



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
Dottorato di Ricerca Territorio, Ambiente, Risorse e Salute

Indirizzo:

Medicina ambientale: Nutrizione e Inquinamento

Ciclo XX

2005-2007

TESI

**VALORIZZAZIONE DEI SOTTOPRODOTTI
DELL'INDUSTRIA ENOLOGICA: SOSTANZE
POLIFENOLICHE, LORO ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE E
INNOVAZIONE DI PRODOTTO (ALIMENTI FUNZIONALI)**

**SOTTOTITOLO1: UN APPROCCIO ALLA VALORIZZAZIONE DELLA
VINACCIA ESAUSTA**

**SOTTOTITOLO 2: STUDIO DELL'ATTIVITÀ ESTERASICA IN CEPPI
SELVAGGI DI SACCHAROMYCES CEREVISIAE E
SUA RELAZIONE CON I POLIFENOLI ESTERIFICATI**

**SOTTOTITOLO 3: TEST IN VITRO PER VALUTARE L'ATTIVITÀ
ANTIOSSIDANTE E ANTIMICROBICA DI UN
ESTRATTO VEGETALE**

**SOTTOTITOLO4: STUDIO DI FATTIBILITA' PER LA PRODUZIONE DI
PANE SURGELATO FUNZIONALE**

DIRETTORE DELLA SCUOLA DI DOTTORATO: *CH.MO PROF. VASCO BOATTO*

SUPERVISORE: *CH.MO PROF. PAOLO SPETTOLI*

DOTTORANDA: *ERANDA MANE*

ABSTRACT

In this thesis of Doctorate various scientific aspects will be examined in order to answer at the following perspective:

- to improve the extraction and the recovering of antioxidant compounds from vegetable by-products as the grape pomace;
- to study the esterase activity in *Saccharomyces cerevisiae* which come from the grape pomace and find out the relationship with the polyphenols shapes esterificated of the same vegetable material;
- to estimate *in vitro* the antioxidant and antimicrobial activity of a commercial extract with high level of catechine obtained from grape seeds;
- to study and evaluate the feasibility to produce frozen functional bread, adding phenolic antioxidant substances with antiradical action obtained from the grape seeds.

The vegetable by-products often are a cost for processing because they have to be disposed. The exploitation of these waste vegetables, as functional components added in the processed food, can represent now an important sector which could be improved.

We can consider the thesis of Doctorate divided mainly in two parts:

the first part of the thesis is related with the best choice of the vegetable by-product on which to estimate the presence of substances i. e. polyphenols which can have antioxidant effects. Besides, in the specific case of the grape pomace, if the normal microflora present on it with its enzymes, could modify the structure of polyphenols and increase their antioxidant properties.

The obtained results show that the grape pomace, as it is or exhausted, of the grape variety “Raboso Piave” contain appreciable amounts of polyphenols with high antioxidant activity; also the results show that the combination of acidified water and ethanol seems to be the best solution, in economical point of view, as solvent to be use for extraction.

The use of synthetic substrates such as esters of naphthol and fluorescein allowed us to characterize 9 yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from the grape pomace of grape variety “Prosecco” on the basis of their esterase activity. From the spectrophotometrical and eletrophoretical analysis of the cytoplasmic extracts appeared clear, with some exceptions, that doesn't exist important differences between the 9 yeast strains. These data represent a focal point for future investigations of the yeast esterase affinity with natural substrates, such as esterified anti-oxidants, and on the possible modification of their characteristics through *in vitro* and *in vivo* tests.

In the second part of the thesis we used commercial extracts derived from vegetable by-products of the oenological industry like the grape seeds. This because our aim was to deep investigate on

the antioxidant and antimicrobial potentialities of the phenolic molecules present on these substances, as well as the effects of their adding to a common food as the bread. Therefore, we employed extracts standardized in composition, microbiologically sure and of possible food use.

The two tests *in vitro*, set upped and evaluated exactly with a commercial extract, evidenced that they can be useful in order to understand the potentialities and the limits of studied active compounds. The simplicity of the execution of the test on slab allows testing at the same time several extracts, facilitating the phase of initial selection.

The *in vitro* assay with cultured bovine lymphocytes, even if it is needed other investigations, could represent the dynamic intracellular ratio between antioxidant and prooxidant activity and constitute an additional tool for the characterization of several antioxidants. In the case of the preparation of a functional food, the utilized methodology permitted us to obtain a frozen bread that contains phenolic substances, of which the antiradical activity remained unchanged also after 65 days of storage at -18°C .

At the end of this period the frozen bread after cooking shows: good and “appetizing” taste, lightly golden colour; optimal consistency.

The real feasibility of this process has been positively evaluated on pilot scale.

Because actually the people is looking for the interactivity food–health, there is a growing demand from consumers of food that has the normal nutritive function and that can help the body against the daily stress too. In this respect the firm, which collaborated with us to realize the functional bread, is evaluating the possibility to insert this product in its trade business.

The proposal of a new kind of functional frozen bread finds out the assumption in the general ascertainment that the application of the freezing at the bread is a technology in fast growing in the bakery sector. The success of this technology comes from the possibility that it offers to better programme the production timing of the firm.

In short, the production of new functional frozen bread can surely constitute a new marketing instrument in the market’s niche of functional products, widely diffuse at the level of GOD (Great Organized Distribution), and improve the nutritional characteristics of the diet also in fast-food restaurants. However, the healthy of the consumer has to be always more important than the economical interest and any healthy “asserting” has to be necessary supported by good scientific grounding.

RIASSUNTO

In questa tesi di Dottorato vengono prese in esame le seguenti prospettive:
-migliorare l'estrazione e il recupero di sostanze antiossidanti da scarti di origine vegetale come le vinacce;

- studiare l'attività esterasica di ceppi selvaggi di *Saccharomyces cerevisiae* presenti nella vinaccia e metterla in relazione con le forme polifenoliche esterificate dello stesso materiale vegetale;

- valutare in vitro l'attività antiossidante ed antimicrobica di un estratto commerciale ad elevato titolo in catechine, ottenuto dai vinaccioli;

- studiare la fattibilità di produrre pane surgelato funzionale aggiungendo sostanze antiossidanti di natura fenolica ad azione antiradicalica, ottenute dai vinaccioli.

La valorizzazione dei sottoprodotti di origine vegetale, che molto spesso rappresentano un onere per l'industria che deve smaltirli, come fonte di composti funzionali da impiegare negli alimenti ha certamente tutti i presupposti per essere un settore promettente.

Possiamo considerare la tesi di Dottorato suddivisa principalmente in due parti:

la prima parte ha riguardato la scelta del sottoprodotto vegetale su cui valutare la presenza o meno di sostanze dotate di proprietà antiossidanti quali i polifenoli e nel caso specifico delle vinacce, se la normale flora microbica presente nelle vinacce stesse potesse con i propri enzimi variarne la struttura con un possibile aumento delle caratteristiche antiossidanti.

Sulla base dei risultati ottenuti possiamo affermare che le vinacce sia vergini che "esauste" di uva Raboso Piave contengono apprezzabili quantità di polifenoli ad elevata attività antiossidante, mentre tra i solventi utilizzati per l'estrazione, la combinazione acqua acidificata ed etanolo sembra rappresentare una buona soluzione anche in termini economici.

L'utilizzo di substrati sintetici quali gli esteri del naftolo e della fluoresceina ci hanno permesso di caratterizzare 9 ceppi di lievito *Saccharomyces cerevisiae* isolati dalle vinacce di Prosecco sulla base della loro attività esterasica. Dall'analisi spettrofotometrica ed elettroforetica degli estratti citoplasmatici si evince che, con alcune eccezioni, non esistono differenze rilevanti tra i 9 ceppi. I risultati ottenuti rappresentano certamente un punto di partenza per ulteriori approfondimenti sull'affinità delle esterasi di lievito verso substrati naturali quali gli antiossidanti esterificati e sulla possibile modificazione delle loro proprietà mediante test *in vitro* e *in vivo*.

Nella seconda parte abbiamo utilizzato estratti commerciali derivati da sottoprodotti dell'industria enologica cioè i vinaccioli, poiché nostra intenzione era quella di approfondire le potenzialità antiossidanti ed antimicrobiche delle molecole fenoliche in essi presenti, nonché la loro successiva aggiunta in un prodotto di largo consumo come il pane. Quindi abbiamo usato

estratti standardizzati nella composizione, microbiologicamente sicuri e di possibile uso alimentare.

Due test *in vitro*, messi a punto e valutati appunto con un estratto commerciale, hanno evidenziato che essi possono essere utili per capire le potenzialità ed i limiti dei principi attivi studiati. A questo riguardo, la semplicità di esecuzione del saggio su piastra permette di testare contemporaneamente numerosi estratti, facilitando la fase di selezione iniziale. Il test *in vitro* con colture di linfociti bovini, poi, anche se necessita di ulteriori approfondimenti, potrebbe ben rappresentare l'equilibrio intracellulare dinamico tra attività antiossidante e proossidante e costituire un ulteriore strumento per la caratterizzazione di antiossidanti diversi.

Nel caso della preparazione di un alimento funzionale, la metodica utilizzata ci ha permesso di ottenere un pane surgelato contenente composti fenolici, la cui attività antiradicalica rimane inalterata anche dopo 65 giorni di conservazione a -18°C.

Alla fine di questo periodo di conservazione il pane portato in condizioni di consumo presenta:

- gusto - buono
- sapore - "appetitoso "
- colore-leggermente dorato
- consistenza - ottima

La fattibilità del processo è stata, poi, positivamente valutata su scala pilota.

Poiché ultimamente è molto sentita dalla popolazione l'interazione alimento-salute e vi è una continua ricerca da parte del consumatore di cibo che, oltre alla normale funzione nutritiva ed edonistica, aiuti l'organismo a difendersi dagli stress a cui è quotidianamente sottoposto, la Ditta con la quale abbiamo collaborato a realizzare il pane funzionale surgelato sta valutando la possibilità di inserire il prodotto nel proprio circuito commerciale.

La proposta di una nuova tipologia di pane funzionale surgelato, infatti, trova i suoi presupposti nella generale constatazione che l'applicazione della surgelazione del prodotto finito è una tecnologia in rapida crescita nel settore della panificazione. Il successo è sicuramente dovuto alla possibilità di programmare più facilmente i ritmi di produzione aziendali, altrimenti molto onerosi.

In conclusione la produzione di un nuovo pane funzionale surgelato può sicuramente costituire uno strumento di marketing nella nicchia di mercato dei prodotti funzionali, largamente diffusi a livello di GDO (Grande Distribuzione Organizzata), e migliorare le caratteristiche nutrizionali della dieta anche nei modelli ristorativi veloci. Comunque la sicurezza del consumatore dovrà essere superiore a qualsiasi interesse economico ed ogni "rivendicazione" salutistica, più o meno palese, dovrà necessariamente essere supportata da evidenti basi scientifiche.

1. INDICE

| | |
|---|----|
| ABSTRACT | 2 |
| RIASSUNTO | 4 |
| 1. INDICE | 6 |
| 1.1 INDICE DELLE FIGURE | 7 |
| 1.2 INDICE DELLE TABELLE | 7 |
| 2. INTRODUZIONE | 8 |
| 2.1 Gli antiossidanti | 9 |
| 2.2 Il danno ossidativo | 11 |
| 2.3 Le sostanze polifenoliche | 14 |
| 2.4 Gli antiossidanti presenti negli alimenti e il loro effetto sulla salute | 18 |
| 2.5 Il metabolismo dei flavonoidi: la chiave per capirne gli effetti sulla salute | 20 |
| 2.6 I flavonoidi e i fattori di rischio delle malattie cardiovascolari | 23 |
| 2.7 I polifenoli e le malattie polmonari | 25 |
| 2.8 L'alimento e l'espressione del gene | 27 |
| 2.9 I nutrigenetici e l'intervento nutrizionale | 32 |
| 2.10 Definizione di Alimento Funzionale | 32 |
| 3. SCOPO DELLA TESI | 35 |
| 4. MATERIALI E METODI | 37 |
| Sottotitolo 1 e 4 | 37 |
| Preparazione dell'estratto | 37 |
| Determinazione dei polifenoli totali | 38 |
| Determinazione dell'attività antiradicalica con DPPH | 38 |
| Determinazione della componente fenolica mediante HPLC | 38 |
| Sottotitolo 2 | 39 |
| Ceppi di lievito | 39 |
| Conservazione dei ceppi di lievito | 39 |
| Preparazione delle cellule | 39 |
| Preparazione degli sferoplasti | 39 |
| Preparazione delle frazioni cellulari | 40 |
| Attività esterasica | 41 |
| Preparazione del substrato | 41 |
| Saggio spettrofotometrico | 41 |
| Elettroforesi in condizioni native (N-PAGE) | 41 |
| Zimogrammi dell'attività esterasica per mezzo di fluoresceina diacetato | 41 |
| 5 SOTTOTITOLO 1: UN APPROCCIO ALLA VALORIZZAZIONE DELLA VINACCIA ESAUSTA | 42 |
| Risultati e discussione | 45 |
| 6 SOTTOTITOLO 2: STUDIO DELL'ATTIVITÀ ESTERASICA IN CEPPI SELVAGGI DI <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> E SUA RELAZIONE CON I POLIFENOLI ESTERIFICATI | 47 |
| 6.1 Il citoplasma della cellula di <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 50 |
| 6.2 Risultati e Discussione | 51 |
| 7 SOTTOTITOLO 3: TEST IN VITRO PER VALUTARE L'ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE E ANTIMICROBICA DI UN ESTRATTO VEGETALE | 58 |
| 7.1 Valutazione dell'attività antiossidante | 58 |
| 7.2 Valutazione dell'attività antimicrobica | 59 |
| 7.3 Risultati e discussione | 59 |
| 8 SOTTOTITOLO 4: STUDIO DI FATTIBILITÀ PER LA PRODUZIONE DI PANE SURGELATO FUNZIONALE | 62 |
| 8.1 Impostazione della prima prova | 66 |
| 8.2 Risultati della prima prova | 67 |
| 8.3 Impostazione della seconda prova | 70 |
| 8.4 Risultati della seconda prova | 72 |
| 8.5 Impostazione della terza prova | 75 |
| 8.6 Risultati della terza prova | 76 |
| 9 Conclusioni | 79 |
| 10 Pubblicazioni scientifiche: | 81 |
| 11 Bibliografia | 82 |
| Acknowledgements | 93 |

1.1 INDICE DELLE FIGURE

| | |
|---|----|
| Figura 1 : Il metabolismo secondario che porta alla sintesi degli antiossidanti prende avvio dal metabolismo primario (Soldatini, 1996)..... | 11 |
| Figura 2: Struttura dei flavanoidi | 17 |
| Figura 3: Struttura dei quattro flavonoidi che hanno suscitato maggiore interesse per la ricerca | 20 |
| Figura 4: Possibili vie di segnalazione protette dai polifenoli e dai flavonoidi..... | 27 |
| Figura 5: Estrattore pneumatico a freddo solido-liquido (NM LAB/MA 500 CC Depurex, Italia) | 37 |
| Figura 6 Figura 6: vinacce di uva Raboso Piave | 43 |
| Figura 7: Attività antiradicalica (%) della vinaccia di uva Raboso Piave prima e dopo distillazione..... | 45 |
| Figura 8: Polifenoli totali (mg/l) nella vinaccia di uva Raboso Piave prima e dopo distillazione..... | 46 |
| Figura 9: Quantità di proteina presente nel citoplasma dei ceppi di <i>Saccharomyces cerevisiae</i> isolati da vinacce di prosecco, espressa in µg/ml di estratto liofilizzato (valore medio della proteina: 365µg/mg estratto liofilizzato; C.V.: 15%)..... | 53 |
| Figura 10: Attività esterasica rilevata nel citoplasma di ceppi di <i>Saccharomyces cerevisiae</i> isolati da vinacce di Prosecco. L'attività esterasica è stata misurata in presenza di esteri del naftolo esterificato con acidi grassi a diversa lunghezza della catena di atomi di carbonio: | 55 |
| Figura 11: Zimogramma dell'attività esterasica rilevata nel citoplasma di ceppi di <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ed evidenziato in presenza di fluoresceina di acetato come substrato. La separazione degli estratti proteici (20µg di proteina caricati in ogni pozzetto) è avvenuta in condizioni native (T=8,5%)...... | 57 |
| Figura 12: Valutazione della "SA" intracellulare mediante DCF-DA a diverse concentrazioni di antiossidante. (Lettere diverse indicano medie statisticamente differenti; Tukey t-test; P < 0.05)..... | 60 |
| Figura 13: Attività antimicrobica dell'estratto vegetale, espressa come diametro dell'alone di inibizione della germinazione di spore di <i>Bacillus stearothermophilus var. calidolactis</i> C 953..... | 61 |
| Figura 14: Variazione percentuale dell'attività antiradicalica in funzione del tempo di conservazione..... | 68 |
| Figura 15: Variazione in funzione del tempo di conservazione della concentrazione di polifenoli totali valutati con la metodica del Folin-Ciocalteu..... | 68 |
| Figura 16: Separazione e caratterizzazione dei polifenoli con HPLC..... | 69 |
| Figura 17: Variazione percentuale dell'attività antiradicalica in funzione del tempo di conservazione..... | 73 |
| Figura 18: Variazione in funzione del tempo di conservazione della concentrazione di polifenoli totali valutati con la metodica del Folin-Ciocalteu..... | 73 |
| Figura 19: Separazione e caratterizzazione dei polifenoli durante 65 giorni di conservazione..... | 74 |
| Figura 20: Separazione e caratterizzazione dei polifenoli durante 65 giorni di conservazione..... | 74 |
| Figura 21: Variazione in percentuale dell'attività antiradicalica in funzione del tempo di conservazione..... | 77 |
| Figura 22: Variazione in funzione del tempo di conservazione della concentrazione di polifenoli totali valutati con la metodica del Folin-Ciocalteu..... | 77 |
| Figura 23: Separazione e caratterizzazione dei polifenoli durante 65 giorni di conservazione..... | 78 |

1.2 INDICE DELLE TABELLE

| | |
|---|----|
| Tabella 1: Attività antiossidante relativa a diverse fonti vegetali..... | 15 |
| Tabella 2: Classi di flavonoidi e loro fonti..... | 18 |
| Tabella 3: Potenziali effetti protettivi di antiossidanti contenuti nella dieta | 29 |
| Tabella 4: Attività esterasica media presente nei citoplasmi dei 9 ceppi di <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in funzione degli esteri del naftolo..... | 56 |
| Tabella 5: Certificato di analisi del Leucoselect | 65 |
| Tabella 6: Determinazione dell'attività antiradicalica dopo 45 giorni di conservazione | 67 |
| Tabella 7: Determinazione dell'attività antiradicalica dopo 65 giorni di conservazione | 72 |
| Tabella 8: Determinazione dell'attività antiradicalica dopo 51 giorni di conservazione..... | 76 |

2. INTRODUZIONE

Le modificazioni dello stile di vita nell'ambito delle società industrializzate hanno messo in evidenza nuove e pressanti esigenze. L'alimento non è infatti più visto solo come mezzo di sostentamento o come immagine edonistica, e d'altra parte l'alimentazione non è solo origine di ansie e paure, ma la base su cui costruire la salute. Se l'eccesso o l'errata somministrazione di cibi può essere fonte di patologie e malesseri, così un'accurata scelta degli stessi può assumere connotazioni preventive ed anche curative, come evidenziato nei cibi funzionali. Con l'aumentato interesse per questi alimenti salutistici, cresce anche il riconoscimento scientifico per molecole di origine vegetale (per esempio composti polifenolici), che sembrano avere un ruolo più spiccato nella prevenzione di patologie come arteriosclerosi, artrite, cataratta e diabete, in parte legate allo stile di vita. Per questo motivo molti prodotti vegetali, ricchi di sostanze ad azione antiossidante, stanno ricevendo attenzione da parte di tecnologi, nutrizionisti, medici e ricercatori.

