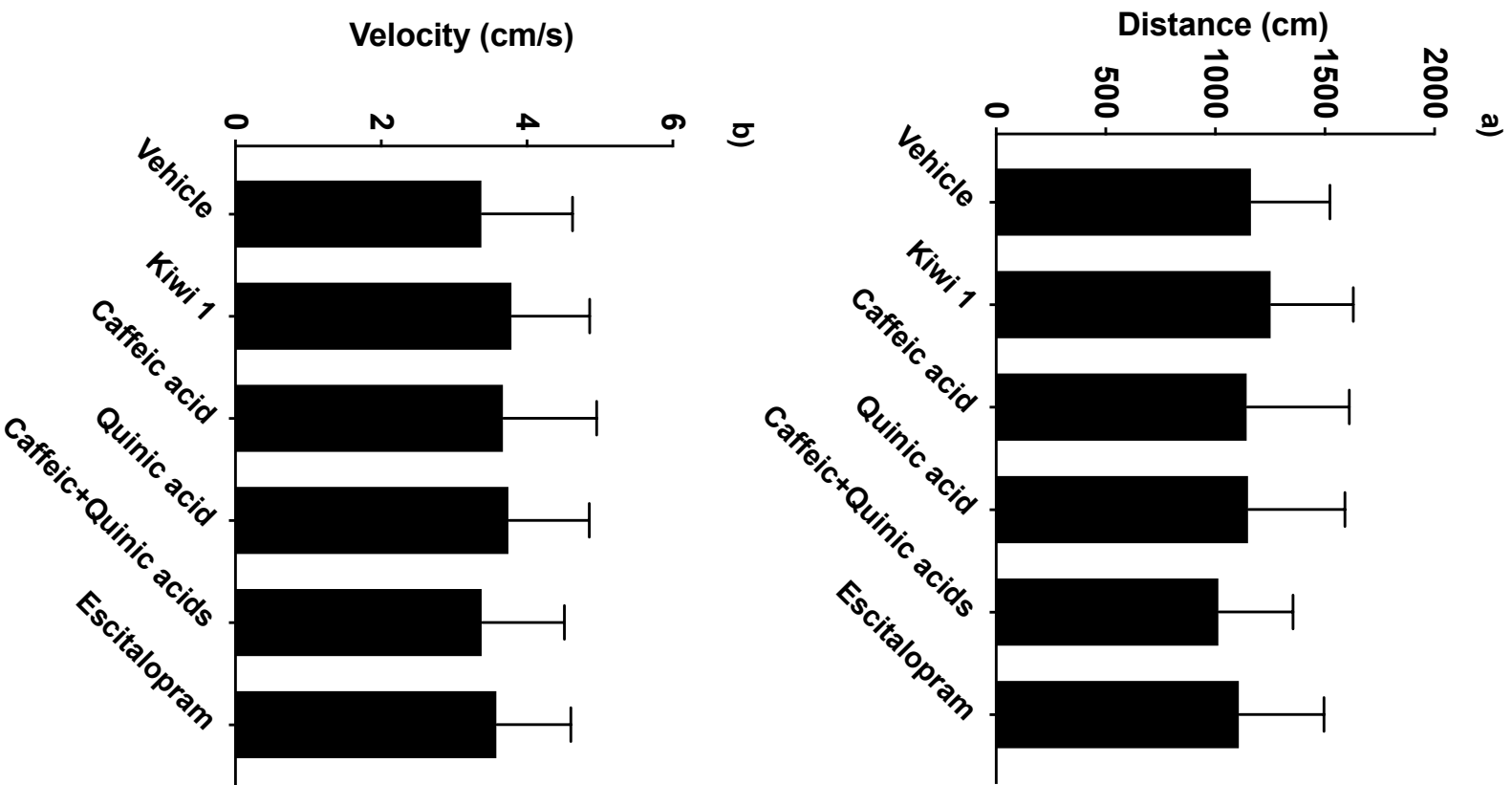


Figure 12

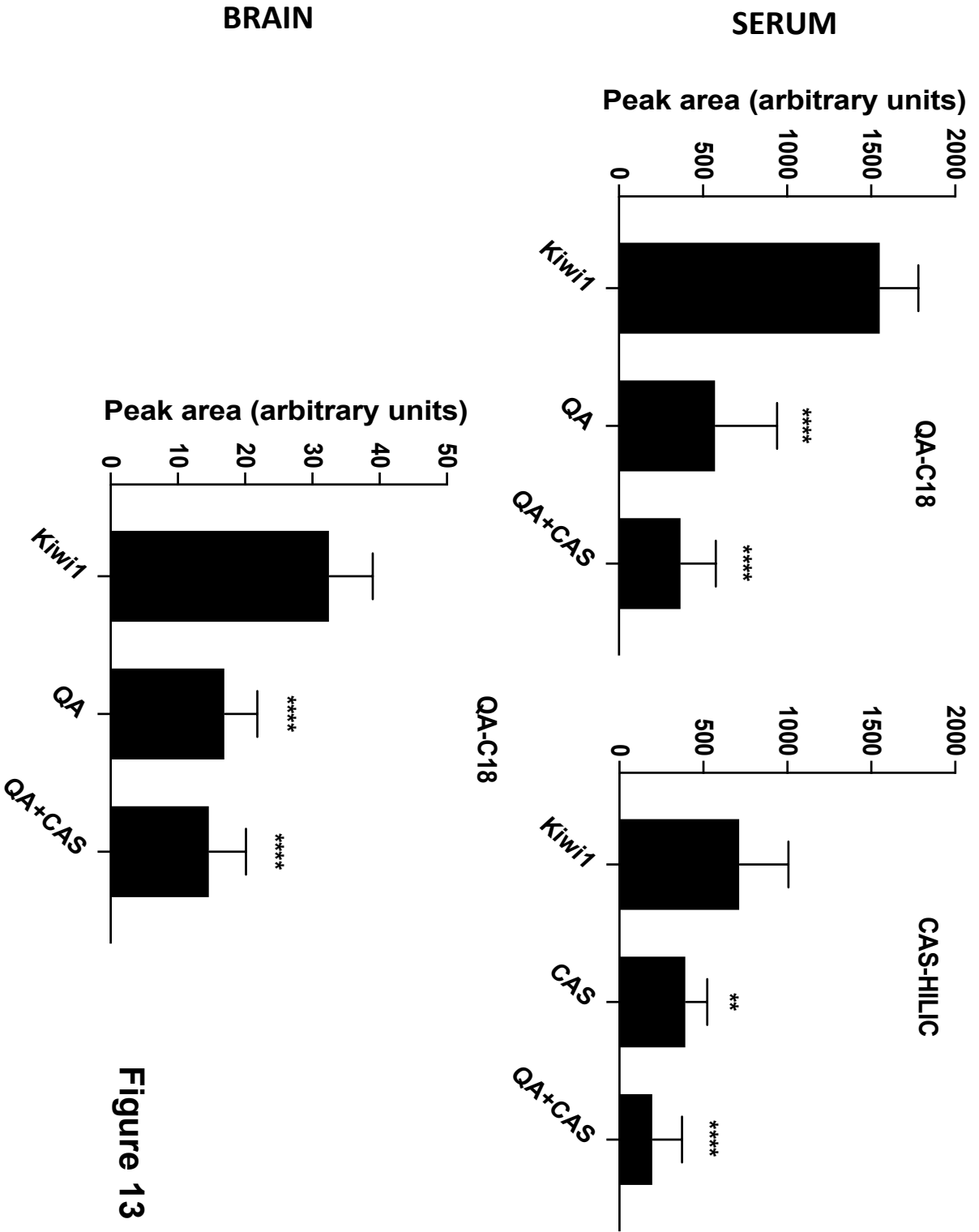


Figure 13

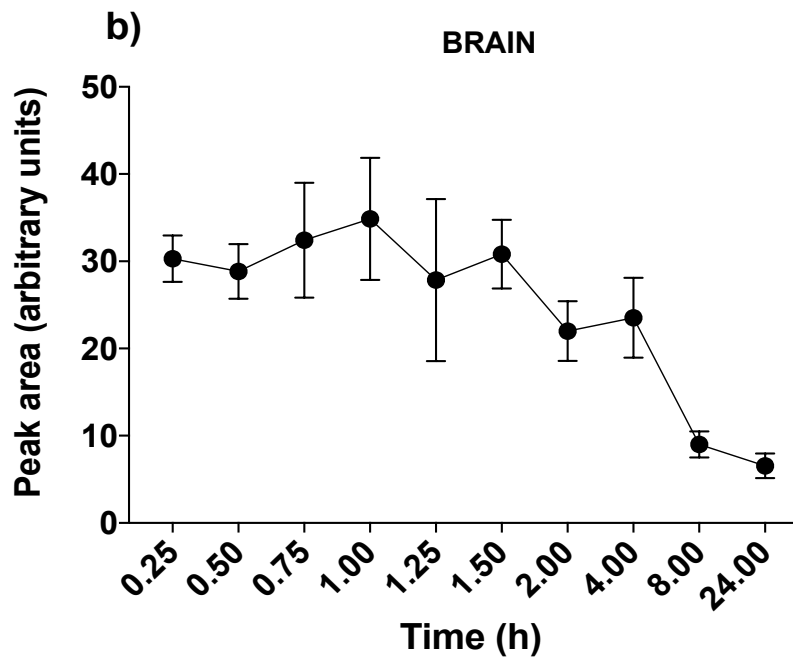
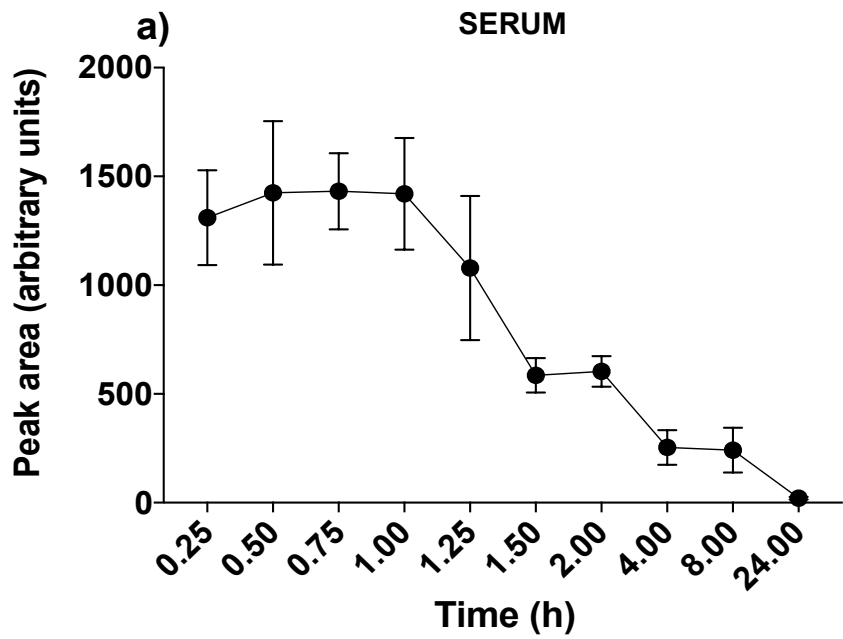