L'incremento, poi, nella domanda di prodotti vegetali trasformati ha determinato anche un consistente aumento degli scarti prodotti durante la lavorazione e di conseguenza un impulso alla ricerca di possibili soluzioni per un loro recupero. Questa ipotesi, se concretizzata, allungherebbe il ciclo di vita del prodotto riducendo il fabbisogno di risorse naturali ed i problemi di inquinamento ambientale. Nei sottoprodotti sono infatti presenti gli stessi composti, sopra nominati, di valore nutrizionale e funzionale che vengono generalmente persi, ma potrebbero costituire dei promettenti “donatori” di fibra, carotenoidi, tocoferoli e polifenoli. Tra i composti bioattivi i polifenoli, in particolare catechine ed antociani, rivestono un ruolo importante poiché, a differenza della maggior parte dei carotenoidi e delle vitamine, non sono sintetizzate chimicamente e quindi devono essere estratte dalle fonti vegetali. Infatti catechine e antociani, prodotti dal metabolismo secondario delle piante, possiedono un ampio spettro di azione che li rende in diverse occasioni agenti antinfiammatori, antiallergenici, antimicrobici, vasodilatatori, antitrombotici, cardioprotettivi e antiossidanti. Le catechine sono flavanoli presenti in molti alimenti quali vino, tè, cioccolato, frutta ed ortaggi. Il loro impiego anche come integratori nell'alimentazione umana ed animale è in rapida crescita. In particolare la loro aggiunta ai mangimi si basa sul presupposto che gli animali fungono da vettori dei composti funzionali che trasferiscono ai tessuti e da questi a carne, uova e latte.

Dal punto di vista pratico, si può parlare di impiego su larga scala per gli antiossidanti estratti dai vinaccioli e dalle vinacce, sottoprodotti dell'industria enologica (Bonilla F. et al., 1999; Arvanitoyannis I.A. et al., 2005; Pinolo M. et al., 2005), essi costituiscono una fonte a basso costo di antiossidanti e per questo motivo sono venduti all'industria degli integratori in rapida espansione. Gli estratti ottenuti dalla buccia dell'uva vengono commercializzati anche per il loro

contenuto in procianidine e antocianine. Queste ultime principalmente sotto forma di 3-0-glicosidi e 3,5-0-glicosidi sono responsabili della colorazione arancio, rosa, rossa, violetta e blu dei petali dei fiori e dei frutti di un gran numero di piante.

L'interesse per gli antociani sta aumentando in modo significativo per innumerevoli motivi tra cui oltre al loro colore brillante, la solubilità in acqua che ne rende semplice l'impiego in sistemi acquosi e le proprietà salutistiche, che riguardano l'acutezza visiva, la cura della fragilità capillare, il controllo della permeabilità vascolare e del diabete, le proprietà antinfiammatorie, la protezione dalle neoplasie oltre ad altri effetti dovuti alla loro azione su enzimi e processi metabolici. Tutti questi attributi rendono gli antociani dei candidati ideali per sostituire i coloranti sintetici la cui sicurezza è stata più volte messa in discussione, provocando una sensibile contrazione nel numero di coloranti permessi soprattutto dei pigmenti rossi.

L'interesse per i coloranti naturali è sicuramente aumentato non solo in seguito alla pressione legislativa, ma anche per la maggior consapevolezza dei consumatori che rifiutano la presenza degli additivi sintetici negli alimenti. Più in generale il "green consumerism" sta sempre più spingendo soluzioni che adottino materie prime naturali oltre che nel settore alimentare anche in quello tessile, nei prodotti per la pulizia ecc. (Bechtold T. et al., 2006) e l'Unione Europea supporta schemi di eco-labeling volontari. Alla luce di queste considerazioni, l'Unione Europea (EU 1994) ha permesso l'impiego delle antocianine come coloranti alimentari in bevande, marmellate d'agrumi, caramelle, gelati e prodotti farmaceutici.

2.1 Gli antiossidanti

Il corpo umano, per affrontare le specie reattive all'ossigeno (ROS), è provvisto di un sistema di difesa che è costituito da molecole, presenti in basse concentrazioni, dette antiossidanti (Weisburger, 2000), che sono in grado di neutralizzare i radicali liberi, donando loro un elettrone e fornendo loro stessi radicali liberi stabili che bloccano la perossidazione lipidica.

Nei cibi, gli antiossidanti hanno fondamentalmente quest'ultima funzione.

Nei sistemi biologici, la definizione di antiossidante è stata estesa a qualsiasi sostanza che, presente a basse concentrazioni rispetto a quelle di un substrato ossidabile, ritarda significativamente o previene l'ossidazione di quel substrato (Frankel, Meyer, 2000).

I principali composti antiossidanti dell'organismo sono suddivisibili in 3 gruppi: antiossidanti endogeni, antiossidanti dietetici e proteine che legano metalli (Porrini, Testolin, 1997).

Gli antiossidanti endogeni, che rappresentano la prima linea di difesa, sono quegli enzimi endogeni che riducono la genesi di molte specie radicaliche e sono le superossido dismutasi (SOD), la glutatione perossidasi e la catalasi. La SOD catalizza la dismutazione del radicale

superossido ad acqua ossigenata ed ossigeno, la glutazione perossidasi riduce gli idroperossidi e l'acqua ossigenata, mentre la catalasi favorisce la demolizione dell'acqua ossigenata. Assieme a questi enzimi, esistono dei composti minori, prodotti dal metabolismo, che hanno sempre azione antiossidante (bilirubina, acido urico e glutazione). Le proteine, che legano i metalli di transizione quali il ferro (Fe) ed il rame (Cu), prevengono le reazioni di ossidazione inducibili dalla presenza dei metalli liberi; queste proteine sono l'albumina, la transferrina, la ferritina per il Fe e la ceruloplasmina per il Cu. Gli antiossidanti assunti tramite la dieta sono le vitamine (C, E), i carotenoidi (β -carotene, licopene ecc.), i minerali (selenio) ed i meno conosciuti polifenoli ed indoli (quercetina, kampferolo, miricetina, acido ferulico, acido clorogenico, ecc.).

Le molecole antiossidanti possono essere classificate anche a seconda del meccanismo con il quale agiscono; si distinguono quindi in "scavengers" di radicali, "quenchers" e "synergists" (Fantozzi, 1995).

Le prime sono quelle sostanze che reagiscono con i radicali liberi, trasformando esse stesse in radicali; tocoferoli, acido ascorbico, polifenoli e carotenoidi agiscono in questo modo. I "quenchers" assumono energia da pigmenti eccitati, provvedendo a dissiparla sotto forma di emissione di luce (es. tocoferoli e caroteni nei confronti dell'ossigeno singoletto 1O_2); il processo non comporta trasferimento di elettroni. I "synergists" agiscono in collaborazione con i composti delle due classi precedenti e sono l'acido fosforico, il tartarico, il citrico, le lecitine ed alcuni aminoacidi.

Gli antiossidanti possono essere classificati a seconda della loro solubilità: nella categoria degli antiossidanti idrofilici, cioè affini ai solventi polari, sono compresi alcuni polifenoli (acido gallico, catechina) e alcune vitamine (C e quelle del gruppo B); tra gli antiossidanti lipofilici, cioè affini agli oli e ai grassi, vi sono alcuni carotenoidi (clorofilla a e b, β -carotene, licopene), alcuni polifenoli (epicatechina, quercetina, rutina, acidi caffeico, ferulico e cumarico), l' α -tocoferolo, l'acido linoleico e lipoico.

Un'altra distinzione importante è quella fra antiossidanti naturali e sintetici. I primi si ottengono dall'estrazione della materia prima naturale utilizzando solventi organici oppure con trattamenti "mild" per migliorare il grado di purezza. Gli antiossidanti sintetici sono, invece, quelli prodotti in laboratorio.

La principale differenza fra i due è che gli antiossidanti naturali sono meno efficaci dei sintetici, poiché hanno una più lenta disponibilità a donare l'atomo di idrogeno (Soldatini, 1997).

Le piante durante l'evoluzione hanno sviluppato soluzioni strategiche che consentono loro sia la crescita che la sopravvivenza; in particolare un metabolismo primario legato alla crescita e un metabolismo secondario, associato alla necessità di sintetizzare sostanze deputate alla difesa e ad

altre funzioni basilari per la sopravvivenza (regolazioni ormonali, resistenza agli stress, riserva e facilitazione nell'assorbimento di nutrienti).

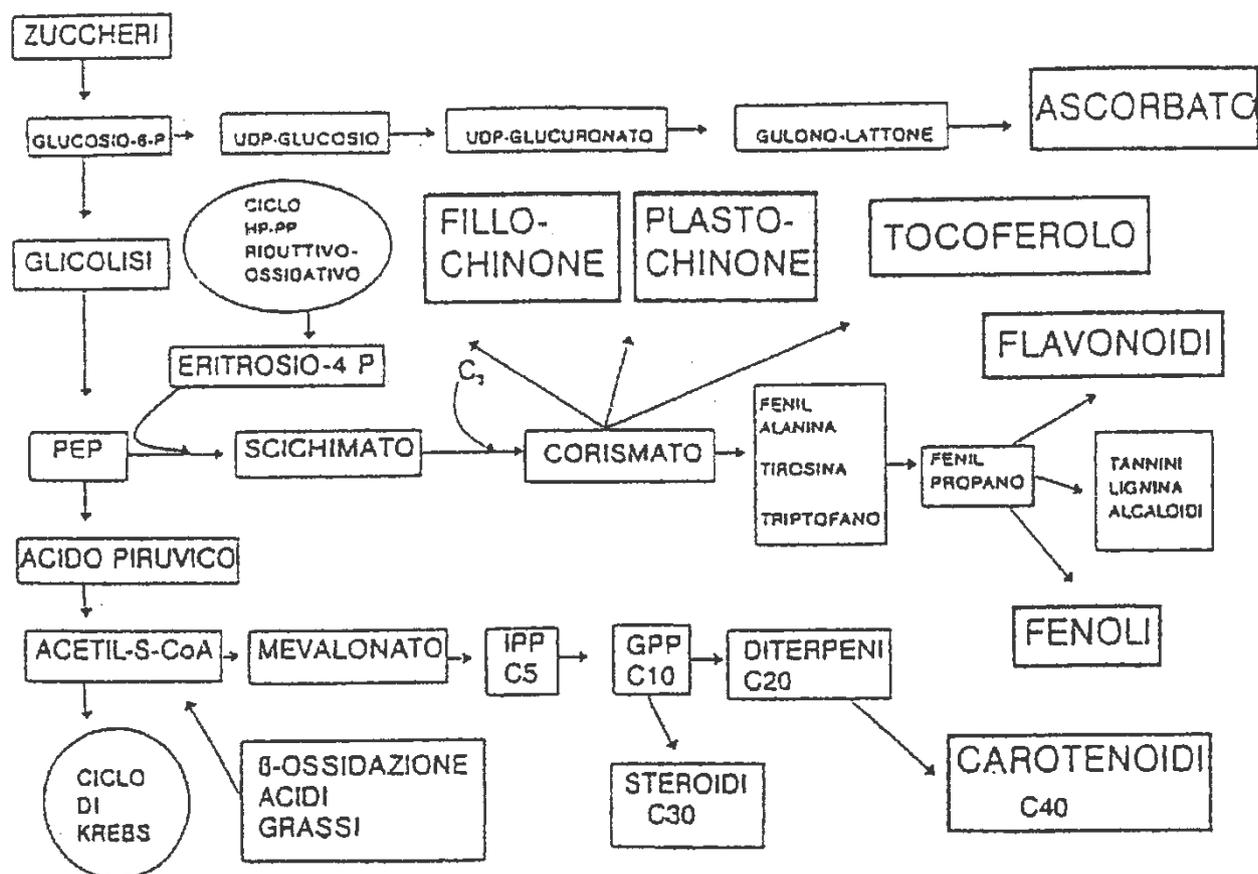


Figura 1 : Il metabolismo secondario che porta alla sintesi degli antiossidanti prende avvio dal metabolismo primario (Soldatini, 1996)

La protezione dagli stress ossidativi è uno degli scopi essenziali del metabolismo secondario (Fig. 1). Le piante presenti in ambienti sub-ottimali, dove questi processi sono particolarmente sviluppati, dirottano parte degli assimilati utili alla crescita verso sostanze destinate alla difesa; ecco perché questi vegetali sono potenzialmente più ricchi di antiossidanti.

2.2 Il danno ossidativo

L'ossigeno è una molecola fondamentale per la vita dell'uomo e della maggior parte degli esseri viventi; si configura come accettore terminale degli elettroni nella catena respiratoria mitocondriale (Curtis, Barnes, 1994). Tuttavia l'ossigeno si può comportare da agente tossico visto che dal suo metabolismo possono originarsi delle specie reattive che aggrediscono e danneggiano l'organismo umano.

L'ossigeno molecolare (O_2) ha una reattività piuttosto debole, mentre i sottoprodotti del metabolismo ossidativo, denominati radicali liberi, pur essendo implicati in molti processi vitali, sono altamente dannosi, essendo correlati all'insorgenza di una serie di malattie quali il cancro, l'arteriosclerosi, l'artrite, la cataratta e il diabete.

Un radicale libero è una molecola capace di esistenza indipendente che possiede uno o più elettroni spaiati cioè non accoppiati (Porrini, Testolin, 1997); molti radicali liberi sono pertanto instabili, altamente reattivi ed in grado di instaurare reazioni a catena nei confronti delle componenti vitali delle cellule.

Generalmente gli atomi sono disposti in molecole all'interno delle quali gli elettroni si presentano a coppie; ogni coppia di elettroni ha una rotazione opposta e ogni elettrone di una coppia ruota in direzione contraria all'altro, garantendo così la massima stabilità della molecola. Quando i radicali liberi si formano, tendono a ricercare una maggior stabilità: reagiscono con altre molecole a cui sottrarre protoni, si formano altri radicali e si avvia una reazione a catena che lentamente danneggia in maniera irreversibile la struttura chimica delle cellule.

Questo processo è detto "stress ossidativo" e viene considerato come uno spostamento dalla posizione di equilibrio di agenti pro - ossidanti e antiossidanti a favore dei primi (Tirosh, Reznick, 2000). Lo stress dipende da caratteristiche genetiche soggettive e da caratteristiche individuali quali il peso, il sesso, l'età, il tipo di alimentazione, le condizioni di vita, ecc..

Anche altri fattori, esterni all'individuo, hanno grande influenza sullo stress; ricordiamo il buco dell'ozono, gli inquinanti dell'aria (esempio anidride solforosa, ossidi di azoto, benzene) e l'esposizione prolungata ai raggi UV.

I radicali più interessanti dal punto di vista biologico sono i ROS (Reactive Oxygen Substances) nei quali l'elettrone spaiato è sull'ossigeno. I principali radicali liberi sono il radicale idrossilico (HO^0), il radicale superossido (O_2^{0-}), l'ossido di azoto (0NO) e il radicale perossilico (ROO^0) (Jongen, Linnemann, 1996).

Il radicale idrossilico (HO^0) deriva dalla riduzione dell'acqua ossigenata:

$HOOH + D \longrightarrow HO^0 + OH^- + D^+$ dove D è una molecola donatrice di elettroni. Il radicale superossido (O_2^{0-}) deriva dalla riduzione monovalente dell'ossigeno:



per reazioni di autoossidazione nelle quali composti come le catecolammine, l'acido ascorbico e le flavine ridotte reagiscono direttamente con l' O_2 ; inoltre la generazione di superossidi è dovuta

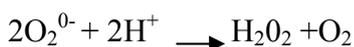
anche all'azione fagocitaria, svolta nelle cellule aerobiche, attraverso la quale avviene l'uccisione di alcuni batteri o funghi dannosi per l'organismo (Soldatini, 1997).

Il radicale perossilico (ROO°) è dato dall'addizione di ossigeno molecolare a radicali alchilici (R°)(2), generati dall'estrazione di idrogeno da parte di radicali $^\circ\text{OH}$ (1) (Allinger et al., 1982):



Il termine ROS include, come specie reattive all'ossigeno, anche molecole che non sono radicali, ma derivano egualmente dall'ossigeno; queste molecole sono l'acqua ossigenata (H_2O_2), l'ossigeno singoletto ($^1\text{O}_2$), l'acido ipocloroso (HOCl) e l'ozono (O_3).

L'acqua ossigenata (H_2O_2) è prodotta da diversi enzimi ossidatici e può generarsi anche per dismutazione del superossido O_2^{0-} da parte della superossido dismutasi (SOD) (Soldatini, 1997):



L'ossigeno singoletto ($^1\text{O}_2$), agente tossico di grande rilevanza, deriva dall'attività fotosintetica, dalla reazione dell'acqua ossigenata con l'ipoclorito nei fagosomi (3) e per interazione molecolare fra radicali perossilici (4):



I ROS, a livello cellulare, sono molto importanti in quanto esplicano la loro azione degradativa su diversi substrati: DNA, proteine, lipidi e carboidrati.

I ROS inducono possibili fenomeni di mutazione, che possono causare tumori e danni cellulari; sul DNA modificano la struttura e la funzione delle proteine con alterazione delle attività enzimatiche; sui lipidi si possono instaurare fenomeni di perossidazione che modificano la struttura e le funzioni delle membrane, modificazioni nei confronti delle lipoproteine e degenerazioni a livello neurologico e sui carboidrati possono avvenire alterazioni a carico dei recettori.

2.3 Le sostanze polifenoliche

Sono una grande classe di composti ad alto valore salutistico e nutrizionale; questi composti derivano dal metabolismo secondario della pianta e sono prodotti attraverso la via biosintetica dell'acido scichimico.

Questa via è presente anche nei funghi e nei batteri, ma non negli animali; ecco perché l'uomo deve assumere con la dieta i prodotti fenolici e gli aminoacidi aromatici di cui abbisogna. Da studi effettuati, l'apporto medio di 5 flavonoidi nella dieta olandese è di 23 mg/d, mentre in quella americana è di 20.1 mg/d (Vinson et al., 1998).

I polifenoli sono presenti nella verdura, nella cioccolata, nelle bevande di origine vegetale (vino, tè) (Mattivi et al., 2001), nella frutta fresca e si possono trovare sia sotto forma libera che legata; la più frequente è quest'ultima sia nei frutti che nei vegetali (Vinson et al., 2001). I frutti più ricchi di composti fenolici ($>30 \text{ n mol/g}$) sono i mirtilli rossi e blu, l'uva rossa e bianca, le pere, le fragole, le mele e le ciliegie; i vegetali più ricchi in polifenoli, per la maggior parte in quercetina, sono le bietole, le cipolle, i broccoli, gli asparagi ed i fagioli (Weisburger, 2000; Rice-Evans et al., 1997).

I polifenoli agiscono da molecole antiossidanti, proteggendo l'organismo dall'insorgenza di malattie cardiovascolari (Vinson et al., 1998; Rice-Evans et al., 1997; Morton et al., 2000); prevengono le LDL dall'ossidazione, agendo da "scavengers" dei radicali liberi, soprattutto perossilici, rompendone la catena di formazione e legandosi ad essi per neutralizzarli. Inoltre agiscono da "quencher" nei confronti dei ROS e dei RNS e da chelatori di metalli (Tab.1).

| Antiossidante | Fonti | Attività antiossidante (a) (mM) |
|--------------------------|--|------------------------------------|
| Vitamine | | |
| Vitamina C | Frutta e vegetali | 1.0 ± 0.02 |
| Vitamina E | Cereali, nocciole e oli | 1.0 ± 0.03 |
| Flavonoidi | | |
| Antocianidine | | |
| Enina | Uva nera/vino rosso | 1.8 ± 0.02 |
| Cianidina | Uva, fragole e lamponi | 4.4 ± 0.12 |
| Delfinidina | Buccia di melanzana | 4.4 ± 0.11 |
| Flavon-3-oli | | |
| Quercetina | Cipolla, buccia di mela, mirtilli, uva nera, tè e broccoli | 4.7 ± 0.10 |
| Kampferolo | Indivia, porro, broccoli, pompelmo e tè | 1.3 ± 0.08 |
| Flavoni | | |
| Rutina | Cipolla, buccia di mela, mirtilli, uva nera, tè e broccoli | 2.4 ± 0.12 |
| Luteolina | Limone, oliva, sedano e peperoncino rosso | 2.1 ± 0.05 |
| Crisina | Buccia della frutta | 1.4 ± 0.07 |
| Apigenina | Sedano e prezzemolo | 1.5 ± 0.08 |
| Flavan-3-oli | | |
| Epicatechina | Uva nera/vino rosso | 2.4 ± 0.02 |
| Epigallocatechina | Tè | 3.8 ± 0.06 |
| Epigallocatechin gallato | Tè | 4.8 ± 0.06 |
| Epicatechin gallato | Tè | 4.9 ± 0.02 |
| Flavanoni | | |
| Taxifolina | Agrumi | 1.9 ± 0.03 |
| Narirutina | Agrumi | 0.8 ± 0.5 |
| Naringenina | Agrumi | 1.5 ± 0.05 |
| Esperidina | Succo d'arancia | 1.0 ± 0.03 |
| Esperetina | Succo d'arancia | 1.4 ± 0.08 |
| Teaflavine | | |
| Teaflavina | Tè nero | 2.9 ± 0.08 |
| Teaflavina-3-gallato | Tè nero | 4.7 ± 0.16 |
| Teaflavina-3'-gallato | Tè nero | 4.8 ± 0.19 |
| Teaflavina digallato | Tè nero | 6.2 ± 0.43 |
| Idrossicinnamati | | |
| Acido caffeico | Uva bianca, oliva, cavolo e asparago | 1.3 ± 0.01 |
| Acido clorogenico | Mela, pera, ciliegia, pesca e pomodoro | 1.3 ± 0.02 |
| Acido ferulico | Cereali, pomodoro, cavolo e asparago | 1.9 ± 0.02 |
| Acido p-cumarico | Uva bianca, pomodoro, cavolo e asparago | 2.2 ± 0.06 |

(a) Misurato come TEAC (Attività antiossidante in equivalenti Trolox) - la concentrazione di Trolox con un'attività antiossidante equivalente ad una concentrazione 1 mM di una sostanza sperimentale.

Fonte: (Rice-Evans et al., 1997)

Tabella 1: Attività antiossidante relativa a diverse fonti vegetali

Frutta e verdura, sottoposte a cottura con microonde o bollitura, vedono diminuire il loro contenuto polifenolico (Vinson et al., 1998), anche se vi sono studi che dimostrerebbero il mantenimento del contenuto polifenolico anche a temperature di 88° C (Dewanto et al., 2002).

I polifenoli si dividono in flavonoidi, antociani, tannini, acidi fenolici e loro derivati (Sciancalepore, 1998).

I flavonoidi sono la maggiore classe di polifenoli. Essi hanno una struttura $C_6 - C_3 - C_6$ costituita da due anelli aromatici che sono legati assieme da tre unità carbonio con un eterociclo ossigenato.

L'anello A è caratteristicamente il floro glucinolo o resorcinolo idrossilato nel nucleo fenolico B in posizione 4-, 3,4- oppure irossilato in posizione -3,4,5. (Fig.2).

La struttura di base di Flavonoidi

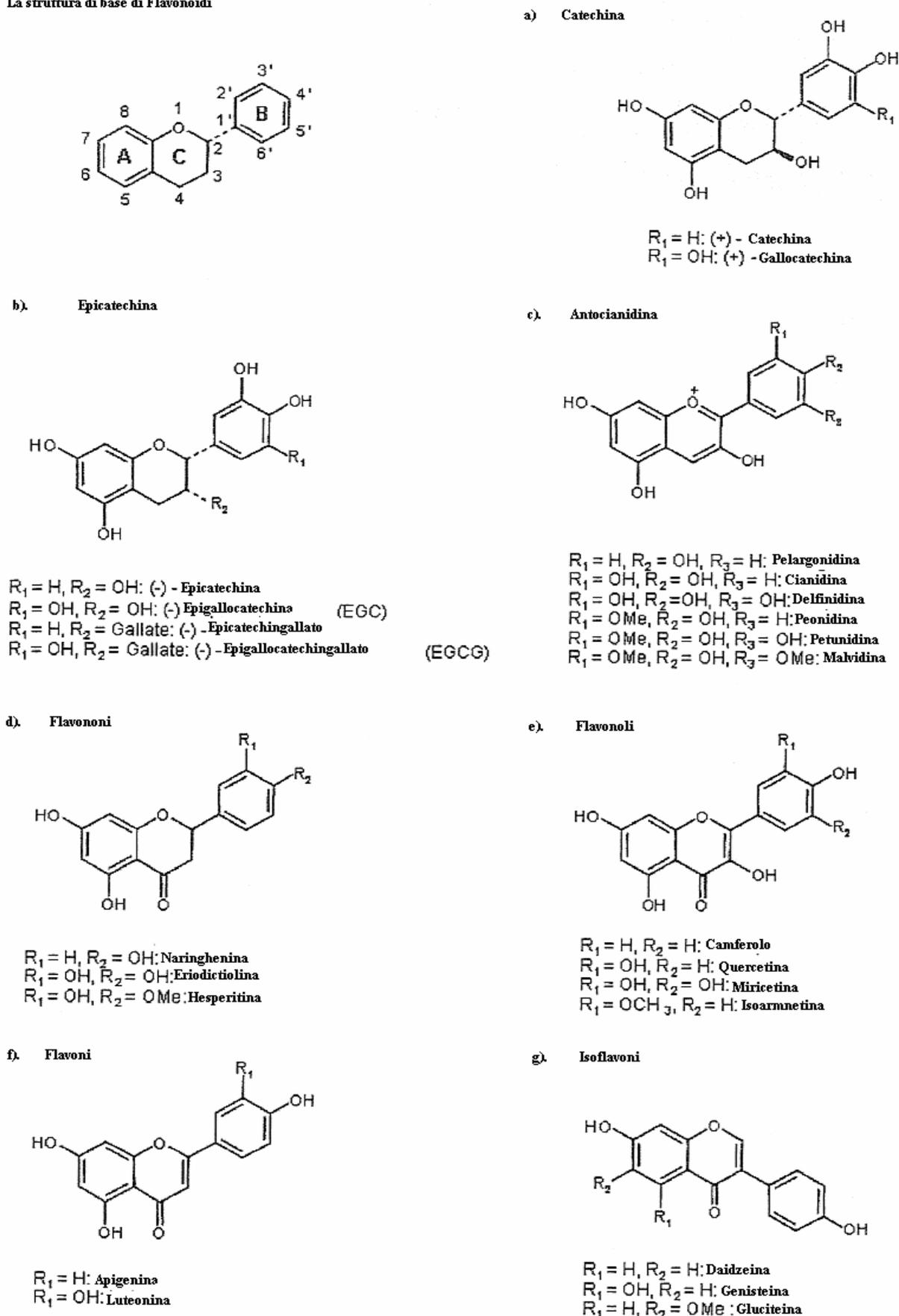


Figura 2: Struttura dei flavanoidi

Le sei maggiori classi di flavonoidi includono flavonoli, flavoni, flavanoli, flavanoni, antociani e isoflavoni (Tab. 2).

| Classe | Flavonoidi | Fonti |
|------------|-----------------------------------|-------------------------|
| Flavonoli | Quercetina, Camferolo, Miricetina | Tè, mele, cipolle |
| Flavoni | Apigenina, Luteolina | Erbe, verdure |
| Flavanoli | Catechina, Procianidine | Tè, vino rosso, vinacce |
| Flavanoni | Esperidina, Naringenina | Frutti esotici |
| Antociani | Cianidina | Frutti di bosco |
| Isoflavoni | Genisteina, Daidzeina | Fibra |

Tabella 2: Classi di flavonoidi e loro fonti

2.4 Gli antiossidanti presenti negli alimenti e il loro effetto sulla salute

Nell'ultima decade, un'attenzione considerevole da parte del mondo scientifico è stata prestata agli antiossidanti fenolici naturali, compresi i flavonoidi e varie sostanze fitochimiche trovate in alcuni frutti e verdure, vino rosso e tè, per i loro potenti effetti protettivi contro i danni ossidativi. La letteratura sugli antiossidanti è molto vasta e vi sono degli studi che sostengono il ruolo dei polifenoli sulle malattie cardiovascolari e sul cancro, tuttavia, pochi hanno dimostrato direttamente questi effetti benefici testati *in vivo* o *in vitro* (Azzi et al., 2004).

Numerosi lavori per la caratterizzazione degli antiossidanti naturali hanno evidenziato l'esigenza di metodologie innovative e standardizzate (Frankel, Meyer, 2000).

La grande quantità e diversità dei metodi messi a punto per valutare gli antiossidanti e la vasta terminologia usata nella letteratura di riferimento hanno creato molta confusione. La differenza significativa dei risultati si presenta soprattutto tra gli studi sugli animali e quelli sugli esseri umani (Magher, Rader, 2001; Witztum, Steinberg, 2001), e gli effetti *in vitro* ed *in vivo* (Seifert et al., 2004).

Gli studi dell'arteriosclerosi con i modelli animali hanno dimostrato l'effetto antiossidante della vitamina E e dei composti fenolici per fermare il progresso di tale malattia. Tuttavia, le prove cliniche su umani hanno fornito risultati contraddittori. Gli studi sulla malattia con i modelli animali non rappresentano necessariamente lo stesso processo di sviluppo della stessa in esseri umani. Anche se l'accumulo della lipoproteina a bassa densità ossidata (LDL) in circolo tramite le arterie e lo sviluppo delle lesioni entro alcuni mesi è stata dimostrata in vari modelli animali,

in quelle umane le stesse si sviluppano molto più lentamente. Di conseguenza, i risultati su animali degli antiossidanti non concordano con quelli su umani perché sono basati su punti finali significativamente differenti.

La stessa divergenza può applicarsi agli studi che confrontano l'attività antiossidante *in vitro* con quella *in vivo*. Quelli *in vitro* hanno impiegato generalmente concentrazioni di fenoli quantitativamente diverse rispetto alle concentrazioni *in vivo* che potrebbero essere assunte (Frankel et al., 1993; Olivé et al., 2003). I flavonoidi ed altre biomolecole sono considerati come componenti non essenziali della dieta. È importante quindi distinguerli fra le sostanze di nutrienti essenziali e gli altri componenti dell'alimento.

Le sostanze nutrienti essenziali per lo sviluppo, sopravvivenza e riproduzione possono essere rimosse dalla dieta e determinare se i sintomi di mancanza si sviluppano in tutti gli individui indipendentemente dal contesto. Se un alimento o un componente dietetico non è essenziale, allora il relativo valore deve essere osservato come favorevole soltanto all'interno di un contesto particolare e secondo un meccanismo particolare. Quindi quando si definisce un componente dietetico non indispensabile come valutazione per la salute è necessario definire i contesti ed gli individui per i quali un tale componente è favorevole. La catechina (Frankel et al., 1993), presente nel vino rosso è stata indicata per essere assorbita, metabolizzata ed espulsa raggiungendo concentrazioni sufficienti in plasma umano per contribuire ad una certa protezione di LDL *in vivo* (Donovan et al., 1999).

Quindi, in individui con fattori di rischio dell'arteriosclerosi, il consumo di catechina potrebbe avere una certa misura di protezione dei lipidi dalle reazioni deterioranti di ossidazione che sono legate all'arteriosclerosi. L'attività *in vivo* di composti fenolici come antiossidanti non è ancora ben capita. Lo sviluppo di biomarkers che possono essere collegati meglio con le malattie degenerative (Astley, 2003), presenta una delle sfide più difficili in questo campo. Studi diversi dimostrano che i flavonoidi ed i vari polifenoli potrebbero avere effetti antiossidanti e protettivi nel tratto gastrointestinale con l'assorbimento completo (Temple, 2000; Azzi et al., 2004). Questa ipotesi è sostenuta dalle concentrazioni più elevate dei residui fenolici trovati nello stomaco e nel lumen intestinale piuttosto che nel plasma.

(Lau et al., 2006) in un articolo sui mirtilli attribuiscono gli effetti benefici agli antociani. Essi sostengono che la loro proprietà antiossidante dovrebbe proteggere il tessuto del cervello da danni ossidativi indotti da vari stress ossidativi come ad esempio l'infiammazione.

Ad ogni modo, gli antociani possono indurre cambiamenti favorevoli alterando il segnale cellulare. (Sang et al., 2006), mettono l'attenzione sul tè verde, in particolare i relativi effetti anticancro, che sono stati attribuiti ai composti polifenolici e l'articolo studia i vari meccanismi

di azione che sono stati proposti per spiegare gli effetti, meccanismi che coinvolgono le chinasi del MAP e del NF κ B

2.5 Il metabolismo dei flavonoidi: la chiave per capirne gli effetti sulla salute.

La struttura di quattro flavonoidi ha suscitato un considerevole interesse per la ricerca (Fig.3).

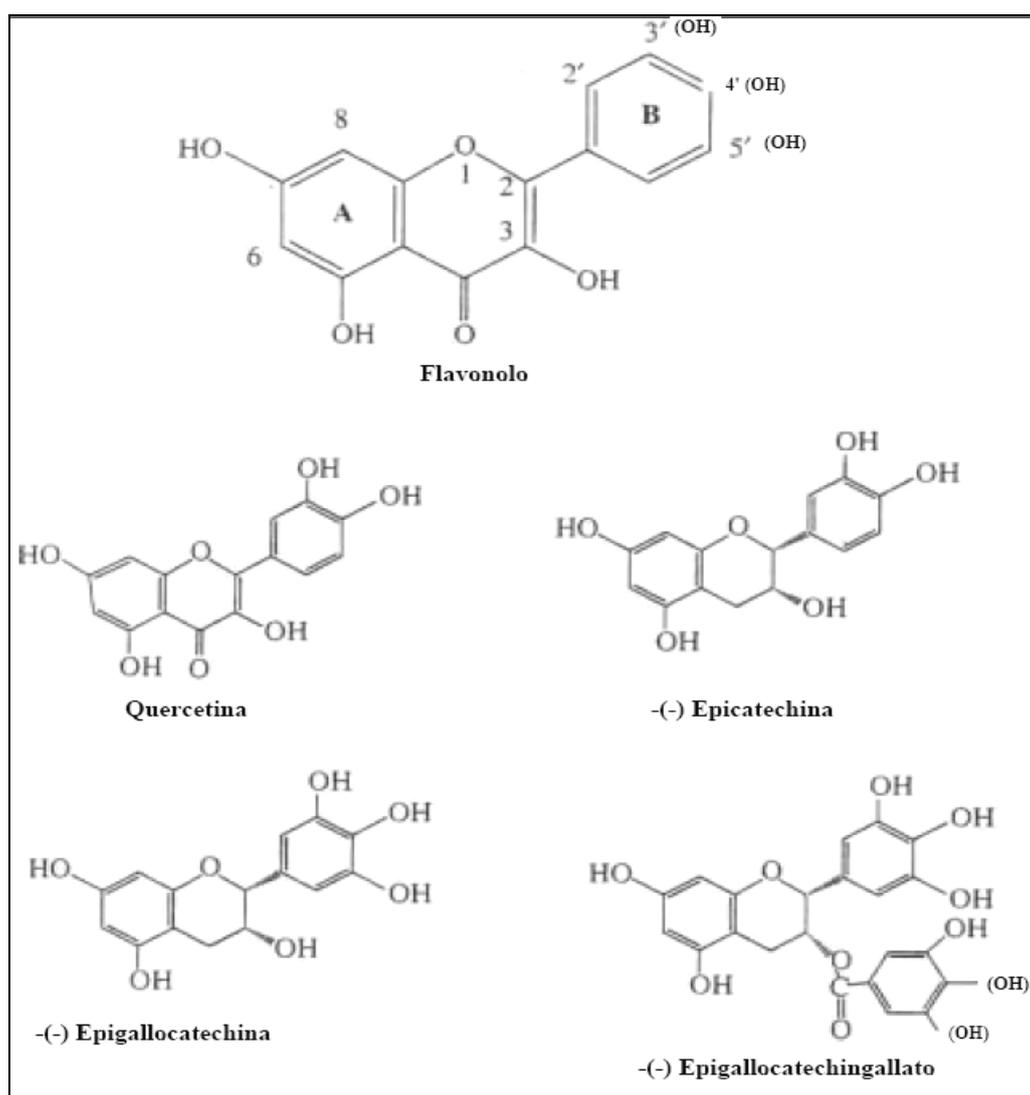


Figura 3: Struttura dei quattro flavonoidi che hanno suscitato maggiore interesse per la ricerca

La maggior parte dei flavonoidi, tranne le proantocianidine, sono presenti nelle piante come glucosidi, anche se sono stati trovati occasionalmente come agliconi. I flavonoidi possono mostrare una vasta gamma di effetti sulla salute.