Figure 14

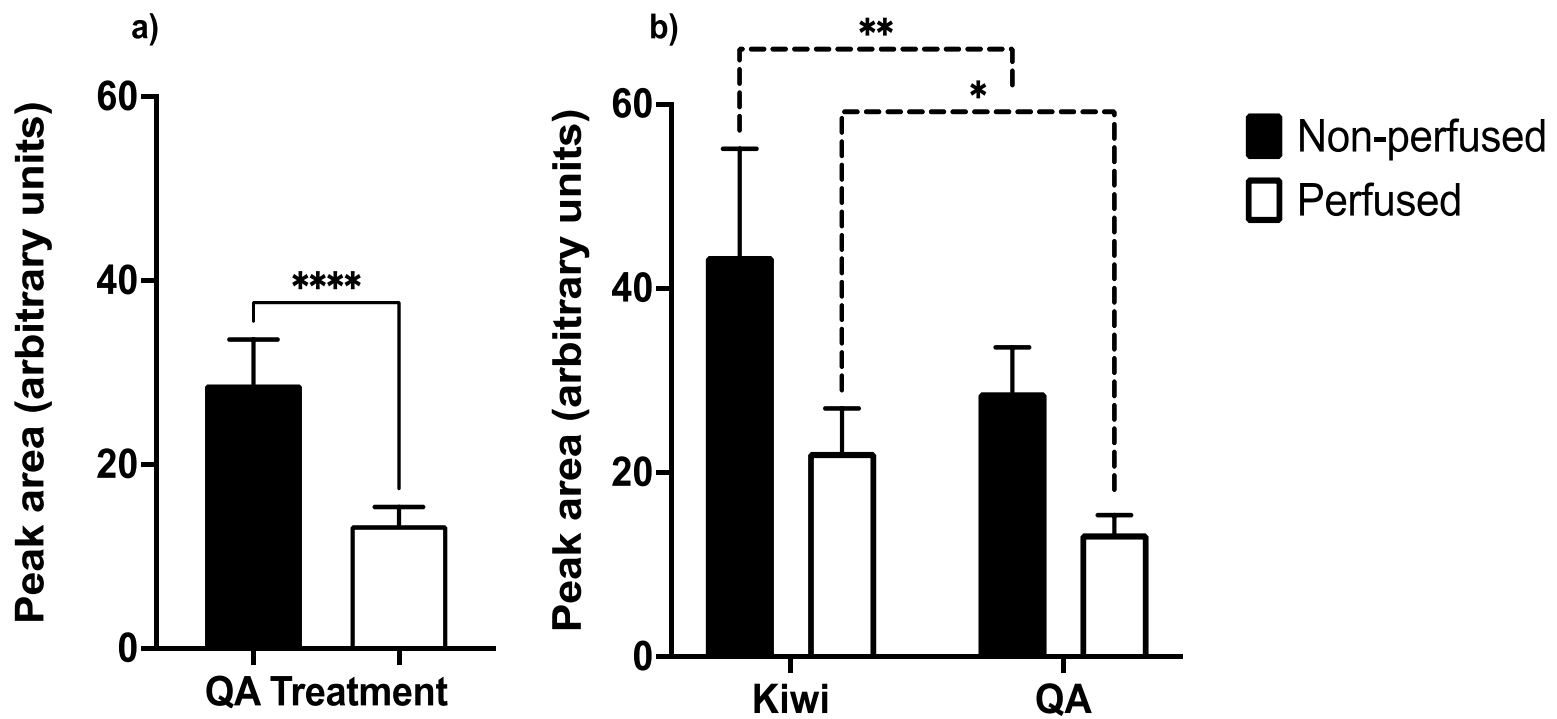
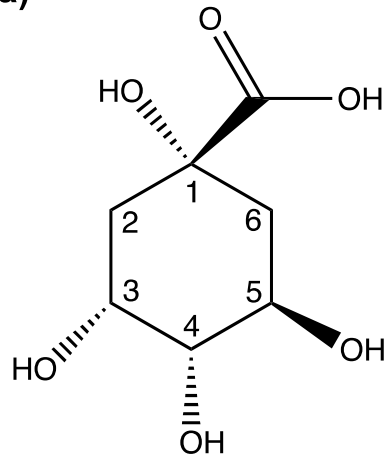


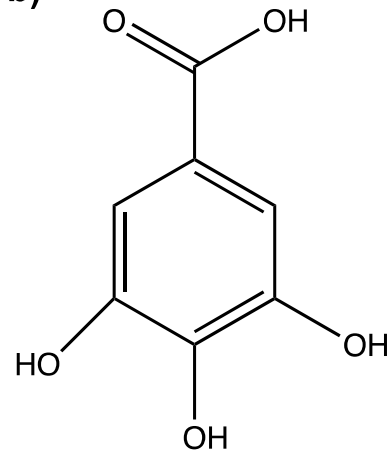
Figure 15

a)



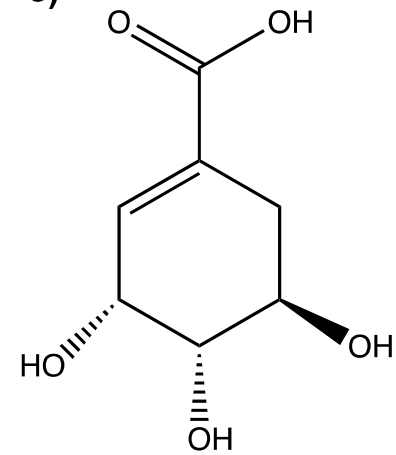
Acido chinico

b)



Acido gallico

c)