Gli studi segnalati fin qui si sono basati sull'analisi della concentrazione dei flavonoidi nell'urina e nel plasma dei loro metaboliti. L'idrolisi di flavonoidi in agliconi prima dell'assorbimento e della successiva coniugazione in glucuronide sotto forma di solfato si pensa che avvenga ad opera di batteri enterici. L'azione dell'enzima lattasi florizina idrolisi (Nemeth et al., 2003), localizzato sulla membrana apicale delle cellule piccole epiteliali dell'intestino, è importante nella formazione dell'aglicone prima dell'assorbimento. Gli antociani dimostrano una deviazione importante da questa generalizzazione in quanto la dose assorbita dell'antocianidina e dell'aglicone non sono generalmente presenti nel plasma o nelle urine (Wu et al., 2005; Wu et al., 2004).

Confrontati con i flavonoidi polifenolici, i monofenoli possono essere presenti in quantità considerevole sia in termini di concentrazione che di numero (Jenner et al., 2005). All'interno del tratto gastrointestinale gli effetti biologici dei monofenoli possono essere uguali o più importanti di quelli dei polifenoli. I glucosidi delle antocianidine si è visto essere idrolizzati dalla microflora intestinale da 20 minuti a 2 h di incubazione secondo la varietà dello zucchero (Keppler et al., 2005). A causa dell'alta instabilità delle aglicon-antocianidine liberate a pH neutro, i prodotti di degradazione fenolica primaria sono determinati in 20 minuti di incubazione. La formazione degli acidi fenolici, come prodotto stabile principale di degradazione, fornisce un suggerimento importante quanto al destino degli antociani in vivo (Fleschhut et al., 2006).

La metilazione è una via comune del metabolismo dei flavonoidi. I flavonoidi che hanno una struttura di catecolo nel nucleo fenolico B sono metabolizzati soprattutto in derivati 3'-O-metilici, ma alcuni derivati 4'-O-metilici possono formarsi in quantità più piccole. I flavonoidi che hanno una struttura di pirogallolo sono metabolizzati in derivati 4'-O-metilici. Gli antociani (glucoside 3-O-cianidina) sono metabolizzati in derivati 3'-O-metilici (glucoside -3-O-peonidina) e 4'-O-metilici (glucoside -3-O-isopeonidina), (Wu et al., 2005; Wu et al., 2004; Kay et al., 2005). I flavonoidi che contengono i diidrossi 3'-4'-orto-catecolo nel nucleo fenolico B sono trasferiti principalmente come glucuronidi, mentre i monoidrossimetilati trasformano i composti fenolici meno predisposti alla glucuronidazione. I flavonoidi con monoidrossimetilati sembrano essere meno suscettibili alla glucuronidazione nel piccolo intestino, ma possono essere glucuronidati nel fegato. Le antocianidine sono state indicate per coniugarsi con glucuronide (Wu et al., 2005; Wu et al., 2004; Kay et al., 2005). Glucuronide/solfato ed i coniugati metilati di quercetina sono comparsi nella linfa dei ratti dopo somministrazione della quercetina (Murota et

al., 2005). La catechina ed epicatechina sono ampiamente O-metilate durante il trasferimento attraverso il fegato, in rapporto all'attività della catecol-O-metil transferasi.

Fino al 30% dei composti i 3-flavanoli della catechina e dell'epicatechina, trovati nel liquido sieroso, sono stati O-metilati e un 20 % dell'O-metilato è stata glucuronidato. Le proantocianidine rappresentano altre classi di polifenoli che sono oligomeri o polimeri di 3-flavanoli e sono una parte importante presente nella dieta umana (Gu et al., 2004). Le procianidine sono presenti come monomeri (catechina ed epicatechina) e come oligomeri. Epicatechina e catechina vengono assorbite dal tratto intestinale e si coniugano al glucuronide e/o alla forma solfato (Piskula et al., 1998; Natsume et al., 2003) hanno identificato (-) – epicatechina-3-O-glucuronide, come via metabolica principale nel plasma ed urina degli esseri umani. In esseri umani, (-)-epicatechina, così come la quercetina, può coniugarsi con l'acido glucuronico all'interno dell'intestino per via dell'enzima glucuronosil-transferasi UDP con conseguente metabolita 3'-O-glucuronide. Le tracce delle procianidine e dei dimeri B1, B2, B3 e B4 e del trimero C2 sono state rilevate in urina (Tsang et al., 2005). Gli oligomeri delle procianidine non sembrano essere depolimerizzati in 3-flavanoli monomerici in alcuna misura durante il passaggio attraverso lo stomaco e il tratto gastrointestinale (Tsang et al., 2005; Rios et al., 2002; Donovan et al., 2002). Numerosi studi hanno riguardato il metabolismo e la coniugazione dei flavonoidi usando il ratto come modello. Tuttavia, per alcuni flavonoidi il ratto non può essere il modello migliore per l'estrapolazione del metabolismo (Gu et al., 2006). In ratti e scimmie quantità significative di diadzeina sono metabolizzate completamente (de Boer et al., 2005) mentre nei maiali ed almeno nel 60-70% degli esseri umani nessun prodotto è completamente trasformato. (Murata, Terao, 2005) hanno dimostrato che la quercetina, dopo essere stata metilata e coniugata nella mucosa gastrointestinale dei ratti con il glucuronide o il solfato, è stata trasportata in linfa ma non come aglicone-quercetina. (De Boer et al., 2005), hanno pubblicato uno degli studi più completi sulla quercetina e i suoi metaboliti nei tessuti di ratti e di maiali. Dopo 11 settimane di alimentazione con quercetina, i metaboliti sono stati identificati in molti tessuti del ratto, con le più alte concentrazioni trovate in fegato e le più basse nel cervello, nel grasso bianco ed nella milza. In uno studio a tempo più breve sul maiale, il fegato ed il rene hanno avuto alte concentrazioni dei metaboliti della quercetina, mentre il cervello, il cuore e la milza hanno mostrato basse concentrazioni di quercetina (De Boer et al., 2005). La quercetina era presente nei tessuti soprattutto come forma metilata, solfato, glucuronidizzata e coniugata. Comunque, la presenza dell'attività di β -glucuronidasi nel polmone, nel fegato e nel rene del ratto possono causare la conversione *in vivo* della quercetina coniugata in aglicone libero.

(Talavera et al., 2005) hanno misurato la distribuzione degli antociani nello stomaco, fegato e cervello in ratti alimentati da una dieta arricchita di antociani per 15 giorni. Il tessuto dello stomaco conteneva 3-0-glucoside cianidina e 3-0-pentoside cianidina, mentre sono stati identificati in fegato e rene gli antociani metilati come pure le antocianidine coniugate (monoglucuronide della peonidina e della cianidina). Le proporzioni di derivati degli antociani sono differenti secondo l'organo interessato e preso in esame, con il fegato che ha la proporzione più elevata delle forme metilate. Nel cervello, il contenuto totale degli antociani (antociani di mirtilli e 3-0-glucoside peonidina) ha raggiunto 0.25 nmol g^{-1} di tessuto (Talavera et al., 2005). Un lavoro considerevole di ricerca con studi *in vitro* è stata fatto usando sistemi di colture cellulari per studiare gli effetti di vari flavonoidi. I composti che sono stati presi in esame sono disponibili in commercio come agliconi. Sulla base della letteratura recente, i flavonoidi che sono stati testati *in vitro* non possono rappresentare cosa potrebbe essere disponibile nei tessuti delle cellule in vivo. Le cellule tranne quelle che frequentano il tratto gastrointestinale probabilmente non saranno esposte all'aglicone-antocianina. Inoltre i ricercatori non hanno determinato la stabilità dei composti nel sistema coltura cellulare. Alcuni antociani non sono stabili per più di 2 ore, così l'interpretazione dei risultati nel senso di segnalazione della risposta ad un particolare composto risulta difficile.

2.6 I flavonoidi e i fattori di rischio delle malattie cardiovascolari

Numerosi studi epidemiologici sono stati condotti in merito alla correlazione tra l'assunzione di flavonoidi e il rischio di malattie cardiovascolari (Arts, Vita, 2005).

Questi studi hanno coinvolto la patogenesi di malattie da danno ossidativo e infiammazione, fattori di rischio delle malattie cardiovascolari quali lipidi nel sangue, omocisteina, pressione sanguigna e peso, e marcatori delle malattie cardiovascolari quali funzioni endoteliali.

Per molti di questi i risultati sono diversi e deve ancora emergere un quadro chiaro.

Comunque, malgrado molte ricerche, vi sono pochi risultati che indichino che i flavonoidi possono inibire il danno ossidativo in vivo. I risultati di studi *in vitro* in modelli animali indicano che i flavonoidi possono ridurre la concentrazione del colesterolo nel sangue.

Negli uomini uno dei metodi per investigare sulle funzioni endoteliali è la ultrasonografia indirizzata sui vasi conduttori quali le arterie brachiali. Questa è una tecnica non invasiva che misura la vasodilatazione delle arterie in risposta a stress indotti da incremento del flusso sanguigno.

La validità di questa tecnica è supportata da osservazioni per le quali anomalie nella circolazione periferica sono associate con una serie di fattori di rischio cardiovascolari, con anormali risposte vaso toniche nella circolazione coronaria e con un aumento dei rischi coronarici.

Queste ricerche condotte negli ultimi anni hanno dimostrato benefici effetti dei flavonoidi sulle funzioni endoteliali. Gli studi sono stati condotti con flavonoidi contenuti nel tè, cacao, cioccolato scuro, vino rosso e fonti derivate e isoflavoni da soia.

L'assunzione di tè, cacao e cioccolato scuro ha dimostrato di aumentare le funzioni endoteliali.

I risultati di Schroeter e coll. hanno dimostrato che l'epicatechina del cacao è il responsabile primario dell'effetto vascolare. Somministrazioni orali di (-)-epicatechina pura hanno evidenziato effetti vascolari come i flavonoidi del cacao. Questi effetti sono simili a causa dell'aumento di sintesi di NO da parte dei flavanoli. Il tè contiene epicatechine, ma a più bassa concentrazione, e contiene un'alta concentrazione di altre catechine con struttura simile.

I flavonoidi assorbiti vengono spesso rapidamente metabolizzati. Un importante passaggio del metabolismo dei flavonoidi dopo l'assorbimento è la O-metilazione da parte di catecol-O-metiltransferasi (COMT), (Lu et al., 2003). Sembra che molti dei flavonoidi assorbiti siano metilati, ma il livello di metabolizzazione può essere diverso tra individui. I flavonoidi possono agire da accettori di gruppi metilici a cominciare da O-metilato attraverso l'azione del COMT durante il metabolismo della metionina a omocisteina.

Comunque una dieta con polifenoli ha la possibilità di innalzare la concentrazione di omocisteina nel plasma (tHcy), (Hodgson et al., 2003). Inoltre, la O-metilazione dei flavonoidi riduce la esposizione degli endoteli all'alterazione da parte di composti chimici e può variare la attività vasodilatatrice.

Comunque, differenze nel metabolismo dei flavonoidi hanno il potere di influire sulla attività biologica e sui suoi effetti.

L'attività del COMT può variare molto a seconda degli individui, questo può spiegare le diversità osservate nella metilazione dei flavonoidi. L'attività del COMT è regolata dal relativo gene. Ci sono due genotipi: uno con bassa attività del COMT, l'altro con alta attività (Dawling et al., 2001). Questo fatto può essere il più importante, ma non l'unico che influenza la metilazione dei flavonoidi.

Si è osservato che in individui che bevono cinque tazze di tè nero per 4 settimane, vi è relazione tra il grado di O-metilazione dei fenoli e il cambiamento del tHcy. Generalmente una regolare ingestione di tè nero non altera tHcy.

Comunque, il grado con il quale individui O-metilano i flavonoidi derivati dal tè è stato associato positivamente con il cambiamento di tHcy (Hodgson et al., 2003). Più recentemente si è indagato

se cambiamenti nelle funzioni endoteliali a seguito di croniche ed acute ingestioni di tè erano relative alla O-metilazione dei derivati fenolici del tè. Durante croniche ingestioni di tè il grado con il quale individui O-metilavano i flavonoidi è stato negativamente associato con cambiamenti nelle risposte del flusso mediato da dilatazione. Questi individui che metilavano meno i flavonoidi avevano maggiori e importanti miglioramenti nelle funzioni endoteliali.

2.7 I polifenoli e le malattie polmonari

Come già precedentemente riportato, i polifenoli con oltre 8000 strutture differenti sono metaboliti secondari delle piante e costituiscono uno dei gruppi più numerosi ed ampiamente distribuiti nel regno vegetale. Le trasformazioni biochimiche nel tratto digestivo da parte degli enzimi intestinali e della microflora li rendono più solubili in acqua e adatti ad essere metabolizzati, anche se durante questo processo le loro proprietà terapeutiche possono essere influenzate. Di conseguenza, i loro effetti antiossidanti possono essere alterati rispetto alle loro forme iniziali. In generale, la biodisponibilità dei polifenoli è limitata per il loro basso assorbimento e la loro veloce eliminazione. La correlazione fra la funzione polmonare, i sintomi respiratori e la dieta ha attratto recentemente un'attenzione considerevole. I polmoni sono esposti continuamente agli ossidanti, generati in modo endogeno dalle reazioni metaboliche oppure in modo esogeno dalle sostanze inquinanti dell'aria o dal fumo della sigaretta. Di conseguenza molte malattie polmonari sono accompagnate agli ossidanti, conosciuti collettivamente come le specie reattive dell'azoto e dell'ossigeno (rispettivamente ROS e RNS) che sono molto instabili e sono alla base dell'inizio dei processi ossidativi e azotati nelle cellule. Lo stress ossidativo direttamente è stato collegato ad ossidazione delle proteine, DNA e lipidi, che possono provocare ferite del polmone e/o inducono una varietà di risposte cellulari ossidativo-infiammatorie. Nei polmoni, i ROS possono alterare la matrice dei vasi sanguigni extracellulari, stimolare la secrezione della mucosa, inattivare le antiproteasi, causando l'apoptosi e regolare la proliferazione cellulare. (Rahman, MacNee, 1996; Rahman, MacNee, 1999). Per di più i livelli aumentati dell'ossidante nei polmoni sono stati accompagnati con l'inizio delle risposte infiammatorie e con l'attivazione dei fattori di trascrizione quali il fattore nucleare kappa B (NF- κ B), l'attivazione della proteina-1 (AP-1), la trasduzione del segnale, la rimodulazione nucleare della cromatina e l'espressione del gene mediatore pro-infiammazione /citochine.

Le citochine pro-infiammatorie includono interleuchina-1 (IL-1), il fattore- α del tumore di necrosi (TNF- α), l'interferone- γ (IFN- γ) e la chemochina quale interleuchina-8 e-6 (IL-8 e IL-6). Fra le citochine TNF- α sembra essere un mediatore importante della cascata infiammatoria. Un considerevole consumo di polifenoli del tè verde ed i polifenoli presenti nei vegetali, si pensa

abbiano portato l'inibizione della produzione di TNF- α in macrofagi, attenuando l'attivazione di NF- κ B, che è un mediatore importante dello stress ossidativo che segnala l'infiammazione dei polmoni (Yang et al., 1998). La maggior parte dei composti fenolici naturali mantiene le proprietà antiossidanti ed anti-infiammatorie grazie all'attività chemio-preventiva o chemio-protettiva (Yang et al., 1997; Zern et al., 2005). I polifenoli hanno una vasta gamma di proprietà come anti-cancerogeni, anti-tumorali, anti-invecchiamento ed effetti cardio-protettivi (Yang et al., 1997; Zern et al., 2005). Il resveratrolo (presente nel vino rosso), uno dei polifenoli più studiati riduce la neutrofilia del tessuto polmonare, che induce un modello d'infiammazione, con un meccanismo ancora sconosciuto (Birrell et al., 2005). La delucidazione di un tale meccanismo può dare nuove indicazioni sulle terapie per il trattamento dell'infiammazione cronica delle malattie polmonari (Culpitt et al., 2003). La curcumina (diferuloilmetano un polifenolo presente in curcuma), agente anti-infiammatorio usato nella medicina tradizionale, è stata indicata come modulatore di vari processi cellulari quali trasformazione, proliferazione, invasione, angiogenesi e metastasi (Aggarwal et al., 2003). Poiché i geni coinvolti in tali processi sono regolati da NF- κ B, è stato postulato che la curcumina inibisce la trans-attivazione di NF- κ B (Biswas et al., 2005). Inoltre la curcumina è stata indicata per la correzione dei difetti delle fibrosi cistiche inducendo la funzionalità della proteina DeltaF508 CFTR (Egan et al., 2004). Comunque, i risultati di questi studi contraddicono quelli di un altro gruppo di ricerca, che ha indicato che la curcumina non riesce a "salvare" DeltaF508-CFTR in colture cellulari ed in topi (Song et al., 2004). Similmente, sostanze come lo zenzero (dalle radici delle piante di zenzero), il ginkgolide B (un estratto da foglie dell'albero di Ginkgo-biloba), il sulforafano (da broccoli/verdure crucifere), il licopene (dai pomodori), il solfuro di diallile (da aglio), il fenetilestere dell'acido caffeico (da miele) e la capsaicina (dai peperoncini rossi) sono stati indicati per inibire NF- κ B e le citochine pro-infiammatorie (Surh et al., 2003). Da quando la curcumina è conosciuta inoltre stimolare l'espressione Nrf2, sembra che la funzione antiossidante di curcumina possa essere mediata via l'asse Nrf2-ARE-GCL. Di conseguenza la modulazione di MAPK, NF- κ B ed ARE da parte dei polifenoli non riflette solo le loro proprietà citoprotettive, ma questi composti possono avere anche un immenso potenziale farmacologico (Kong et al., 2001). Comunque, deve essere evidenziato che non tutti i polifenoli in tè o altrove hanno attività biologica analoga, i loro effetti dipendono dalle loro componenti strutturali. In più, i polifenoli possono essere più efficaci quando sono presenti nelle matrici dell'alimento.

I polifenoli quali la curcumina, il resveratrolo e la teofillina, che è un broncodilatatore, sono stati indicati per svolgere un ruolo nella rimodulazione di cromatina con la modulazione degli enzimi istone-acetilasi (HAT) e diacetilasi (HDAC) ed espressione conseguente del gene

d'inflammation nelle cellule epiteliali dei polmoni (Rahman et al., 2004). Studi hanno indicato che i polifenoli ristabiliscono le funzioni antinfiammatorie in risposta allo stress ossidativo del fumo della sigaretta per mezzo dell'attività regolatrice di HDAC nei monoliti / macrofagi (U₉₃₇) e nella linea cellulare MonoMac₆ (Rahman et al., 2004). Le possibili vie di segnalazione protette dai polifenoli e dai flavonoidi sono indicate schematicamente in Figura 4.

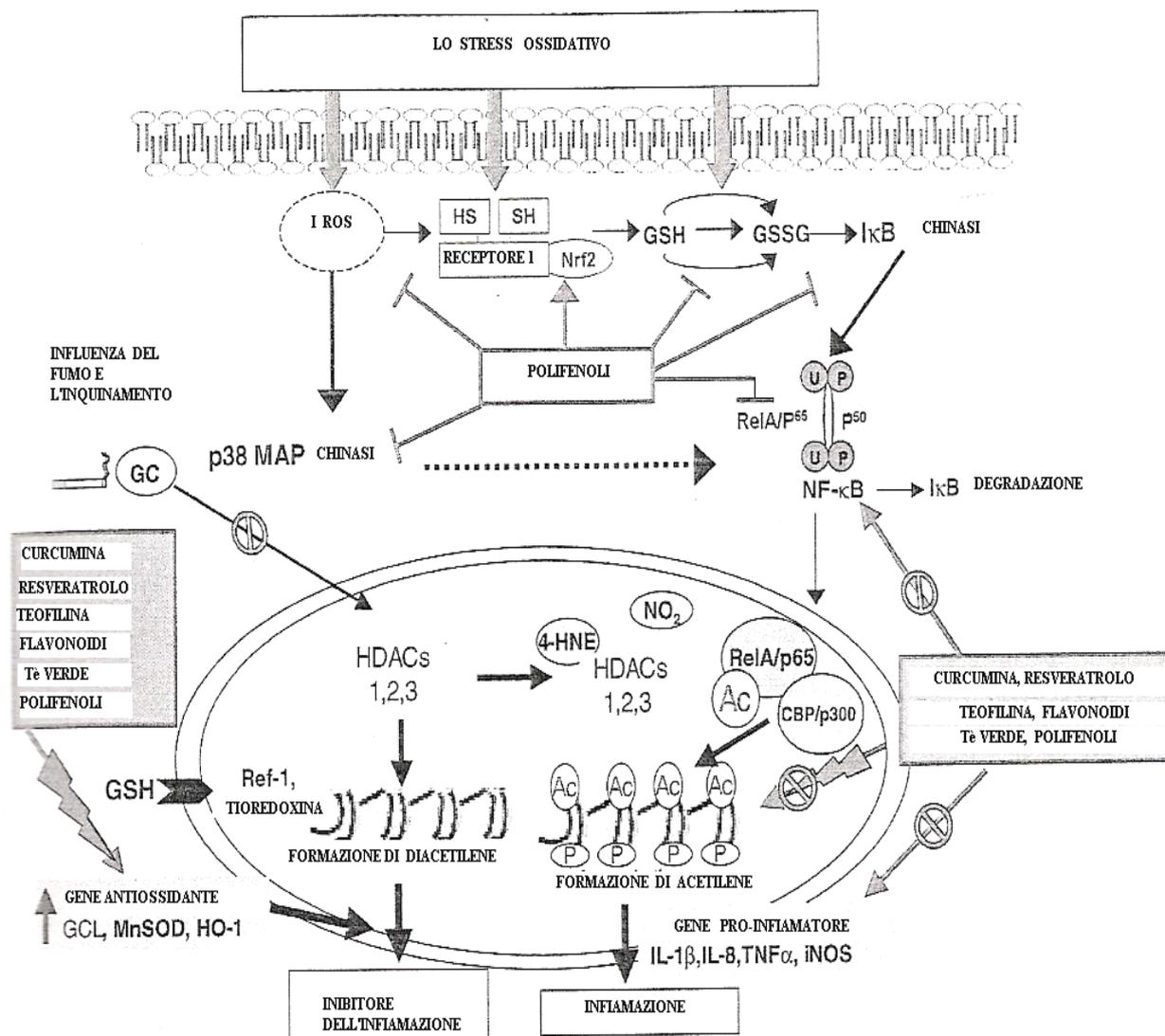


Figura 4: Possibili vie di segnalazione protette dai polifenoli e dai flavonoidi

2.8 L'alimento e l'espressione del gene

L'alimento è uno dei fattori più efficaci nella regolazione a vari livelli dell'espressione dei geni umani. L'interazione tra nutriente, gene e malattia è stata documentata per molte sostanze alimentari.

Le vitamine (tocoferolo, folato, biotina), i minerali (zinco) e i fito prodotti (flavoni, catechina) possono alterare l'espressione dei geni nelle colture cellulari.

Diversi meccanismi sono stati identificati attraverso i quali i nutrienti alterano l'espressione del gene. Questi includono (a) il diretto coinvolgimento nella sintesi del DNA (niacina), (b) la metilazione del DNA (acido folico), (c) i fattori di trascrizione (vitamina A), (d) l'alterazione del turnover di regolazione delle proteine e (e) l'alterazione della stabilità del mRNA (vitamina D).

Esempi di queste regolazioni genetiche sono numerosi (vedi Tab. 3).

| Classe | Esempi |
|---|--|
| Agenti che influiscono sull'attività metabolica, oppure promozione della disattivazione metabolica di carcinogenesi | Inibitori del citocromo P450 (costituenti del succo d'uva, aglio, prezzemolo, peperoncini). Alcuni composti, come sulforafano, inducono la II° fase enzimatica. |
| Lipossigenasi / cicloossigenasi / xantino ossidasi inibitrice | Alcuni flavonoidi ed altri composti fenolici. possono inibire questi enzimi in cellule del tratto gastrointestinale e forse in altri tessuti del corpo umano |
| Inibitore della proliferazione cellulare (meccanismo multiplo, compresa inibizione proteasica) | Resveratrolo, alcuni flavonoidi compresi i fenoli del tè verde, curcumina. Catechina riportata per il blocco del meccanismo dei folati. |
| Antagonisti di azione estrogenica nel promuovere la crescita di alcuni tumori | Isoflavonoidi, indoli-3-carbinoli |
| Inibitori di metastasi | Flavonoidi, inibiscono la matrice delle metalloproteinasi. Carotenoidi possono stimolare la comunicazione tra cellule nella trasformazione cellulare, diminuire il malessere |
| Inibitori di angiogenesi | Genisteina, epigallocatechina-gallato |
| Fibra | Aumenta rapidamente il movimento del colon; diluendo carcinogenesi e/o la loro lenta formazione |
| Stimolazione della risposta immunitaria | Carotenoidi |
| Restrizione calorica / bassa dose di grasso | Alta-dose di grassi in dieta, alto colesterolo in plasma, danno ossidativo-obesità. Dieta ricca in frutta e verdura, che hanno meno grassi, il contenuto di calorie tende ad abbassare il colesterolo nel plasma. |
| Selenio | Contenuto nelle piante. Ha effetto anti-cancerogeno. In alcuni studi sugli animali, sembra abbia stimolato un ruolo protettivo enzimatico. |
| Chelatori ferrici | E' stato dichiarato che un alto contenuto di ferro rappresenta un fattore di rischio per le malattie cardiovascolari. Fitati, altri fosfati organici e flavonoidi possono diminuire la dose di ferro o prevenire la quantità di ferro nella catena delle catalisi di reazioni redox. |
| Regolatori e modulatori dei fattori di trascrizione (es.NF-κB) inibitori di telomerasi. | Capsaicina, acido caffeico, esteri fenolici, resveratrolo, sulforafano, catechina |
| Risposta e sensibilità di recettori | Alcuni flavonoidi, luteina e curcumina possono sensibilizzare i recettori idrocarbonici per diminuire la tossicità delle diossine. |
| Fonte: | Journal of the Science of Food and Agriculture - 86:1992-1995 (2006) – <i>Perspective, Polyphenols: antioxidant treats for healthy living or covert toxins</i> |

Tabella 3: Potenziali effetti protettivi di antiossidanti contenuti nella dieta

Niacina è un precursore di NAD⁺, che a sua volta è un precursore di una polimerasi, la quale è direttamente coinvolta nella riparazione cellulare dei danni del DNA. L'acido folico contribuisce con il gruppo metilico alla conversione del dUMP in dTMP, un punto chiave durante la sintesi del DNA ed RNA. L'acido folico, inoltre, gioca un ruolo determinante nella metilazione del DNA contribuendo all'aggiunta di un gruppo metilico nella posizione 5' della citosina che precede una guanina entro la sequenza del DNA.

La metilazione si presenta nelle regioni ricche di C-G del DNA; quasi il 50% dei nostri geni hanno tali regioni. Quando i promotori ricchi di C-G sono metilati l'espressione dei geni è inibita. La metilazione del DNA è un meccanismo chiave per inibire molti geni coinvolti nel cancro, inclusi quelli per la regolazione del ciclo delle cellule. L'epigallocatechina gallato (EGCG), uno dei polifenoli del tè verde, è stato dimostrato essere un inibitore della metilazione del DNA ed attivatore di alcuni geni metilati-silenti nelle cellule del cancro umano del colon, esofago e prostata (Fang et al., 2003). L'ipometilazione del DNA, che può condurre all'espressione di geni altrimenti soppressi, è un requisito preliminare per proliferazione delle cellule del cancro. In individui alimentati con una dieta carente di folato è stata rilevata una ipometilazione di DNA (Rampersaud et al., 2000).

Recenti risultati hanno identificato che l'aggiunta di un singolo gruppo acetile ad una specifica lisina situata nell'istone 4 (H4) può prevenire la piegatura e mantiene il gene aperto in modo da consentirne l'espressione (Shogren-Knaak et al., 2006). L'istone acetilato con il DNA metilato potrebbe divenire una differenza significativa accumulata nel corso della vita dei gemelli monozigoti (Fraga et al., 2005).

Queste modulazioni epigenetiche potrebbero essere l'obiettivo per l'intervento di alimenti bioattivi.

Un altro meccanismo d'azione nutriente-gene è la capacità di alcuni nutrienti di legarsi con fattori di trascrizione, proteine che si legano a regioni promotrici di specifici geni e possono sia aumentare che inibire l'espressione del gene. Il legame di un nutriente ad un fattore di trascrizione può avere effetto sulla capacità del fattore di trascrizione a legarsi al DNA sia abilitando che disabilitando la trascrizione. Per esempio, i recettori dell'attivazione della proliferazione del perossisoma (PPARs), che sono fattori della trascrizione, hanno effetto sull'espressione dei geni connessi con il metabolismo degli acidi grassi e con le infiammazioni (Kliewer et al., 2001).

In un processo a più gradi che coinvolge il retinoide ed altri fattori della trascrizione, gli acidi grassi si legano al PPARs per creare un complesso che può legarsi al DNA. Ciò provoca la riduzione della sintesi di acidi grassi e l'aumento della ossidazione degli acidi grassi stessi.

Il PPARs inoltre controlla l'espressione di geni direttamente coinvolti nelle infiammazioni compreso NF- κ B e AP-1 (Blanquart et al., 2003). Il PPARs è implicato nella inibizione della induzione di citochina pro-infiammatoria.

La lista dei geni regolati dagli acidi grassi è vasta (Berger et al., 2002; Pégrier et al., 2004) ed include i geni addetti al trasporto, ossidazione e desaturazione degli acidi grassi, glicolisi, litogenesi e metabolismo lipoproteico (Roche et al., 2004). Topi alimentati con dieta ricca di ω -6 o ω -3 in eccesso alle richieste nutrizionali hanno dimostrato espressioni del cambiamento in oltre 300 geni.

Anche la stabilità del mRNA può essere alterata, riducendo quindi i livelli di proteina prodotti dai geni.

Una volta che è stato dimostrato che un estratto della pianta ha effetto sull'espressione del gene, è necessario isolare ed identificare il composto (o composti) bioattivo. La metodologia diretta del frazionamento è un metodo che può essere usato per testare frazioni di un estratto per determinare l'attività del gene d'espressione e l'identificazione dei composti bioattivi che sono responsabili della regolazione del gene. I ricercatori dell'Università di Rutgers, Facoltà di Medicina e Odontoiatria del New Jersey (UMDNJ, NJ, U.S.A.) hanno pubblicato le prime tecniche per selezionare gli estratti di pianta per i geni d'espressione (principalmente geni anti-infiammatori coinvolti nella malattia del cancro), usando culture cellulari umane (Ghai et al., 1999). (Dannenbergh et al., 2001), hanno selezionato quasi 1000 estratti vegetali in modo da identificare dei composti bioattivi capaci di modulare l'espressione del gene COX-2. Usando colture di cellule umane sono state identificate parecchie sostanze alimentari che possono regolare uno o più di questi geni, compresa la curcumina da curcuma, (Yamamoto et al., 1997) il resveratrolo dall'uva, (Surh et al., 2001) la catechina dal tè verde (Ahmed et al., 2002) e la teaflavina dal tè nero (Liu et al., 2003).

(Cavin et al., 2005) hanno visto che l'estratto delle radici di cicoria, legato alla presenza di lattoni del sesquiterpene, sopprime TNF- α in cellule umane. Gli estratti vegetali e i loro composti purificati hanno effetti terapeutici dovuti all'abilità selettiva di bloccare COX-2, che è indotto durante l'infiammazione e spesso causa il dolore, mentre conserva COX-I, un gene di controllo che, tra l'altro, protegge il rivestimento dello stomaco.

2.9 I nutrigenetici e l'intervento nutrizionale

I nutrigenetici, un sottogruppo di nutrigenomici, tentano di identificare le variazioni delle alleli umani che rispondono diversamente ai composti bioattivi. I nutrigenetici dimostrano una predisposizione individuale ereditaria alla malattia basata sulla modificazione genetica. Secondo un approccio nutrigenetico, le raccomandazioni di supplementi dietetici o le raccomandazioni dietetiche, sotto forma di alimenti “interi”, saranno fatte basandosi sulla priorità genetica dell'individuo. Esiste una ipotesi affascinante e quasi profetica, con esempi di nutrigenetici, in cui variazione genetica fra gli individui influenza le risposte dietetiche. (Ordovas et al., 2002) hanno dimostrato come una singola mutazione nel gene di APOA1 altera il modo in cui un individuo risponde all'effetto degli acidi grassi polinsaturi sui livelli di colesterolo (HDL). (Ordovas, Mooser, 2004) hanno rivisto gli studi che esaminano le interazioni dieta/genotipo responsabili del rischio cardiovascolare. (Kornman et al., 2004) hanno dettagliato un metodo nutrigenetico per il trattamento dell'infiammazione. I polimorfismi genetici sono apparentemente comuni fra i geni di citochine. Per esempio, le variazioni genetiche di IL-1 sono state accompagnate con le differenze interindividuali nei livelli di IL-1. Individui sono stati indicati variare nella capacità degli acidi grassi dell' ω_3 di sopprimere TNF- α (Grimble et al., 2002). L'infiammazione acuta è essenziale per la protezione dei nostri corpi contro l'infezione. Il trattamento del dolore e dell'infiammazione è realizzato soprattutto con farmaci antinfiammatori nonsteroidali (NSAIDs). La prova con uso di NSAID suggerisce un aumento del rischio cardiovascolare (Abramson, Weaver, 2005). Esiste la possibilità di utilizzare metodi nutrigenomici per sviluppare trattamenti alternativi o aggiunte dietetiche che potrebbero ridurre l'uso di NSAID per il trattamento continuo dell'artrite. (Nakamura et al., 2005) hanno studiato l'effetto degli acidi grassi di ω -3 su pazienti sottoposti ad interventi chirurgici a causa del cancro. I pazienti trattati con gli acidi grassi ω -3 hanno avuto la riduzione significativa dell'elastasi leucocita e di IL-8, mostrando una riduzione dell'infiammazione.

2.10 Definizione di Alimento Funzionale

Sono state date molte definizioni degli alimenti funzionali, ma quella che ha recentemente ottenuto il consenso scientifico generale è la seguente: "Un alimento può essere considerato «funzionale» se dimostra in maniera soddisfacente di avere effetti positivi su una o più funzioni specifiche dell'organismo, che vadano oltre gli effetti nutrizionali normali, in modo tale che sia rilevante per il miglioramento dello stato di salute e di benessere e/o per la riduzione del rischio di malattia.

- Gli alimenti funzionali devono comunque restare «alimenti» e dimostrare la loro efficacia nelle quantità normalmente consumate nella dieta. Gli alimenti funzionali non sono pillole o pastiglie ma prodotti che rientrano nelle normali abitudini alimentari."

L'importante azione concertata dell'Unione Europea denominata "Functional Food Science in Europe" (FUFOSE), coordinata dall'International Life Science Institute (ILSI Europe), ha indicato fondamentalmente due tipi di "health claims" per gli alimenti funzionali:

- claim correlati al "miglioramento di una funzione biologica": si richiede che la verifica dell'efficacia degli effetti funzionali dell'alimento sia basata su parametri o indicatori validati riconosciuti come idonei a dimostrare il miglioramento di una specifica funzione biologica;
- claim correlati alla "riduzione del rischio di malattia": si richiede che la verifica sia basata su parametri riconosciuti o indicatori convalidati in grado di rilevare i punti critici legati alle fasi di sviluppo (insorgenza) di una malattia, se non proprio alla malattia stessa.

Prendendo ad esempio le malattie cardiache, possiamo esaminare l'effetto dei componenti degli alimenti funzionali sugli indicatori di una migliorata funzione specifica, come, ad esempio, livelli più bassi di colesterolo nel sangue. Un esempio di indicatore della riduzione del rischio di malattia potrebbe essere la dimostrazione di un effetto benefico sull'occlusione delle arterie.