Acido shikimico

Figura 1

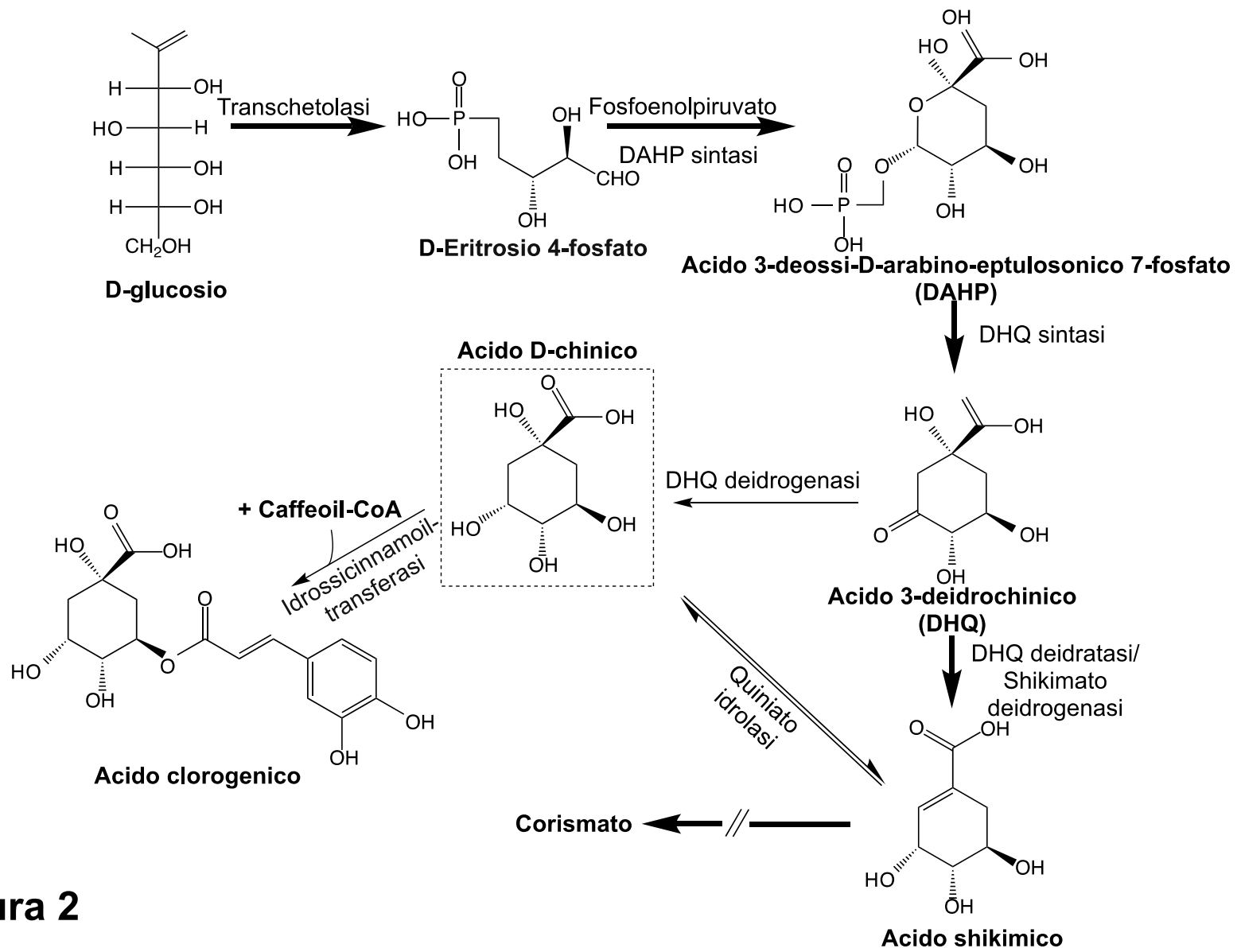


Figura 2

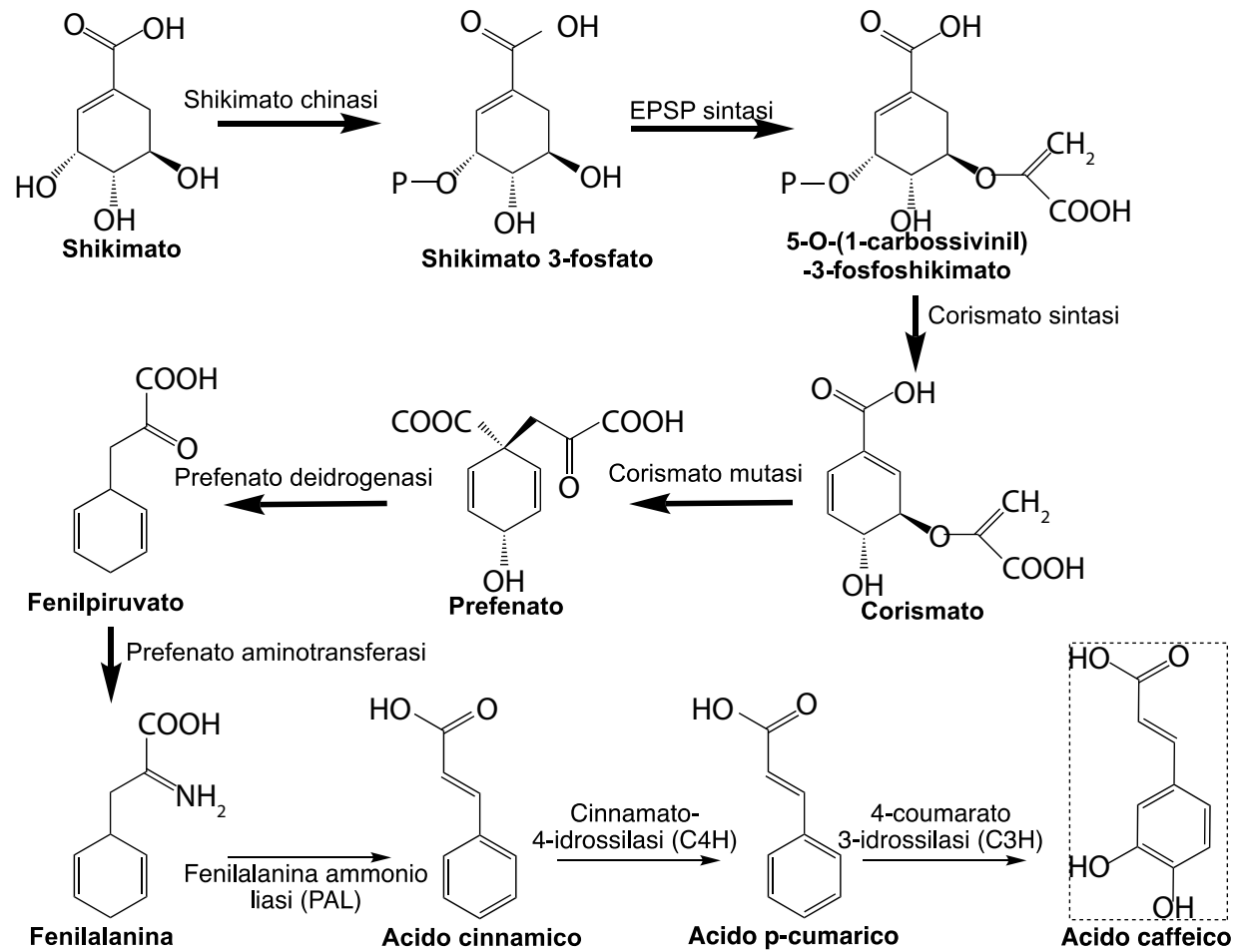


Figura 3

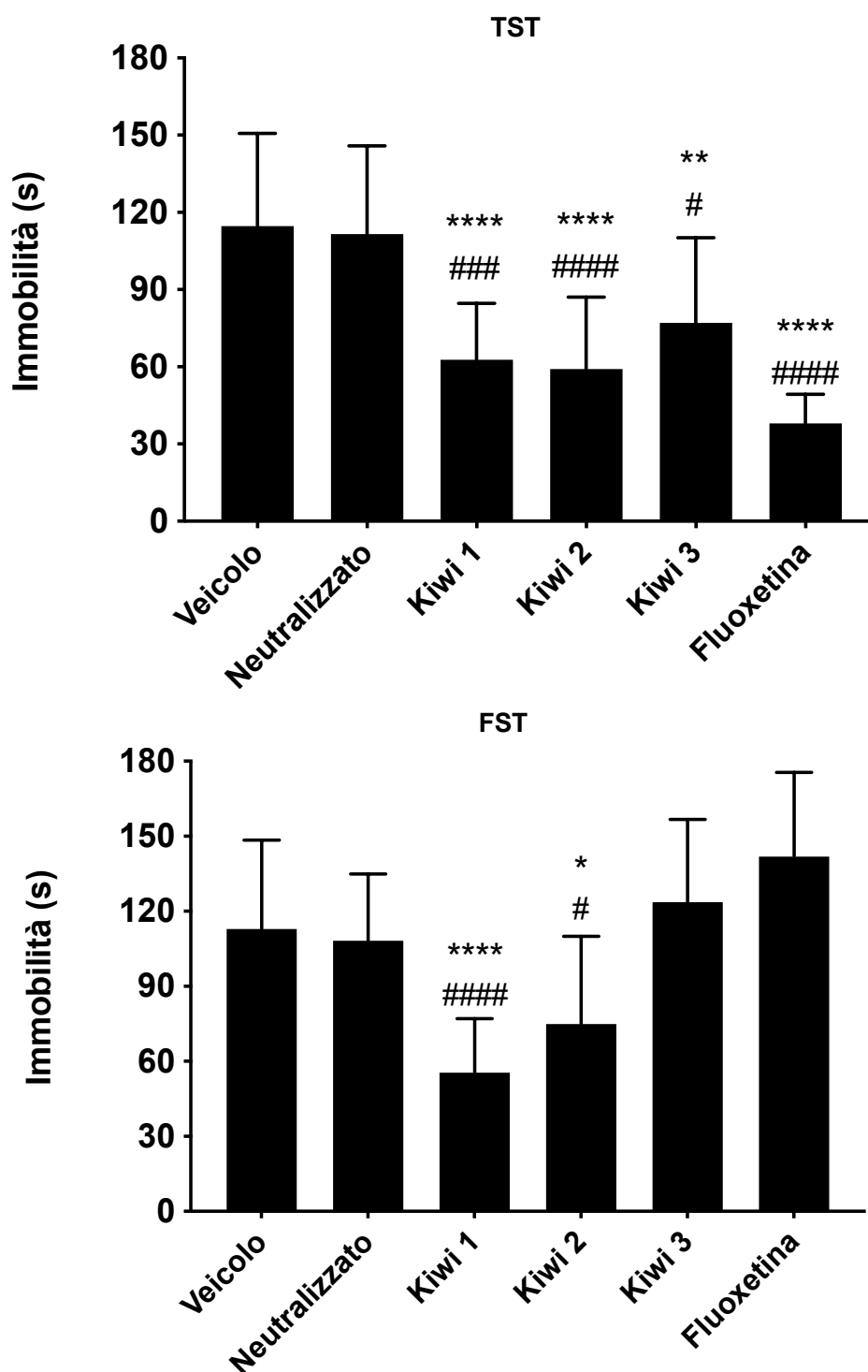


Figura 4

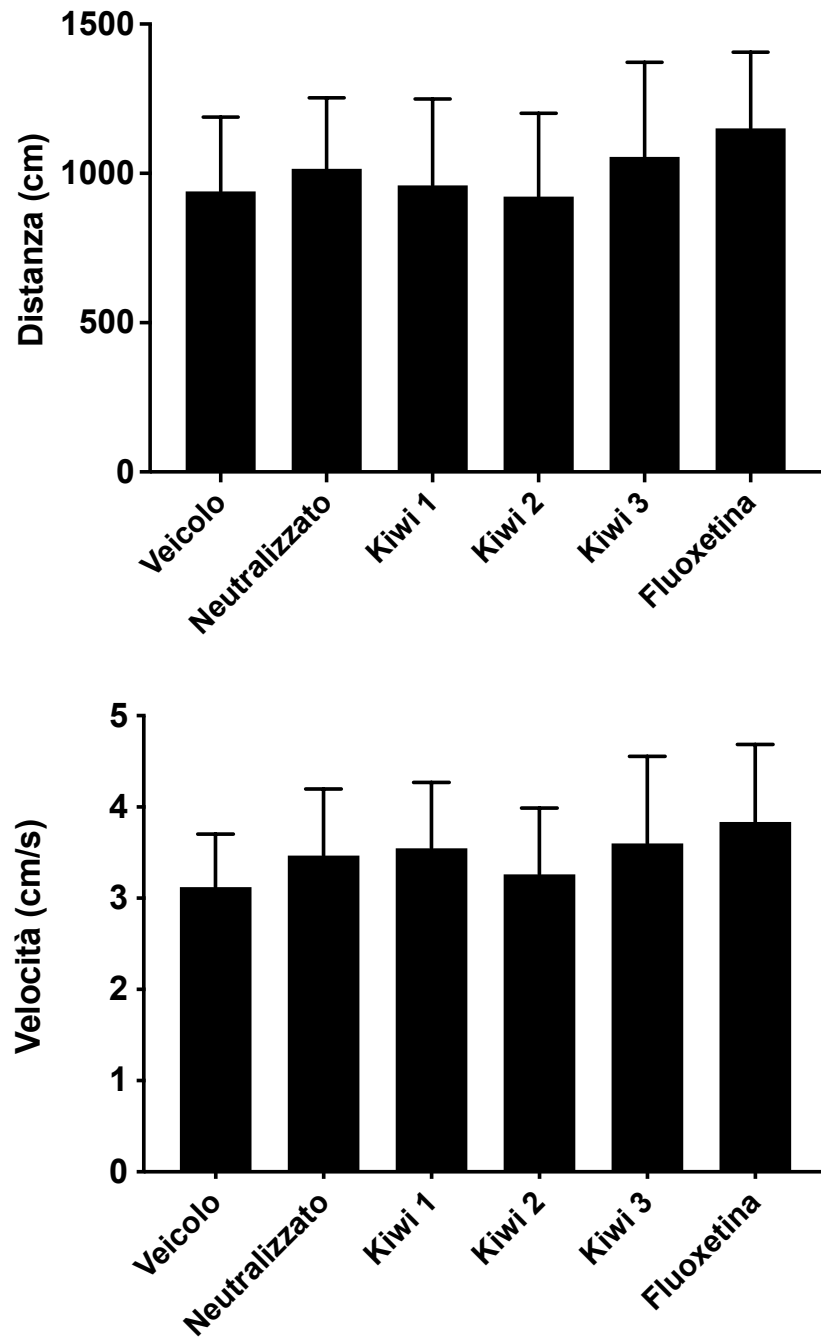