Riassumendo

(secondo il *consensus document*, FUFOSE-Functional Food Science in Europe)

- **non si assume sotto forma di pillola o compressa ma come parte del normale regime alimentare;**
- **influenza positivamente alcune funzioni del nostro organismo, migliorando il benessere e la salute o riducendo il rischio di malattie;**
- **i suoi effetti sono riconosciuti dalla comunità scientifica;**
- **esercita la sua funzione nelle quantità normalmente presenti in una dieta equilibrata.**

Punti di riferimento:

TIPO A: Miglioramento di una funzione biologica

TIPO B: Riduzione del rischio di malattia

Miglioramento di una funzione biologica

Claims che non fanno riferimento a patologie particolari, ma che sono correlati ad un miglioramento di:

Specifiche attività fisiologiche

Specifiche attività biologiche

Specifiche attività psicologiche

Esempio: alcuni oligosaccaridi non digeribili migliorano la crescita di una determinata flora batterica nell'intestino.

Riduzione del rischio di malattia

Claims che non fanno riferimento a patologie particolari ma sono correlati a:

Riduzione del rischio di una data malattia o stato patologico grazie a specifici nutrienti o non nutrienti contenuti nell'alimento "funzionale".

Esempio: il folato può ridurre in una donna le probabilità di avere un figlio affetto da spina bifida.

Esempio: il corretto apporto di calcio può contribuire a ridurre il rischio di osteoporosi nell'anziano.

Strategie di Sviluppo degli Alimenti Funzionali

Conoscenze scientifiche di base

Markers noti misurabili



Studi sperimentali

Ipotesi/meccanismi d'azione

Studi di intervento sulla dieta

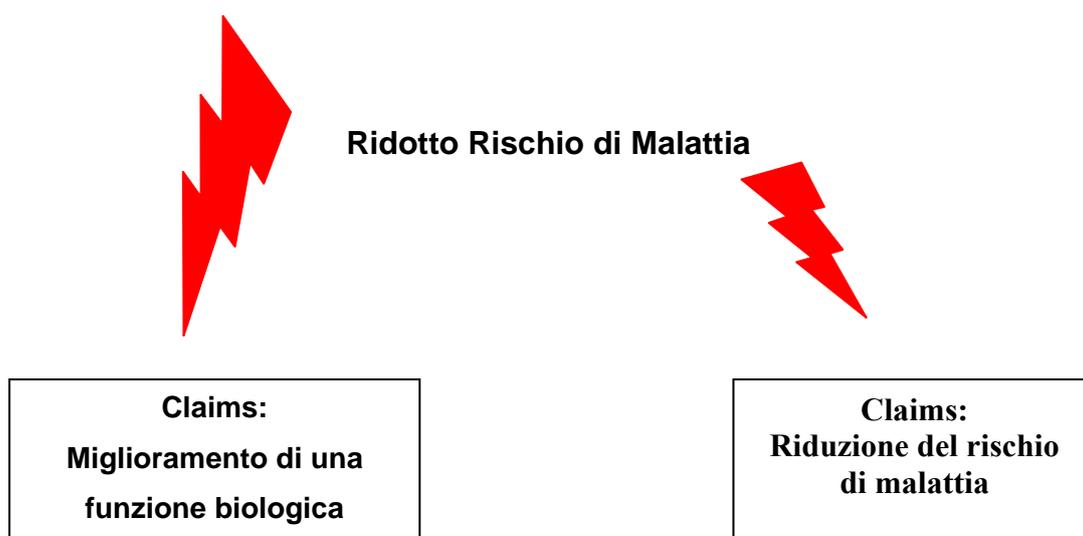
Markers per validare i Claims

Misura dei livelli del componente significativo nei distretti dell'organismo

Marker della funzione del bersaglio o della risposta biologica

Fattori intermedi indicativi di uno stato di benessere e/o riduzione del rischio di patologie

Aumentata Funzionalità del Target



3. SCOPO DELLA TESI

La valorizzazione dei sottoprodotti di origine vegetale, che molto spesso rappresentano un onere per l'industria che deve smaltirli, come fonte di composti funzionali da impiegare negli alimenti ha tutti i presupposti per essere un settore promettente, il cui cammino richiede certamente competenze multidisciplinari. In questa tesi di Dottorato si esamineranno diversi aspetti scientifici per rispondere alle seguenti prospettive:

- migliorare l'estrazione e il recupero di sostanze antiossidanti da scarti di origine vegetale come le vinacce;
- studiare l'attività esterasica in ceppi selvaggi di *Saccharomyces cerevisiae* presenti nella vinaccia e metterla in relazione con le forme polifenoliche esterificate dello stesso materiale vegetale;
- valutare in vitro l'attività antiossidante e antimicrobica di un estratto commerciale ad elevato titolo in catechine ottenuto dai vinaccioli;
- studiare la fattibilità di produrre pane surgelato funzionale, aggiungendo sostanze antiossidanti di natura fenolica ad azione antiradicalica ottenute dai vinaccioli.

Riguardo a questo ultimo punto è necessario puntualizzare che il settore degli alimenti funzionali è in rapida crescita e si basa sul riconoscimento del ruolo salutistico dei cibi. A questo risultato ha contribuito, come già precedentemente riportato, la ricerca scientifica, con diversi studi epidemiologici, dimostrando come gli antiossidanti derivati dalla dieta possano ritardare

significativamente o impedire l'ossidazione di lipidi e lipoproteine cellulari, reazioni considerate, secondo gli attuali orientamenti della medicina preventiva, strettamente legate ad aterosclerosi e rischio tumorale. Recentemente, gli estratti di vinaccioli sono diventati molto popolari come integratori alimentari in quanto sono costituiti da monomeri, oligomeri e polimeri del flavan 3-olo, con spiccate proprietà antiossidanti. Molti di tali composti ad attività antiossidante non solo vengono assunti singolarmente, ma l'industria alimentare li aggiunge a bevande ed alimenti in modo da mettere sul mercato nuovi prodotti funzionali, cioè che interagiscono positivamente con la salute del consumatore. Una categoria di prodotti funzionali in rapida crescita sono le bevande. Alcuni esempi sono una bibita a base di acqua, cranberry, estratto di rose, polifenoli da tè, amminoacidi e vitamine (Tecnologie alimentari, Nov./Dic. 2004); un infuso di tè verde anti-invecchiamento a base di foglie di tè verde (ricco di bioflavonoidi) e di Rooibos con bacche di sambuco (Tecnologie alimentari Sett. 2005) o gli yogurt da bere contenenti mirtilli (Tecnologie alimentari, Nov./Dic. 2005).

Il pane è uno dei prodotti alimentari più consumati in Italia (come fresco artigianale, industriale e congelato/surgelato) oltre che in molti altri paesi e il ruolo fondamentale ricoperto nella dieta può giustificare l'impiego come vettore di sostanze benefiche. Con questo obiettivo è stato posto in commercio un pane funzionale denominato PAN CEREALE prodotto dalla Klement's che tra i diversi ingredienti presenta anche olio e semi di girasole e di lino (Tecnologie alimentari, Sett. 2004); un pane prodotto negli USA con Omega 3 (Tecnologie alimentari Genn./Febbr.2006) e recentemente un pane arricchito con steroli vegetali denominato PANCOR (Tecnologie alimentari, Genn./Febbr. 2007). Nel panorama dei prodotti innovativi, ad oggi non risulta che sia stato posto in commercio un pane funzionale, arricchito di antiossidanti, congelato/surgelato. A questo proposito è necessario ribadire che la moderna distribuzione alimentare è un canale crescente nel mercato del pane e naturalmente quello industriale e congelato/surgelato mostrano una forte accentuazione di vendita (Industrie alimentari, Maggio 2007).

In questo contesto la ricerca alimentare si va affermando come elemento di miglioramento delle condizioni di vita, passando da un ruolo puramente "tecnico" per soddisfare i bisogni alimentari della popolazione a protagonista nella salvaguardia della salute della stessa.

Comunque la sicurezza del consumatore dovrà essere superiore a qualsiasi interesse economico ed ogni "rivendicazione" salutistica, più o meno palese, dovrà necessariamente essere supportata da evidenti basi scientifiche.

4. MATERIALI E METODI

Sottotitolo 1 e 4

Preparazione dell'estratto

100 g di pane (o vinaccia) sminuzzato si trattano con azoto liquido, affinché diventino farinosi. Si pongono in un sacchetto all'interno della camera dell'estrattore pneumatico, si aggiungono 500 ml di metanolo e si chiude accuratamente per evitare che entri aria. Si porta, poi, la pressione a 8 bar.

Dopo due ore l'estratto è pronto per le analisi. I parametri considerati sono:

- Peso iniziale del pane
- Volume finale d'estratto



Figura 5: Estrattore pneumatico a freddo solido-liquido (NM LAB/MA 500 CC Depurex, Italia)

Determinazione dei polifenoli totali

Ad 1 ml dell'estratto metanolico si aggiungono nell'ordine 0,5 ml di reattivo di Folin-Ciocalteu (Merck), diluito due volte con acqua deionizzata, e 5 ml di sodio carbonato (Na_2CO_3) al 10% contenente idrossido di sodio NaOH 1M.

Il bianco contiene 1 ml di metanolo tal quale, 0,5 ml di reattivo di Folin-Ciocalteu e 5 ml di sodio carbonato (Na_2CO_3) al 10% con idrossido di sodio NaOH 1M.

La reazione si protrae per 30 minuti a temperatura d'ambiente; il campione viene poi filtrato con filtro da 0,2 mm (Millex) ed analizzato allo spettrofotometro a 650 nm e 25°C.

Determinazione dell'attività antiradicalica con DPPH

A 0.5 ml di estratto si aggiungono 1 ml di soluzione DPPH.

Il bianco contiene 1 ml di soluzione DPPH e 0.5 ml di metanolo. La reazione era continuamente monitorata allo spettrofotometro a 520 nm per 16 minuti e a 25 °C. La capacità del campione di "scavenging" verso i radicali DPPH è dato da:

$$I_p = \frac{\text{assorbanza } t = 0 - \text{assorbanza } t = 16 \text{ min}}{\text{assorbanza } t = 0} * 100$$

Soluzione di DPPH: 2 mg DPPH (Sigma) sciolti in 40 ml metanolo assoluto.

Determinazione della componente fenolica mediante HPLC

I campioni sono stati analizzati con un HPLC 2700 Thermo-Finningar dotato di un detector UV 6000. I campioni ottenuti sono stati filtrati con filtri Whatman (PVDF 0,45µm) ed iniettati direttamente. La fase stazionaria era costituita da Colonna (Supelcosil TM-LC 18) e Precolonna (Pelliguard TM-LC 18), ambedue della Supelco, montate in serie. La fase mobile (1 litro) è costituita da n-butanolo (18ml) e acido acetico 50% (1,5ml). I diversi composti fenolici sono separati a temperatura ambiente (loop 20ul), flusso 1,2 ml/minuto, UV detector a 275nm. Ogni corsa aveva la durata di 30 minuti.

Per la curva di taratura sono stati utilizzati 9 standard diversi (ac. gallico, ac. protocatetico, ac. clorogenico, ac. α -idrossibenzoico, ac. vanilico, ac. siringico, ac. caffeico, ac. para-cumarico e

ac. ferulico) tutti della Sigma, singolarmente e in miscela. I picchi sono identificati in base al tempo di ritenzione.

Sottotitolo 2

Ceppi di lievito.

I ceppi di lievito sono stati isolati da uve di Prosecco della zona viticola di Conegliano (collezione di ceppi microbici, Dipartimento di Biotecnologie Agrarie).

I ceppi di lievito *Saccharomyces cerevisiae* sono:

P_{225,5}; P_{301,9}; P_{304,1}; P_{304,13}; S₄₁; S₄₇; P_{173,16}; P_{254,12}; P_{293,8}.

Conservazione dei ceppi di lievito

I ceppi sono stati fatti crescere prima su terreno liquido YPG (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucosio), la cultura viene successivamente centrifugata per 10 minuti a 6000 rpm (4500 x g) e il pellet risospeso in 3ml di terreno di crescita fresco, a cui si aggiunge 1ml di glicerolo all'80%. I ceppi così preparati sono stati conservati a -80°C in vials da 2ml.

Preparazione delle cellule

Partendo da una precoltura di 24 ore, viene effettuato un inoculo al 6% (v/v) in 100ml di mezzo di coltura YPG. Dopo 72 ore di incubazione il mezzo di crescita è centrifugato a 6000 rpm (4500 x g) in centrifuga Centrikon T-124 per 10 minuti a 4°C. Il pellet è stato risospeso in acqua distillata e centrifugato per tre volte.

Preparazione degli sferoplasti

La procedura adottata ricalca nei suoi punti essenziali quella riportata da Rose et al., 1988; Serrano, 1988). Sono state eseguite alcune modificazioni per quanto riguarda il mezzo isotonic impiegato per la lisi, la cui molarità è stata aumentata per adattarla alle migliori condizioni richieste dai ceppi presi in esame.

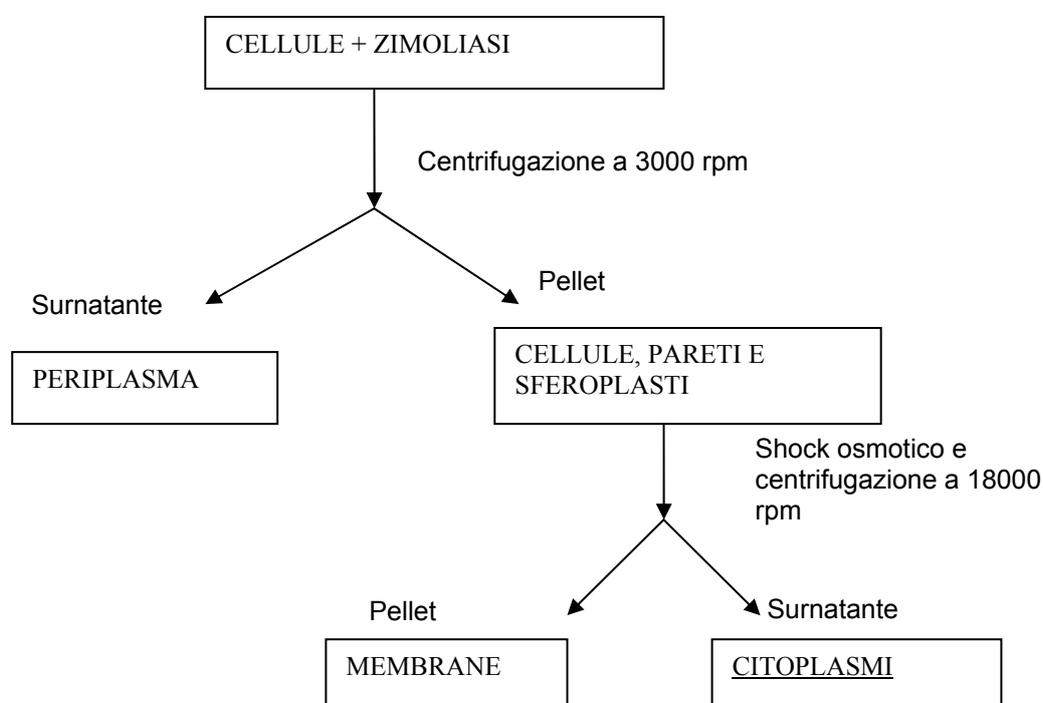
Le cellule sono state risospese (1:1) (p/v) in tampone 50mM Tris glicina pH 7,5, 10mM MgCl₂, 1,5M di sorbitolo e 30mM DTT (ditiotreitolo). Dopo essere stata incubata per 15 minuti a temperatura ambiente, la sospensione cellulare è stata centrifugata a 6000 rpm in centrifuga Centrikon T-124 con rotore A6.9 per 10 minuti a +4°C. Il pellet recuperato, è stato risospeso

(1:3) (p/v) in un tampone costituito da 50mM di Tris-HCl pH 7,5, 10mM MgCl₂, 1,5M sorbitolo e 1mM DTT, a cui vengono aggiunti 0,3mg/ml di Zymoliase (da *Arthrobacter luteus*, 100000u/g, Biomedicals). Il tutto è tenuto in bagno termostato per 2 ore a 37°C in agitazione.

Preparazione delle frazioni cellulari

Gli sferoplasti vengono centrifugati a 6000 rpm con centrifuga Centrikon T-124 per 10 minuti a 4°C. Il supernatante di questo primo passaggio costituisce la “frazione periplasmatica” o come dice (Soumalainen, 1981) “frazione di parete cellulare digerita”. Il pellet è stato recuperato e risospeso (1:25) (p/v) in un tampone di lisi isotonic costituito da 12mM Tris-HCl pH 7,5, 96mM Glicina ed agitato vigorosamente per alcuni minuti. Il lisato cellulare, denominato “frazione citoplasmatica”, è stato ottenuto con due centrifugazioni successive, entrambe a 6000 rpm per allontanare le frazioni non lisate. Si è poi provveduto alla liofilizzazione degli estratti ed alla misurazione della proteina secondo la procedura di (Bredford, 1976) utilizzando sieroalbumina bovina come standard di riferimento.

Rappresentazione schematica del processo di digestione della parete cellulare della cellula di lievito.



Attività esterasica

L'attività esterasica è stata determinata spettrofotometricamente secondo le procedure di seguito riportate (Bardi et al., 1993; Lomolino et al., 2003).

Preparazione del substrato

Il substrato è stato preparato sciogliendo 20mg di estere β – naftil - acetato, - propionato, - butirrato, - laurato, -miristato, - palmitato e -stearato (Sigma - Aldrich), in accordo con (Bardi et al., 1993). (Sigma) in 1ml di Triton X-100, soluzione 10% in acqua.

Saggio spettrofotometrico

In cuvette da 2,5ml sono stati posti 50 μ l di substrato, 1900 μ l di tampone TBS 1M pH 7,5 (tris buffer saline) e 50 μ g di estratto proteico; il bianco è stato preparato con gli stessi tamponi sostituendo con acqua l'estratto proteico.

Dopo aver letto i valori di assorbanza al tempo zero, si è provveduto ad incubare i campioni in bagno termostato a 37°C per 2 ore.

Ai campioni sono stati addizionati di 200 μ l di una soluzione di Fast Blue BB Salt (Fluka) alla concentrazione di 2mg/ml; il tutto è stato mantenuto a 25°C, per 15 min. Le analisi sono state effettuate spettrofotometricamente a 400 nm con spettrofotometro JASCO 7800 UV/VIS.

I risultati sono la media di sei esperimenti e sono espressi come unità di assorbanza (OD₄₀₀).