Figura 5

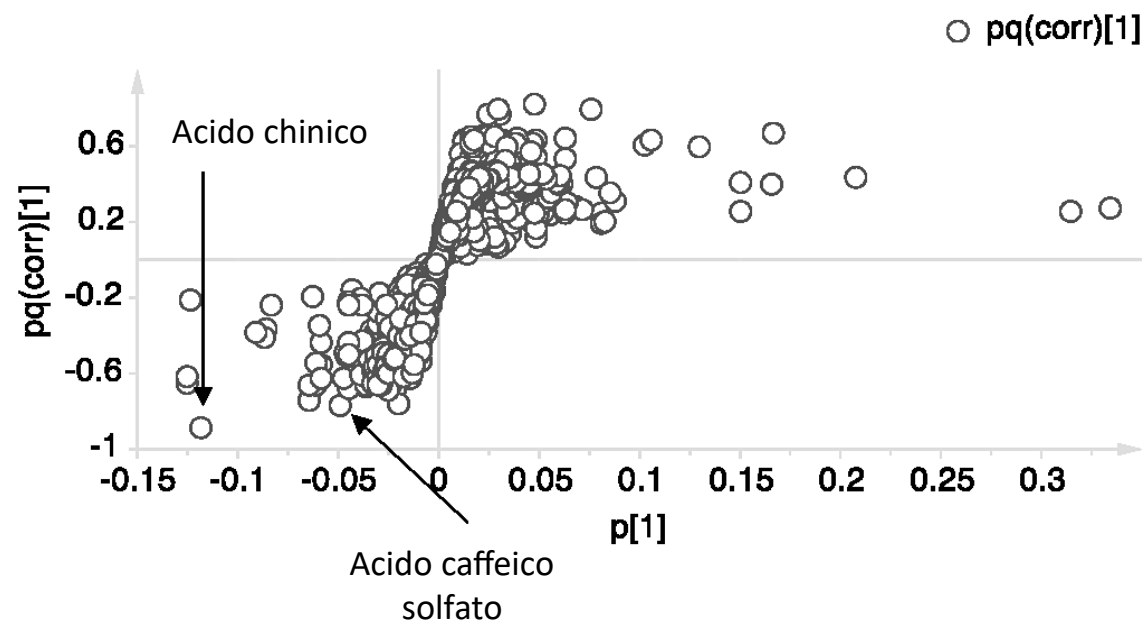
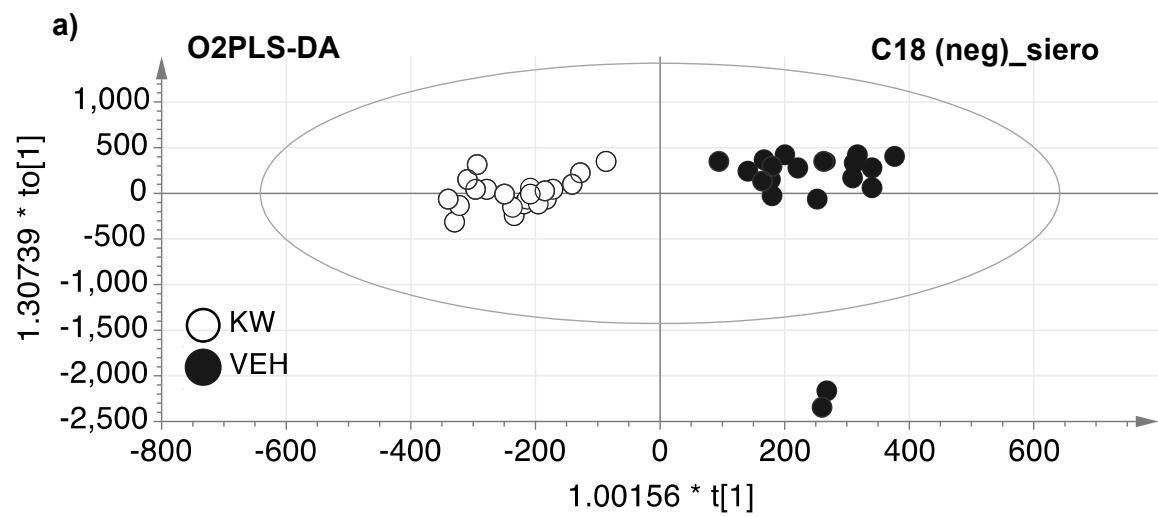


Figura 6

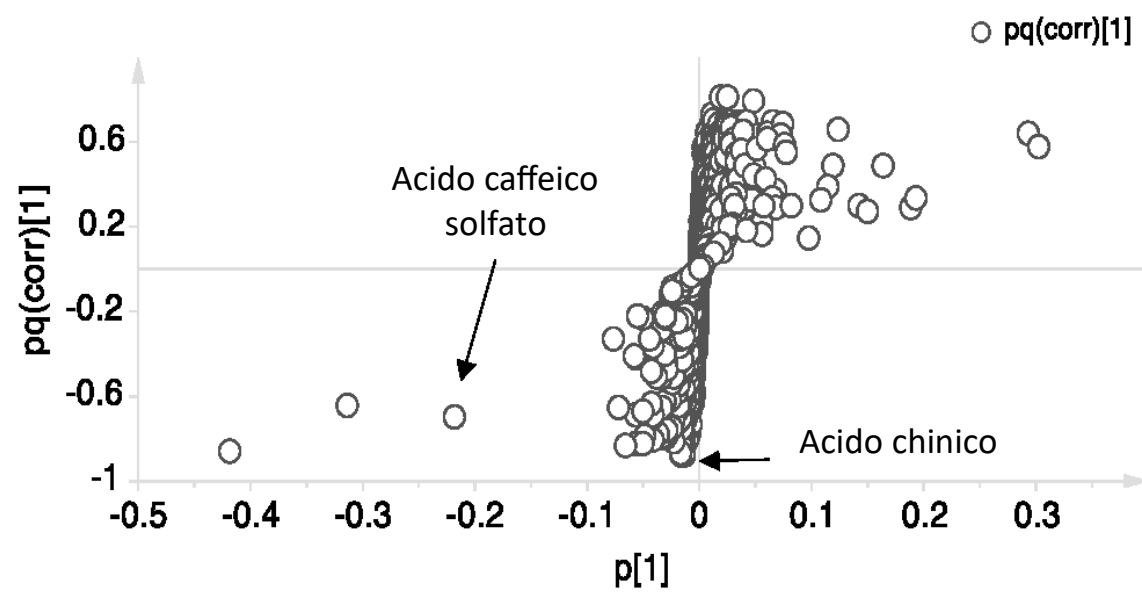
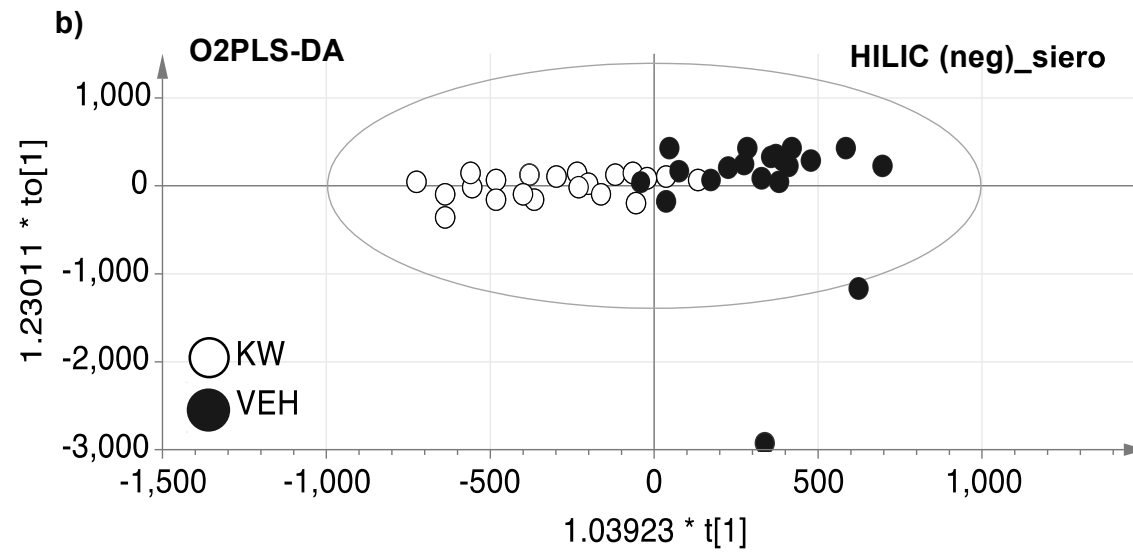


Figura 6

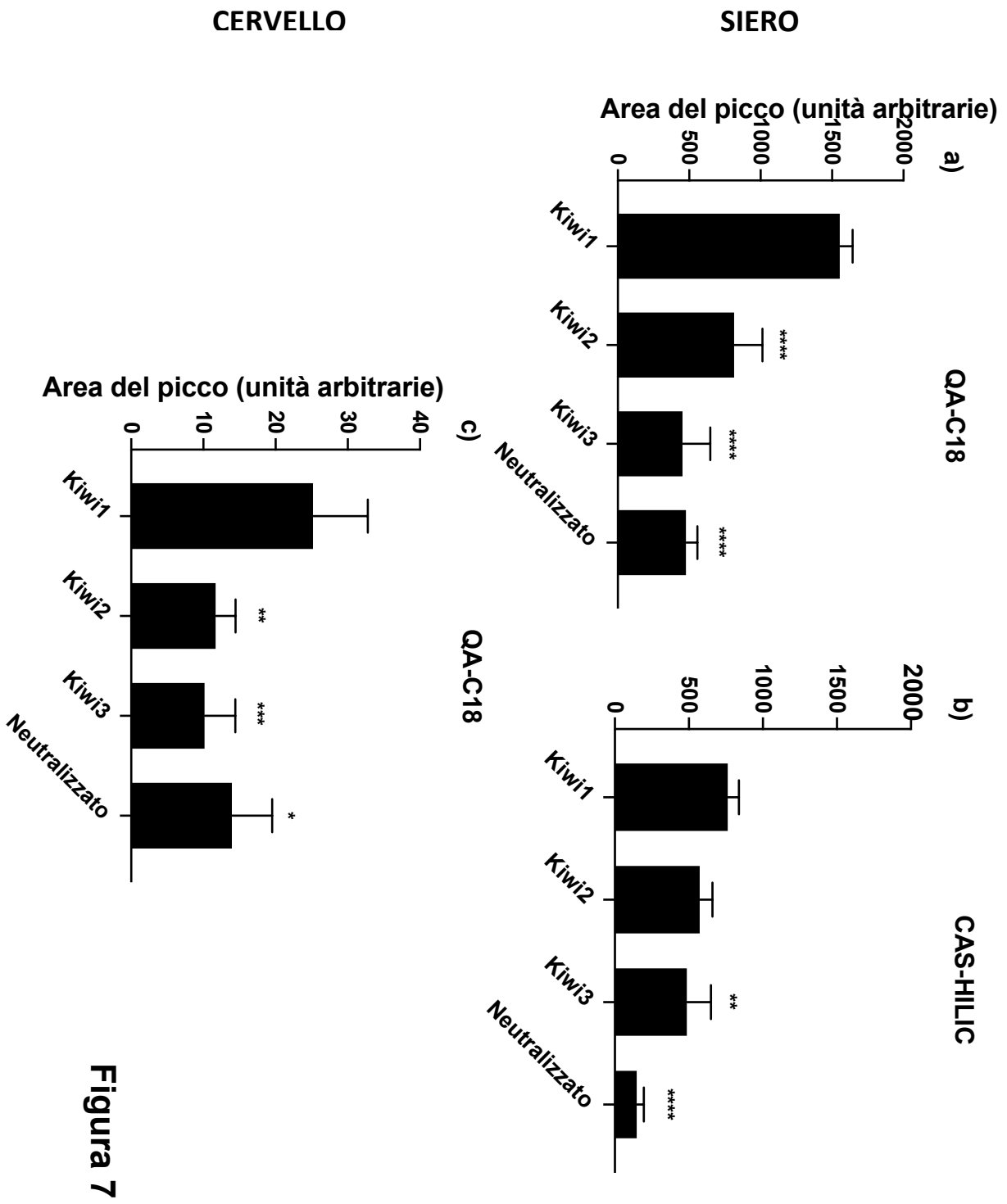
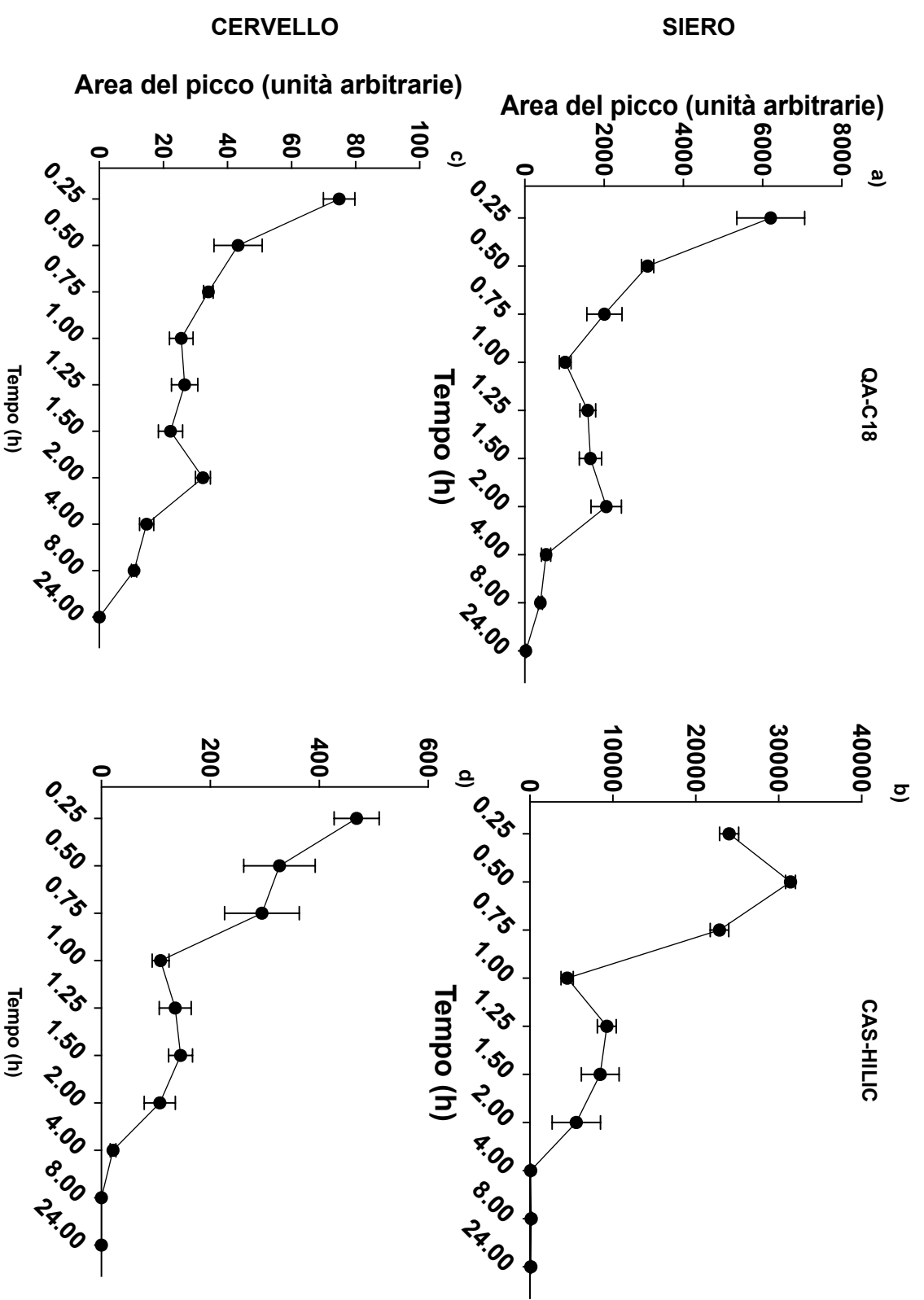