Elettroforesi in condizioni native (N-PAGE)

E' stato utilizzato l'apparato elettroforetico Miniprotean (Biorad) con un gel di poliacrilamide all'8,5% di dimensioni 8x6x0,1 cm e come tampone Tris-Glicina (25mM Tris e 192mM Glicina). Alle frazioni citoplasmatiche (20 μ g di estratto per ogni pozzetto) è stato aggiunto glicerolo al 10% per appesantire il campione. Le corse sono state eseguite ad un voltaggio costante di 70V. Dopo la corsa i gel sono stati trattati per valutarne l'attività enzimatica (come di seguito riportato).

Zimogrammi dell'attività esterasica per mezzo di fluoresceina diacetato

Dopo aver terminato la corsa elettroforetica, il gel è stato immerso in tampone fosfato 0,1M pH 7,5 in presenza di fluoresceina diacetato (1mg/ml di tampone). Dopo circa 10 minuti di agitazione a 37°C, sono comparse sullo zimogramma le bande relative all'attività esterasica del citoplasma.

5 SOTTOTITOLO 1: UN APPROCCIO ALLA VALORIZZAZIONE DELLA VINACCIA ESAUSTA

La valorizzazione dei sottoprodotti dell'industria alimentare rappresenta un'opportunità per il mantenimento dell'equilibrio ambientale, ma può diventare economicamente conveniente, nonostante i costi necessari per il recupero degli scarti, qualora se ne ricavano composti bioattivi da utilizzare come ingredienti funzionali.

A questo proposito, durante il processo di trasformazione dell'uva in vino, solo una limitata porzione della frazione fenolica viene trasferita al mosto, mentre, la maggior parte rimane nei residui della vinificazione, le vinacce. In Italia, queste sono tradizionalmente impiegate nella produzione di grappa (EC 1576/89), tipico distillato di grande importanza storica, culturale e commerciale. Dopo il processo di distillazione che può essere effettuato in sistemi continui o discontinui, la vinaccia "esausta" ritorna ad essere un residuo del ciclo produttivo, utilizzabile nell'alimentazione del bestiame o come combustibile.

L'estrazione con solventi è il metodo più frequente per isolare gli antiossidanti; sia la resa di estrazione che l'attività degli estratti sono fortemente legati al tipo di solvente utilizzato in quanto composti con differente polarità hanno potenziale antiossidante diverso. A questo riguardo i fenoli vegetali manifestano una considerevole diversità in termini di acidità e di polarità, mostrando sia caratteri idrofobici che idrofilici.

Questo aspetto deve essere particolarmente valutato durante l'estrazione, ad esempio controllando il pH. La situazione è particolarmente complessa nel caso delle antocianine, molto sensibili a questo fattore.

Da tali presupposti, considerate le caratteristiche dei sistemi alimentari, risulta necessario effettuare studi comparativi per selezionare il miglior solvente da impiegare nell'estrazione su uno specifico alimento.

Sono state utilizzate vinacce di uva Raboso Piave e l'estrazione è stata effettuata con 5 differenti formulazioni di solvente, mentre l'efficienza di estrazione, prima di sottoporre la vinaccia a distillazione e dopo che vi è stata sottoposta, è stata determinata misurando la concentrazione in polifenoli totali e l'attività antiradicalica dei diversi estratti.

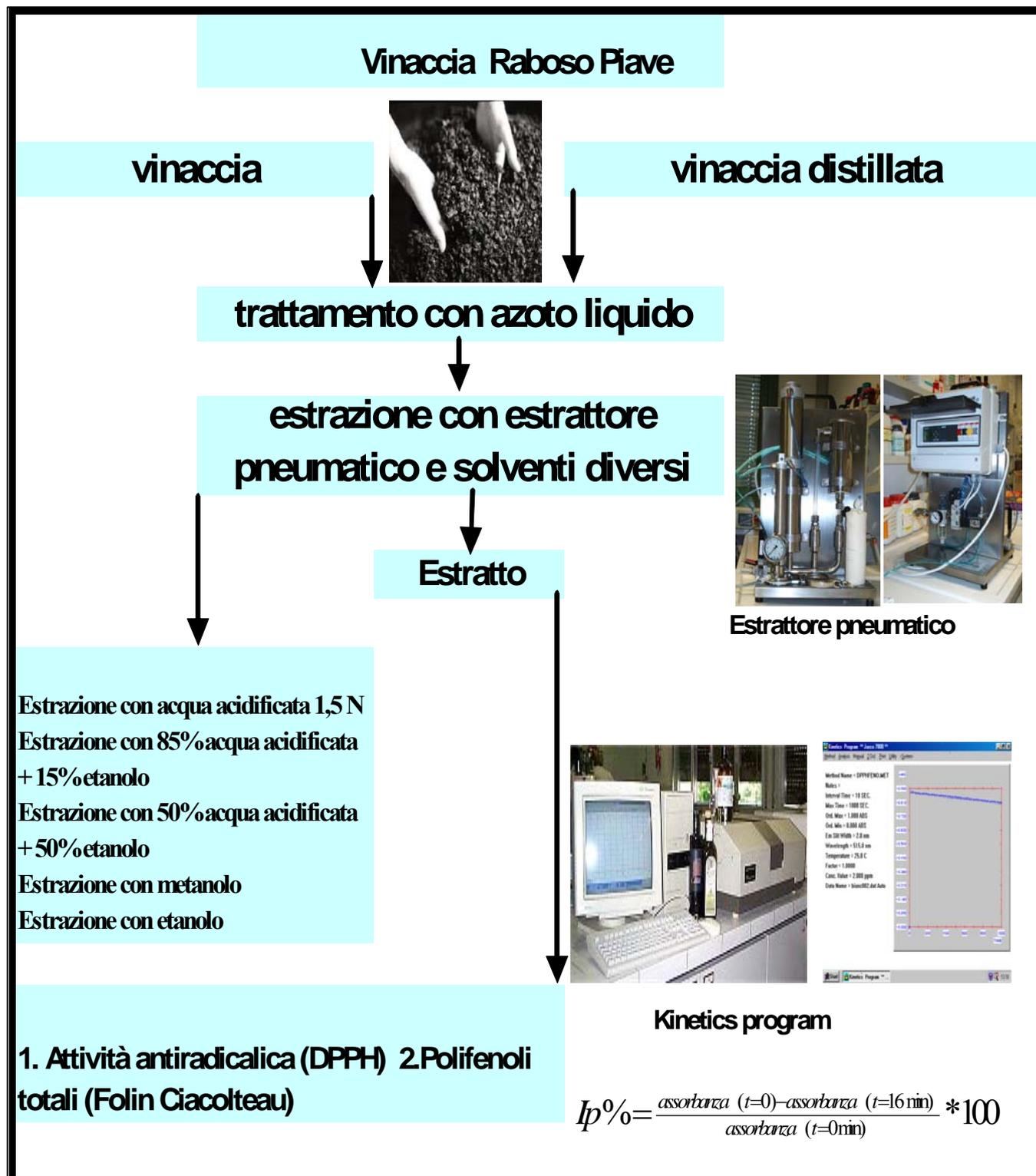


Figura 6: vinacce di uva Raboso Piave

Solventi utilizzati:

- 100 % Acqua acidificata 1,5 N (HCl 36%)
- 100 % Metanolo
- 100 % Etanolo
- 85 % Acqua acidificata 1,5 N e 15 % Etanolo
- 50 % Acqua acidificata 1,5 N e 50 % Etanolo

Schema del processo di estrazione



Risultati e discussione

| Attività antiradicalica(%) degli estratti di vinaccia prima e dopo la distillazione | | |
|--|----------|---------------------|
| Solventi di estrazione | Vinaccia | Vinaccia distillata |
| Acqua acidificata 1.5 N | 76 | 85 |
| 85 % acqua acidificata 15 % etanolo | 79 | 89 |
| 50 % acqua acidificata 50 % etanolo | 73 | 87 |
| metanolo | 83 | 89 |
| etanolo | 56 | 84 |

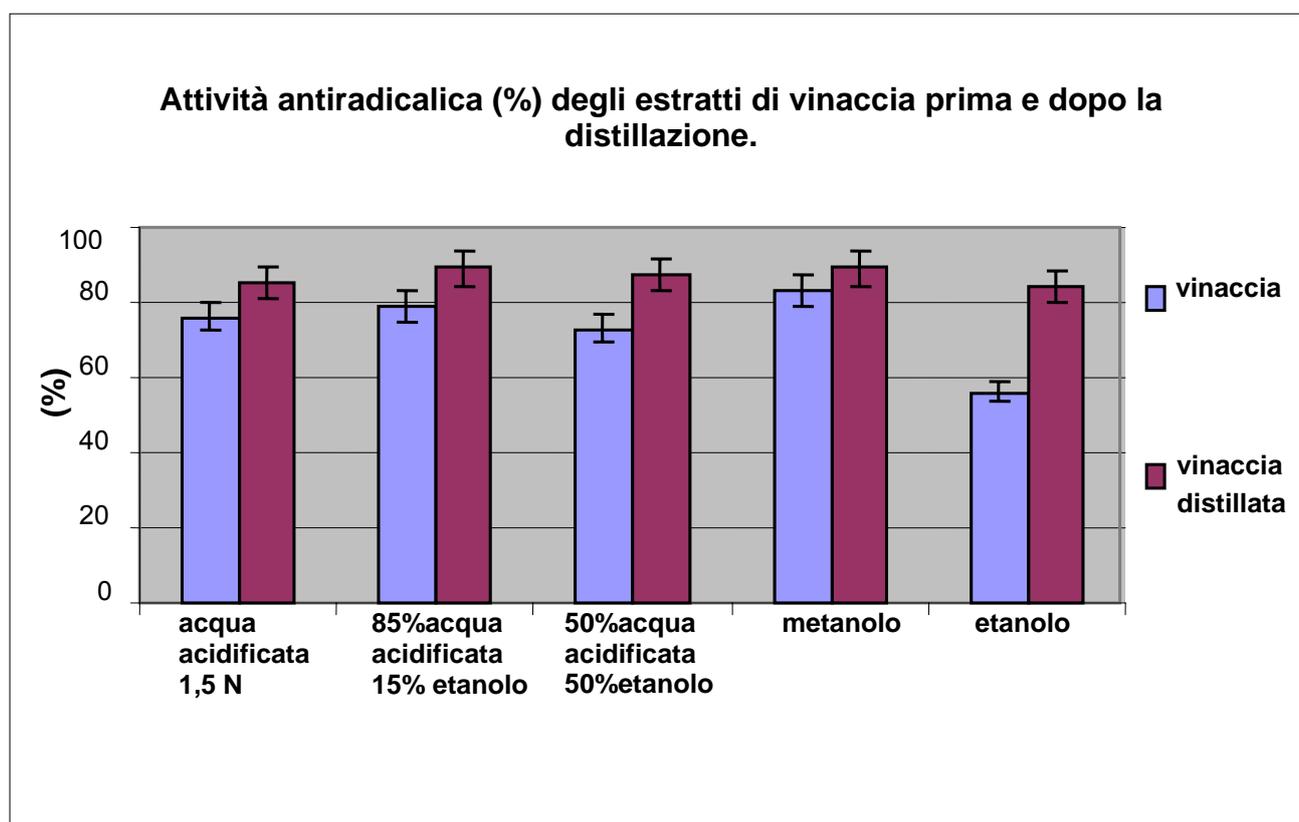


Figura 7: Attività antiradicalica (%) della vinaccia di uva Raboso Piave prima e dopo distillazione.

| Polifenoli totali (mg/l) degli estratti di vinaccia prima e dopo la distillazione | | |
|---|----------|---------------------|
| Solventi di estrazione | Vinaccia | Vinaccia distillata |
| Acqua acidificata 1.5 N | 141 | 200 |
| 85 % acqua acidificata 15 % etanolo | 143 | 187 |
| 50 % acqua acidificata 50 % etanolo | 166 | 224 |
| metanolo | 141 | 197 |
| etanolo | 138 | 177 |

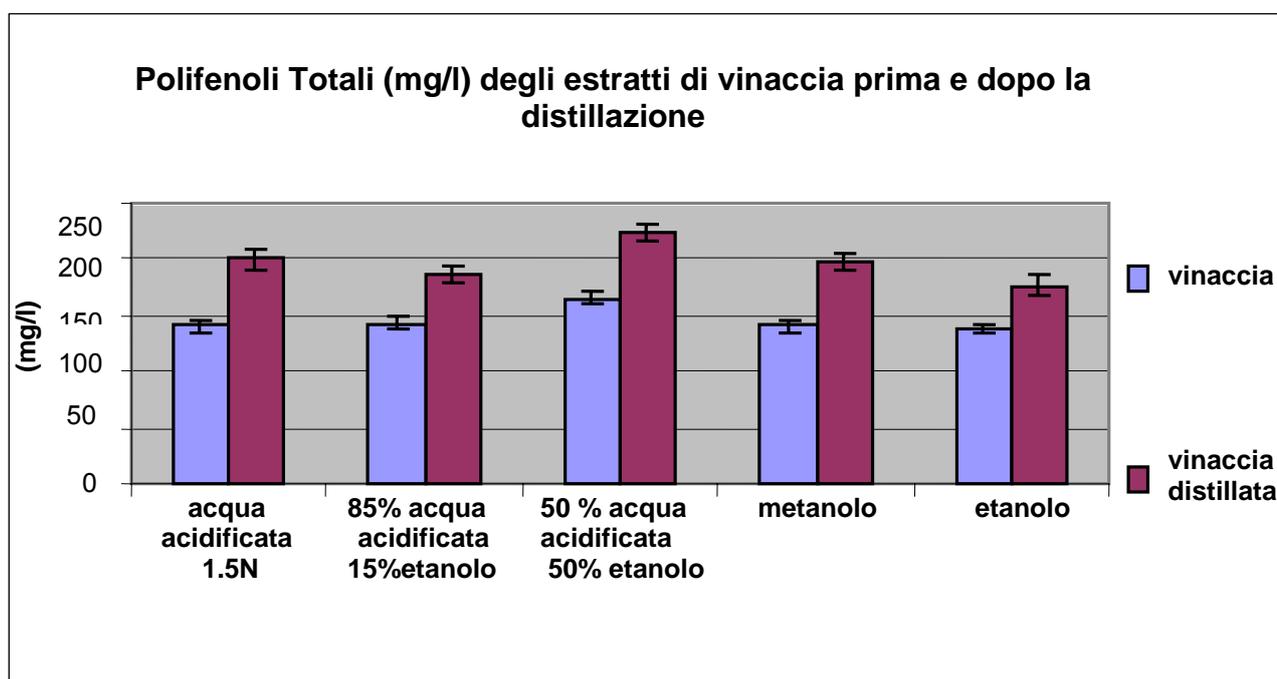


Figura 8: Polifenoli totali (mg/l) nella vinaccia di uva Raboso Piave prima e dopo distillazione

Sulla base dei risultati ottenuti si può osservare che le vinacce “esauste” contengono ancora apprezzabili quantità di polifenoli ad elevata attività antiossidante, superiori alle stesse prima della distillazione, quasi certamente per l’azione lisciviante dell’acqua calda durante il processo distillativo.

L’attività antiradicalica più alta è presentata dall’estratto ottenuto con il solvente monocomponente metanolo da vinacce prima e dopo distillazione, anche se in questo ultimo caso acqua acidificata (85%) ed etanolo (15%) mostrano lo stesso valore percentuale (Fig.7). Per quanto riguarda la resa in estrazione in termini di polifenoli estratti l’acqua acidificata è leggermente superiore sia alla miscela acqua acidificata (50%) ed etanolo (50%) che al metanolo (Fig.8), a differenza, quindi di Autori (Yilmaz, Toledo, 2006) secondo i quali i solventi

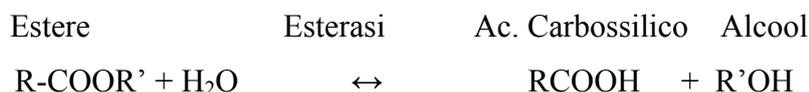
monocomponenti hanno rese inferiori. Abbiamo, però, evidenziato che il solvente composto solo da acqua acidificata svolge un notevole effetto ossidante sulle attrezzature che ne sconsigliano perciò l'uso. Nel caso del metanolo, poi, è fondamentale ricordare che può causare notevoli danni all'organismo umano ed è vietato dalla legge. In conclusione tra le formulazioni di solventi testati, la combinazione di acqua acidificata ed etanolo sembra rappresentare una buona soluzione anche in termini economici.

6 SOTTOTITOLO 2: STUDIO DELL'ATTIVITÀ ESTERASICA IN CEPPI SELVAGGI DI SACCHAROMYCES CEREVISIAE E SUA RELAZIONE CON I POLIFENOLI ESTERIFICATI

Dalla letteratura si conosce che i polifenoli presenti nelle vinacce come in molte altre fonti vegetali mostrano forme esterificate. Ci si è posti il problema se si poteva modificarne la struttura utilizzando enzimi esterasici dei lieviti presenti nella stessa vinaccia.

Le esterasi sono molto diffuse tra gli organismi viventi e, studiando i genomi, sono stati sequenziati numerosi geni che codificano per questi enzimi. Inoltre, forme isoenzimatiche con attività esterasica sono spesso utilizzate come strumento di identificazione e caratterizzazione di ceppi diversi dello stesso microrganismo (Campbell et al., 1972). Le esterasi appartengono alla classe delle idrolasi, in quanto catalizzano l'idrolisi del legame estere in presenza di una molecola d'acqua.

La reazione è reversibile e ha come prodotti un alcol aromatico o alifatico, monossidrato o polissidrato e un acido organico o inorganico come il fosforico (Delfini et al., 1994, Dell'Oro et al., 1992).



Gli enzimi esterasici sono tecnologicamente interessanti in quanto contribuiscono alla determinazione delle caratteristiche olfattive del prodotto fermentato.

Diverse sono le ipotesi formulate sul significato fisiologico delle esterasi nel lievito, ma quella più accreditata le vede coinvolte nella sintesi di esteri e nella riduzione della concentrazione di acidi grassi nella cellula per portarli al di sotto del livello di tossicità; è proprio nel metabolismo

degli acidi grassi che risulterebbe essere il ruolo più importante di tali enzimi. Essi parteciperebbero infatti ad un doppio meccanismo di sintesi-idrolisi degli esteri aumentandone la concentrazione o liberando acidi grassi quando necessario. Tuttavia, dai risultati contrastanti presenti in letteratura, non è stato ancora chiarito se l'attività esterasica si espliciti più verso la sintesi o l'idrolisi (Bardi et al., 1992; Schermes et al., 1976; Bardi et al., 1993).