Figura 7

Figura 8



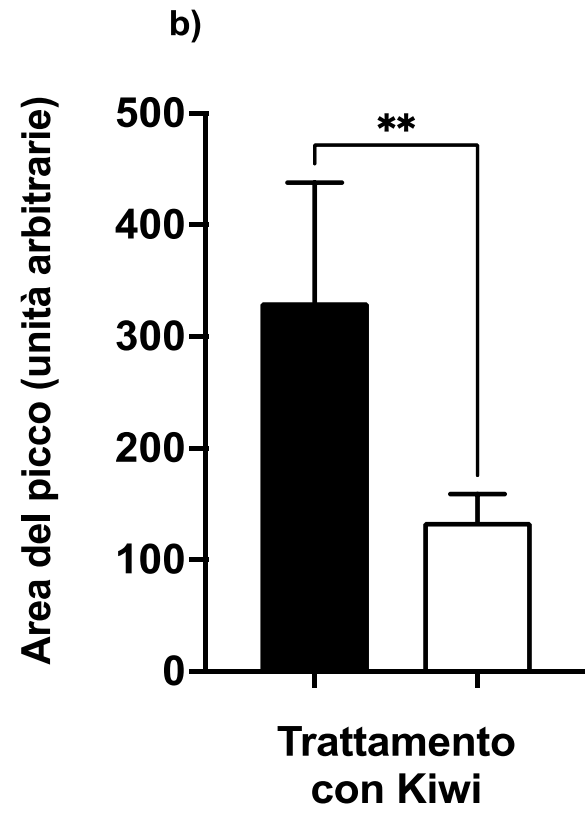
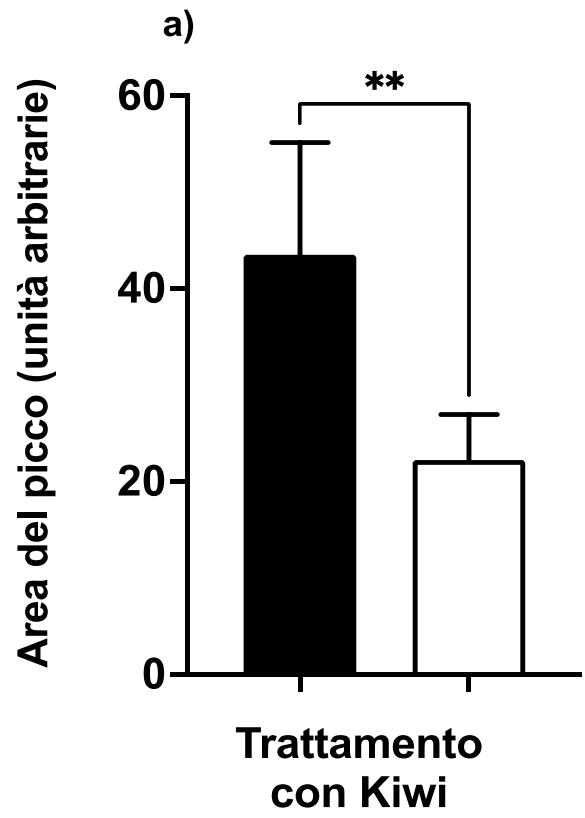


Figura 9

a)

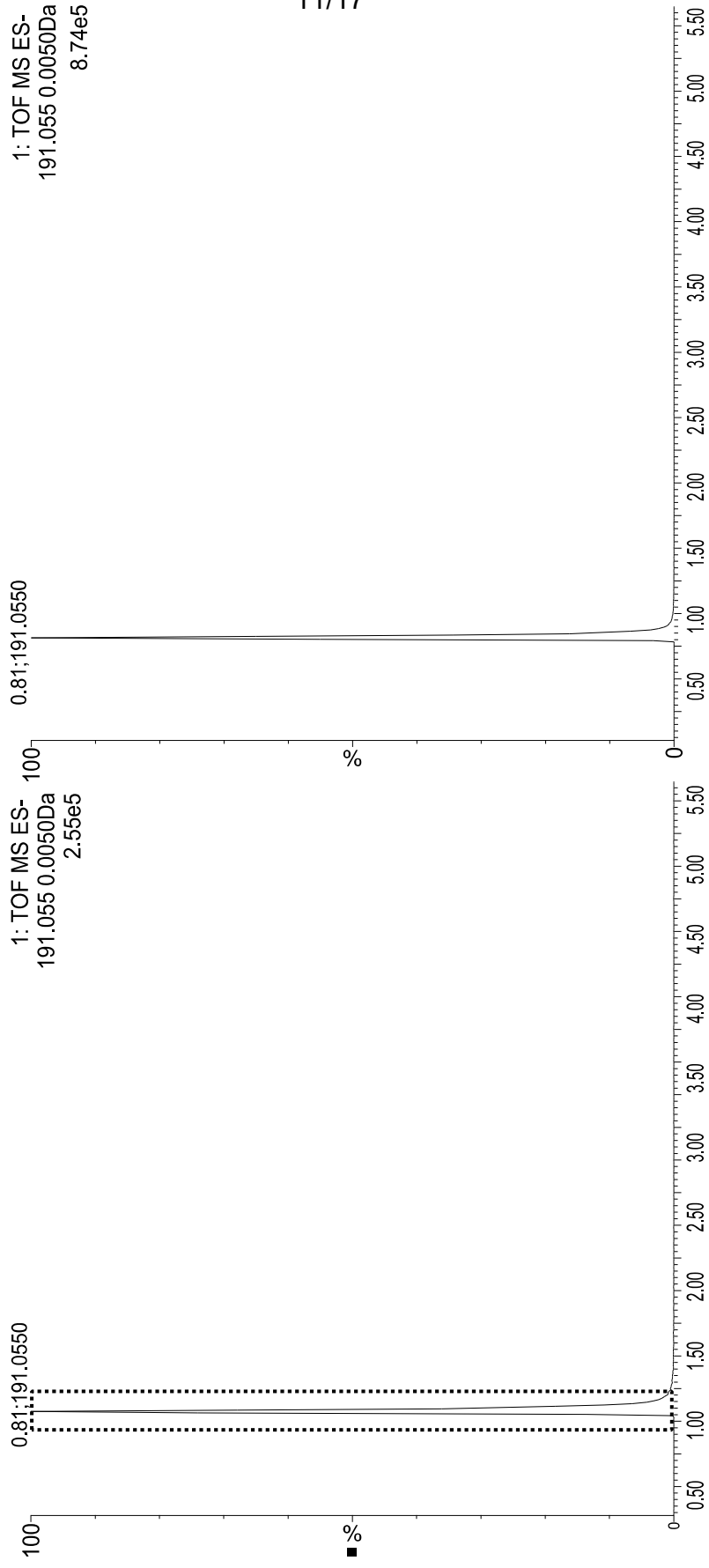


Figura 10

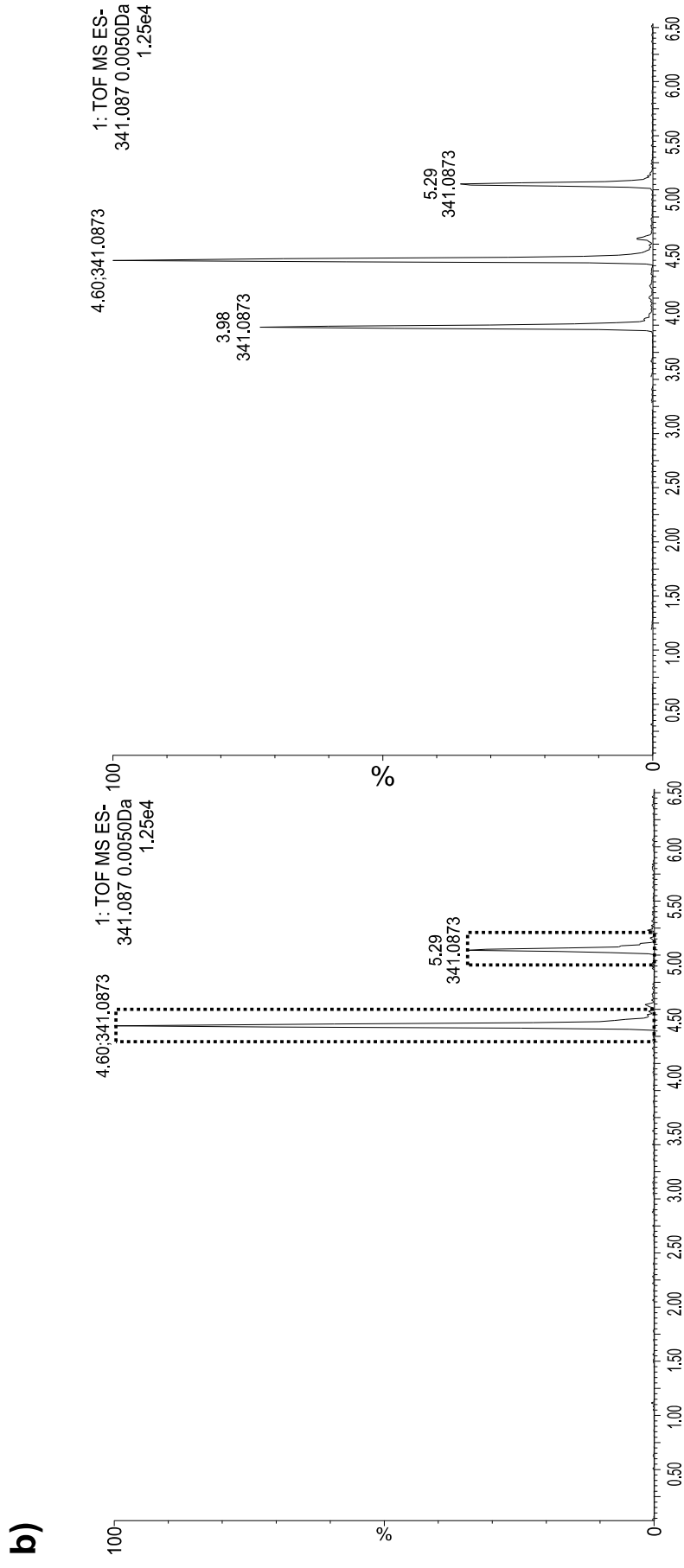


Figure 10

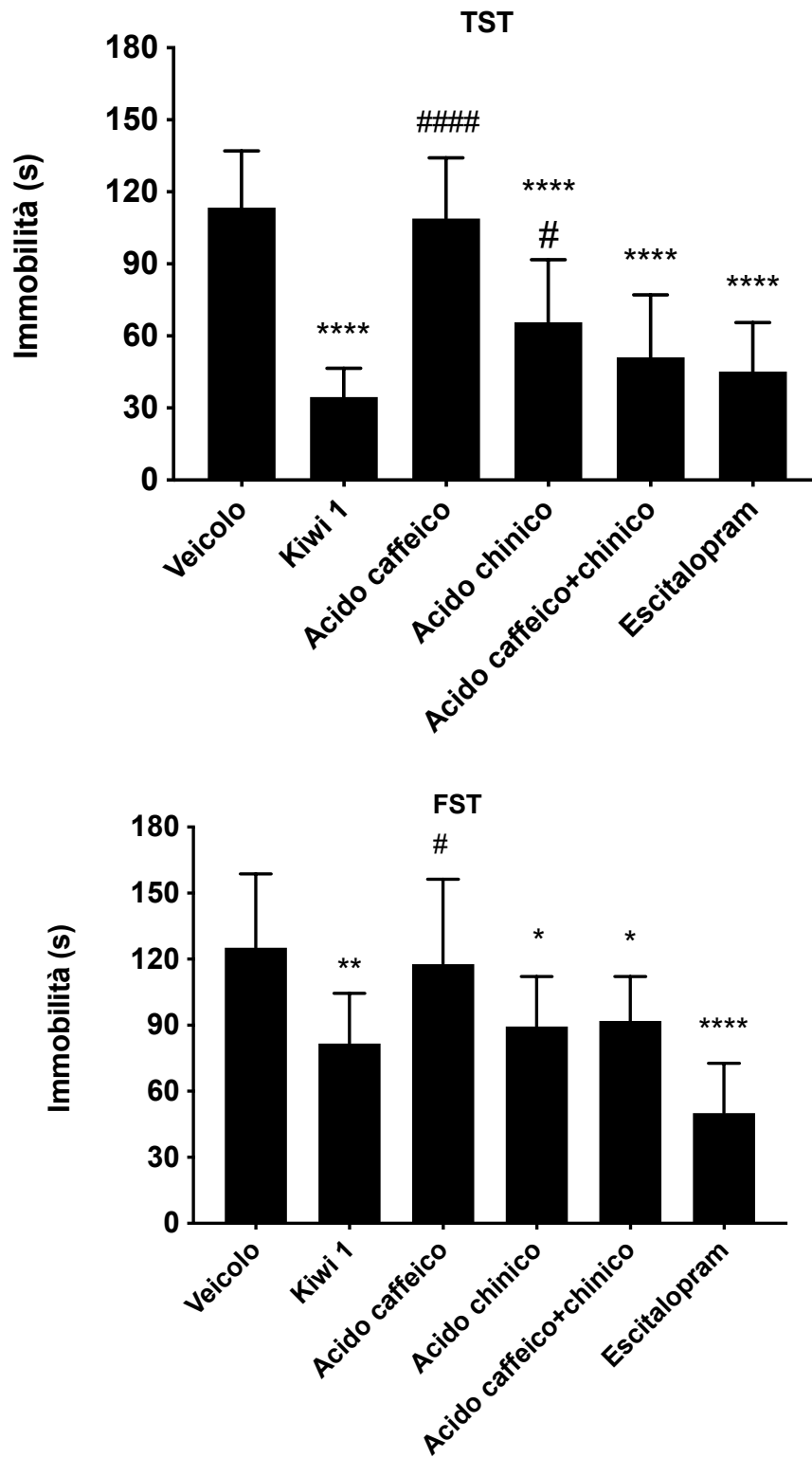


Figura 11

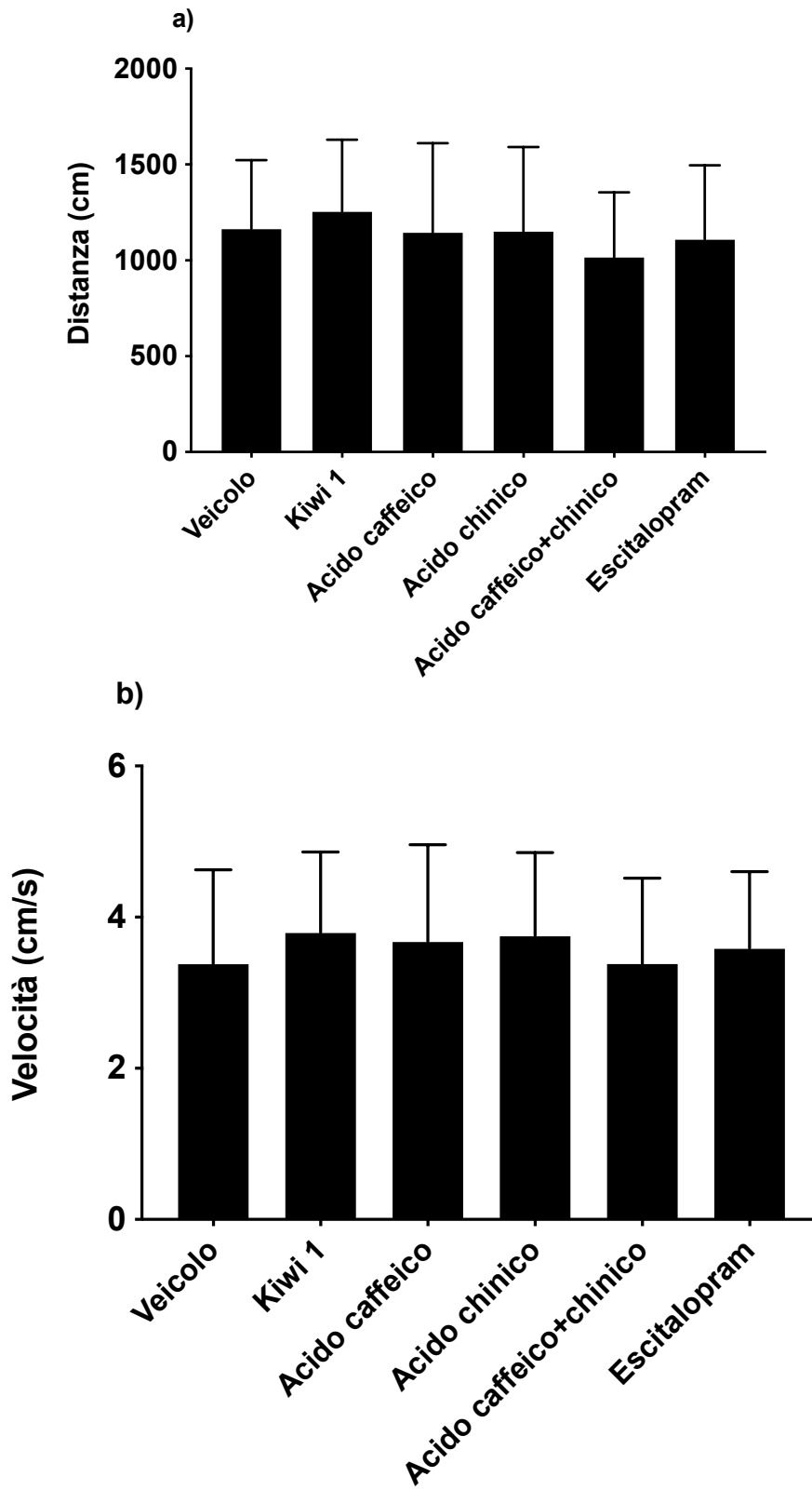
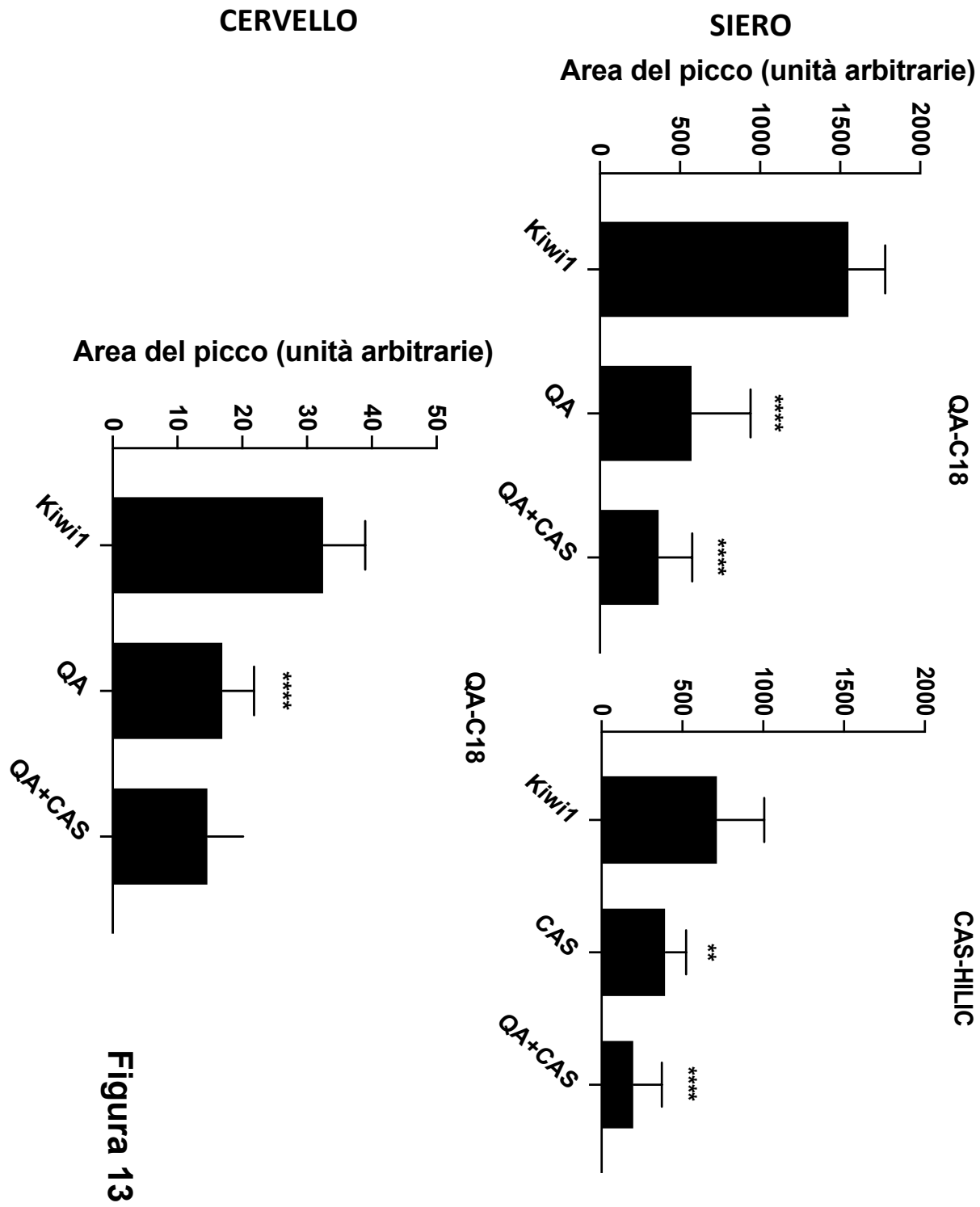
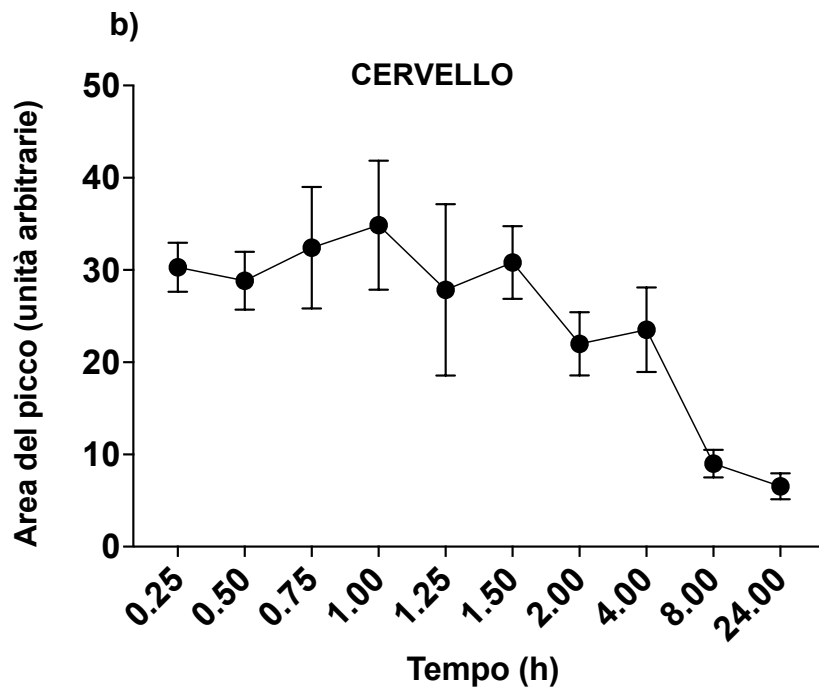
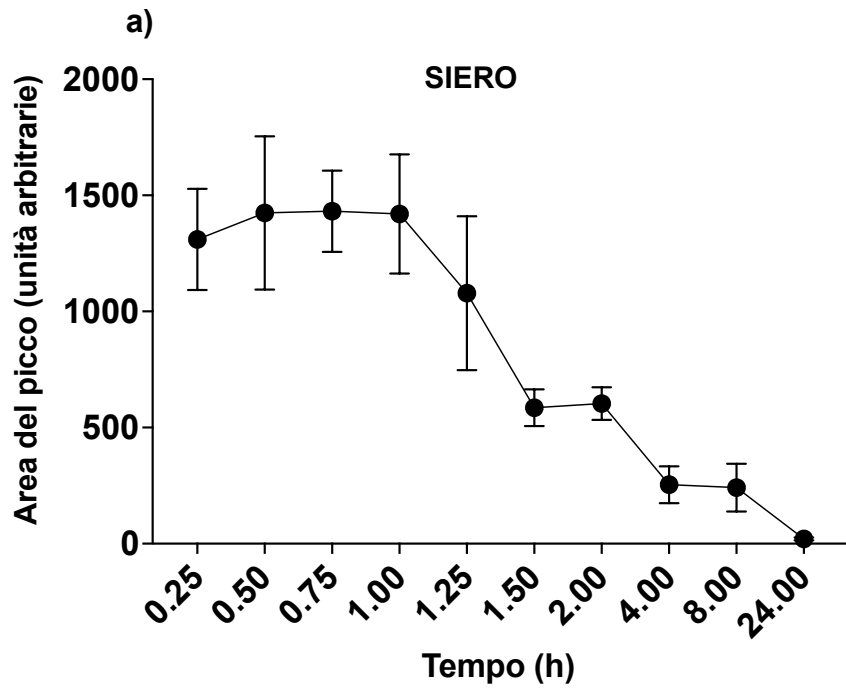


Figura 12





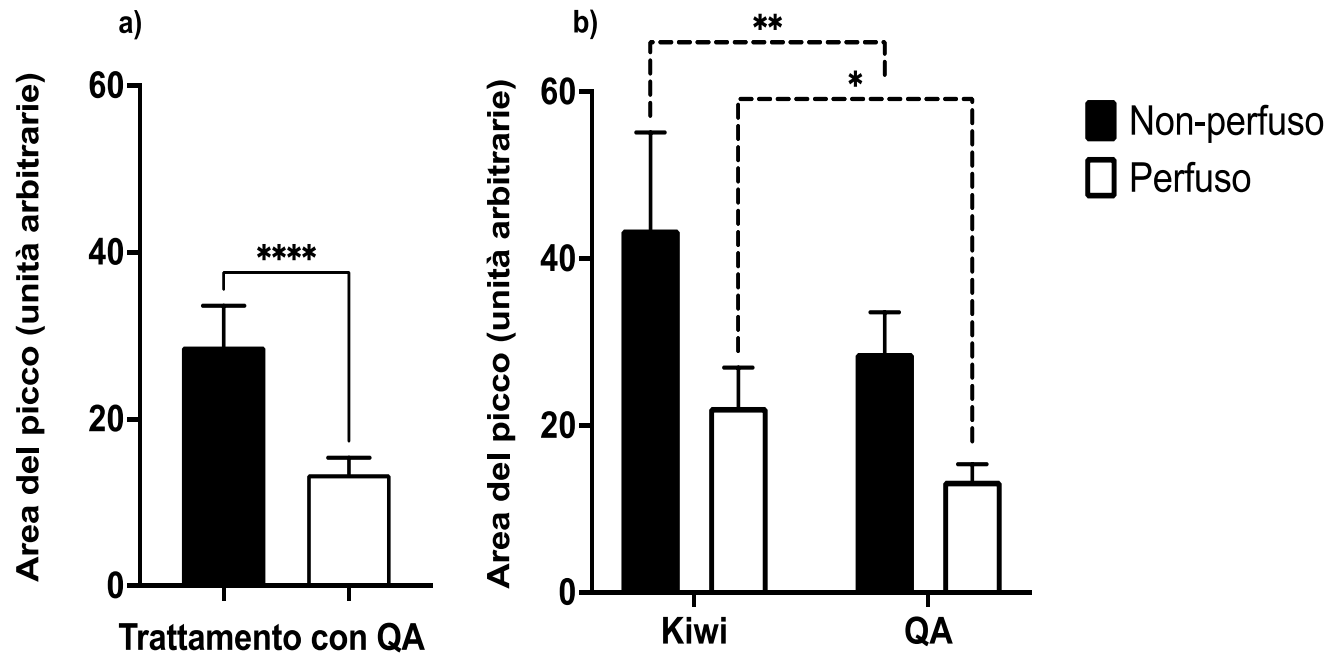


Figura 15