Per unificare le diverse ipotesi è stato proposto un modello in cui l'esterasi avrebbe il ruolo di equilibrare la frazione libera ed esterificata degli acidi grassi (Howard, 1976).

I lieviti producono soprattutto esteri di acidi carbossilici a corta catena (Bardi et al., 1993; Parkkinen et al., 1982). Tali sostanze vengono liberate maggiormente durante le prime fasi della fermentazione alcolica e sono presenti in concentrazioni talmente basse, se considerate singolarmente, da non superare la soglia olfattiva; le più conosciute sono l'acetato di etile e isobutile; il caproato, il caprato, il butirrato ed il valerato di etile. (Bardi et al., 1992). Mentre il primo è responsabile dell'odore acetoso, l'acetato di isoamile, isobutile e gli esteri degli acidi caproico, caprilico e caprico conferiscono la nota di fruttato alle bevande alcoliche. La sintesi degli esteri dell'acido acetico è un processo che richiede energia, fornita dall'acetil CoA e la catalisi enzimatica dell'alcool acetil transferasi (AATFase), mentre la sua idrolisi coinvolgerebbe le esterasi; il rapporto tra attività AATFase ed esterasi regolerebbe anche la presenza e la concentrazione dell'isoamil acetato (Dubourdiu et al., 1987; Ness et al., 1993; Delfini et al., 1994).

Per meglio conoscere i meccanismi d'azione di tali enzimi sui substrati o sui precursori aromatici, alcuni studiosi hanno distrutto i geni EST1-4 delle esterasi, attive nei confronti degli esteri dell'acido acetico. L'assenza di tali geni in lieviti utilizzati nella fermentazione del Sakè ha consentito l'accumulo di esteri odorosi di un certo pregio (Delfini et al., 1994).

Comunque, se da una parte le esterasi sono in grado di ridurre il contenuto di acetato di etile, dall'altra possono anche degradare le sostanze aromatiche provocando la perdita di profumi durante la fermentazione e nella fase di conservazione. Si è visto, infatti, che la presenza di questi esteri tende a regredire nel tempo, con conseguente decadimento qualitativo del prodotto e che gli enzimi idrolasici dei lieviti sono i maggiori responsabili di tale riduzione (Bardi et al., 1992).

Le esterasi di *Saccharomyces cerevisiae* sono state studiate con prove di attività *in vitro*, utilizzando cellule intere o frazioni cellulari per valutarne l'affinità nei confronti degli esteri sintetici di acidi carbossilici da due a diciotto atomi di carbonio. Dai risultati ottenuti (Bardi et al., 1992; Scherme et al., 1976; Suomalainen, 1981; Parkkinen et al., 1982;) è emerso che la presenza di queste attività enzimatiche ed il loro livello di espressione sono una caratteristica del

ceppo di appartenenza. Alcuni lieviti da panificazione non manifestano affinità per l'acetato di etile mentre in altri è risultata rilevante, come pure è stata segnalata (Parkkinen et al. 1982) una maggiore affinità per gli esteri dell'acido caproico caprilico e caprico. Si spiegherebbe così l'elevata concentrazione nelle bevande alcoliche di questo estere che insieme all'isoamilacetato e al fenilacetato non verrebbe idrolizzato.

Nel vino questi enzimi possono essere rinvenuti anche in seguito all'uso di certi enzimi industriali quali le pectinasi, prodotte a partire da colture di *Aspergillus niger* che presentano attività cinnamil esterasica e quindi possono avere un effetto sui polifenoli. Questo enzima catalizza l'idrolisi degli esteri tartarici degli acidi idrocinnamici nel mosto durante la fase di pre-fermentazione. Gli acidi ferulico e *p*-cumarico sono poi convertiti in vinil-fenolo durante la fermentazione alcolica in seguito all'attività cinnamato decarbossilasi del *Saccharomyces cerevisiae*.

Uno studio condotto sulle esterasi presenti nei preparati pectolitici, prodotti a partire da *Aspergillus niger*, ha identificato tre enzimi diversi (Barbe, 1995):

1. cinnamato esterasi: idrolizza gli esteri dell'acido cinnamico, come l'acido clorogenico, l'etil cinnamato e gli esteri dell'acido tartarico.
2. Depsidasi: è specifica per i legami estere tra due anelli fenolici (es. acido digallico).
3. Fenil esterasi: idrolizza gli esteri tra acido fenolico (serie benzoiche) e gli alcoli alifatici, come il metil gallato.

In passato, alcuni effetti indesiderati legati all'uso di preparati pectolitici sulle caratteristiche aromatiche del vino erano attribuiti alla depsidase che riduce la concentrazione degli esteri cinnamoiil tartrato nel mosto. Questi composti contribuiscono alle note fruttate (aromi freschi) dei vini bianchi.

I difetti olfattivi dei vini sono legati all'attività cinnamato esterasi che idrolizza gli esteri dell'acido tartarico. Questi enzimi non hanno conseguenze dirette in quanto i composti che si liberano dalla loro idrolisi non hanno alcun impatto organolettico alle concentrazioni presenti nel vino. Tuttavia, gli acidi cinnamici rilasciati da questo enzima aumentano la concentrazione di vinil fenolo in seguito all'azione delle cinnamato decarbossilasi prodotte dai lieviti. Il vinil fenolo è responsabile di difetti olfattivi.

Anche l'uva presenta attività esterasica localizzata in diverse parti della bacca. Attualmente l'enzima è stato studiato per caratterizzare le varietà di *Vitis vinifera* (Zocca et al., 2006) e la sua distribuzione a livello della buccia, dei vinaccioli, della polpa, delle foglie e delle gemme (de Oliveira C. et al., 2005), mentre non esistono approfondimenti sul ruolo fisiologico e l'importanza tecnologica delle esterasi dell'uva.

6.1 Il citoplasma della cellula di *Saccharomyces cerevisiae*

Tra la membrana plasmatica e quella vacuolare si trova il citoplasma, costituito da una soluzione, il citosol, (pH tra 5 e 6) e gli organelli, separati dalla fase acquosa per mezzo di membrane. Il citosol contiene gli enzimi solubili coinvolti nella glicolisi e nella fermentazione alcolica oltre al glicogeno, la principale riserva glucidica del lievito, e ribosomi liberi. Al microscopio elettronico il citoplasma presenta numerose formazioni membranose che si estendono dalla membrana nucleare a quella plasmatica. Questo complesso sistema di membrane rappresenta il reticolo endoplasmatico, una struttura molto ripiegata su cui si trovano i ribosomi coinvolti nella sintesi proteica. A differenza dei ribosomi liberi che rilasciano nel citosol le proteine sintetizzate, quelli legati al reticolo endoplasmatico le destinano al vacuolo, alla membrana plasmatica o all'ambiente esterno. La presenza dei ribosomi indica che le proteine sono in fase di attiva sintesi sulla superficie endoplasmatica del reticolo, il quale poi modifica i prodotti proteici e li smista nei vari compartimenti cellulari (Lewin, 1998).

Tra il reticolo e la membrana endoplasmatica si trova l'apparato del Golgi costituito da una serie di singoli foglietti membranosi, compattati ed impilati che formano le cisterne (Lewin, 1998). Ognuna di queste rappresenta una struttura chiusa e separata circondata da un'unica superficie membranosa. L'apparato del Golgi è dotato di polarità: la faccia *cis* è associata al reticolo endoplasmatico, quella *trans* è rivolta verso la membrana plasmatica. Le proteine modificate all'interno del reticolo endoplasmatico, entrano nel Golgi attraverso la faccia *cis*, subiscono ulteriori modificazioni, in particolare la glicosilazione mentre vengono trasportate verso la faccia *trans* e da qui escono (Lewin, 1998).

Il vacuolo è un organello sferico, di 0.3-3 μ m di diametro, circondato da una singola membrana. Il numero di vacuoli varia con la fase cellulare in cui si trova il lievito, infatti può essere uno prima della gemmazione oppure numerosi e piccoli durante la fase riproduttiva. Il vacuolo oltre a rappresentare una riserva di metaboliti contiene numerose idrolasi specialmente proteasi che rivestono un ruolo essenziale nel *turn-over* delle proteine cellulari. Queste sono coinvolte anche nell'autolisi della cellula dopo la sua morte ed assumono importanza tecnologica nell'invecchiamento dei vini bianchi *sur lee* (Ribèreau-Gayon et al., 2000).

Il mitocondrio è un organello di forma sferica o allungata circondato da due membrane, una esterna ed una interna molto ripiegata che delimitano due compartimenti: la matrice e lo spazio interno. I mitocondri sono gli organi della respirazione della cellula eucariota; il lievito ne contiene fino a 50 in condizioni aerobiche mentre sono quasi assenti in quelle anaerobiche.

Come le altre membrane cellulari quelle mitocondriali sono costituite da un doppio strato lipidico e da proteine. Quella esterna risulta più permeabile e permette il passaggio di molecole di PM

minore di 10000 Da mentre quella interna, formata da numerosi ripiegamenti, è sede di enzimi coinvolti nella respirazione e nella produzione di ATP mentre nella matrice sono presenti le attività enzimatiche preposte all'ossidazione dei composti organici, in particolare, quelli del ciclo dell'acido citrico.

Il nucleo del lievito è di forma sferica, misura 1-2 nm ed è avvolto da una doppia membrana collegata al reticolo endoplasmatico. Presenta numerosi pori che permettono il passaggio di piccole proteine dal nucleo al citoplasma. Contrariamente a ciò che si verifica durante la mitosi degli eucarioti superiori, l'involucro nucleare del lievito non viene disperso.

6.2 Risultati e Discussione

La caratterizzazione e la classificazione dei lieviti si basa essenzialmente sui dati forniti dagli studi del DNA e dei caratteri fenotipici convenzionali. Tuttavia, anche lo studio di enzimi, quali le esterasi, per mezzo di tecniche spettrofotometriche ed elettroforetiche, ha fornito ulteriori informazioni utili per caratterizzare i lieviti sia sotto il profilo tassonomico che tecnologico. In particolare, le tecniche spettrofotometriche permettono di studiare le esterasi dal punto di vista dell'affinità, espressa in termini quantitativi, verso gli esteri che idrolizzano. Invece, le tecniche elettroforetiche permettono di eseguire studi qualitativi su questi enzimi che, a differenza di altri, presentano un grande polimorfismo, che consente una più facile identificazione, caratterizzazione e selezione dei ceppi di lievito.

In questo studio si è voluto caratterizzare il citoplasma di 9 ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* isolati da vinacce di Prosecco della zona di Conegliano. La quantificazione della proteina, presente in questa frazione subcellulare, ci ha permesso di evidenziare alcune differenze tra i 9 lieviti studiati (Fig.9). In particolare, ad eccezione dei 2 ceppi P225,5 e P304,1, che presentano un contenuto proteico superiore ai 400µg/mg di estratto di citoplasma liofilizzato ed il ceppo P254,12, che contiene una quantità inferiore ai 300µg/mg, gli altri 6 presentano valori compresi tra i 300 e i 400µg/mg. Tuttavia, come si evince dalla Figura 9, la differenza tra i 9 ceppi, espressa in concentrazione proteica del citoplasma, è piuttosto irrilevante. Questa bassa variabilità tra i 9 lieviti è evidenziata anche dal valore del coefficiente di variazione (C.V.) che è pari al 15% calcolato su un contenuto medio di proteina pari a 365 µg/mg di liofilizzato.

I lieviti sono stati caratterizzati, quantitativamente e qualitativamente, sotto il profilo della loro attività esterasica. E' noto, infatti, che le esterasi manifestano diversa affinità nei confronti di vari esteri sia sintetici che naturali. In particolare, in questo studio, la determinazione dell'attività è stata eseguita per mezzo di substrati cromogeni quali gli esteri del naftolo e fluorescenti quali quelli della fluoresceina che risultano più semplici da utilizzare e sensibili rispetto agli esteri

presenti in natura. In Figura 10 sono riportati i grafici (A, B, C, D, E, F e G) dell'attività esterasica presente nel citoplasma dei 9 ceppi, rilevata per mezzo di 7 esteri sintetici del naftolo esterificato con acidi grassi a catena di atomi di carbonio da C2 a C18 (vedi materiali e metodi). Come si evince dalla Figura 10, i 9 campioni presentano maggiore affinità verso il 2-naftil acetato (Fig. 10, A), espressa dai valori della densità ottica (D.O.), rispetto agli altri substrati. Ciò è in accordo con quanto riportato da (Parkkinen, 1982) che afferma che le esterasi del lievito manifestano maggiore affinità verso gli esteri di acidi grassi a corta catena di atomi di carbonio. Nel complesso (Fig. 10), si rileva una minore affinità verso il 2-naftil propionato (B) e il miristato (E) che presentano valori di D.O. molto simili, mentre risultano molto più bassi quelli del 2-naftil butirato (C), il palmitato (F) e lo stearato (G). Per quanto riguarda il 2-naftil laurato (D), i valori di attività, espressi in D.O., risultano particolarmente elevati per i ceppi P225,5 e P301,9, mentre le esterasi del ceppo P304,1 non manifestano nessuna affinità verso questo estere.

Dall'osservazione dei singoli grafici di Figura 10 si evince che ogni ceppo presenta uno specifico valore di attività che lo caratterizza. Tuttavia, per alcuni esteri quali il 2-naftil miristato, acetato e butirato (Fig. 10, grafico E, A e C) non si rilevano differenze importanti tra i valori di attività dei 9 campioni. Questo risultato è confermato anche dai valori dei coefficienti di variazione (Tab. 4, C.V.) che risultano particolarmente bassi, rispettivamente 17%, 21% e 27%. Al contrario, l'affinità delle esterasi verso il 2-naftil laurato (Fig. 10, D) varia molto in funzione del campione (tabella 1, C.V. 69%) mettendo in luce differenze significative tra i 9 ceppi. Infine, i valori del C.V. rilevati per i substrati 2-naftil propionato, stearato e palmitato (Tab. 4) evidenziano una variabilità e quindi alcune differenze tra i ceppi studiati.

La caratterizzazione dei ceppi può essere eseguita anche attraverso la visualizzazione zimografica di isoforme enzimatiche. Come riportato da alcuni autori (Goulet, Picard, 1995) le esterasi presentano un interessante polimorfismo con la presenza di bande di diversa intensità di colore e migrazione elettroforetica che permettono una facile identificazione dei lieviti (Lomolino et al., 2005). Per l'analisi zimografica delle esterasi si è voluto utilizzare la fluoresceina diacetato che, in seguito all'idrolisi da parte delle esterasi dei lieviti, libera fluorocromo, sostanza particolarmente sensibile nella rilevazione delle bande esterasiche.

Dalla Figura 11 si evince che, ad eccezione del ceppo P304,1, che presenta una banda di forte intensità, posizionata un po' al di sotto delle altre, le isoforme dei ceppi si distribuiscono alla stessa altezza, dimostrando un'assenza di polimorfismo per i 9 ceppi analizzati e per il substrato fluorescente. Tuttavia, si può rilevare una differenza quantitativa delle esterasi espressa dalla minore o maggiore fluorescenza delle bande. Infine, se confrontiamo i valori di attività esterasica del 2-naftil acetato (Fig.10, A) e l'intensità della fluorescenza delle bande zimografiche

appartenenti ai singoli ceppi non rileviamo una corrispondenza tra l'attività spettrofotometrica e quella elettroforetica, mettendo in luce, anche in questo caso, una diversa affinità di substrato. L'utilizzo di substrati sintetici quali gli esteri del naftolo e della fluoresceina ci hanno permesso di caratterizzare 9 ceppi di lievito *Saccharomyces cerevisiae* isolati dalle vinacce di Prosecco sulla base della loro attività esterasica. Dall'analisi spettrofotometrica ed elettroforetica degli estratti citoplasmatici si evince che, con alcune eccezioni, non esistono differenze rilevanti tra i 9 ceppi. L'affinità delle esterasi verso i substrati utilizzati è simile a quella osservata in studi precedenti (Rizzi et al., 2003), e la migrazione elettroforetica delle bande zimografiche rivela una bassissima variabilità tra i ceppi analizzati. I risultati ottenuti rappresentano certamente un punto di partenza per ulteriori approfondimenti sull'affinità delle esterasi di lievito verso substrati naturali quali gli antiossidanti esterificati e sulla possibile modificazione delle loro proprietà mediante test *in vitro* e *in vivo*. Poiché tra gli scopi della tesi di Dottorato vi era quello, abbastanza ambizioso, di produrre un alimento funzionale arricchito con sostanze polifenoliche derivate dal settore enologico, considerando che la ricerca a questo punto avrebbe richiesto un tempo non compatibile con la durata della tesi, abbiamo deciso di utilizzare per le successive due ricerche un estratto commerciale ottenuto dai vinaccioli.

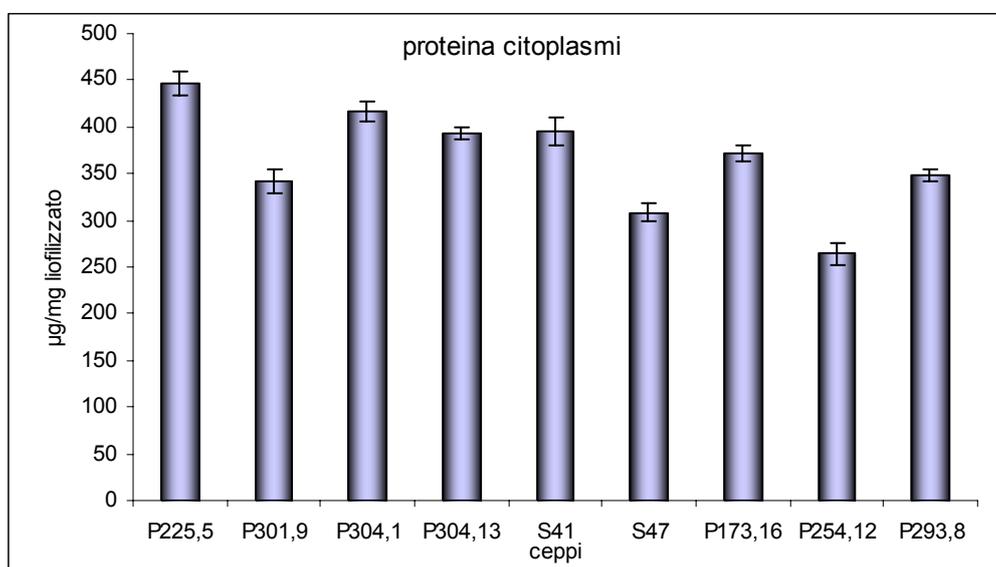
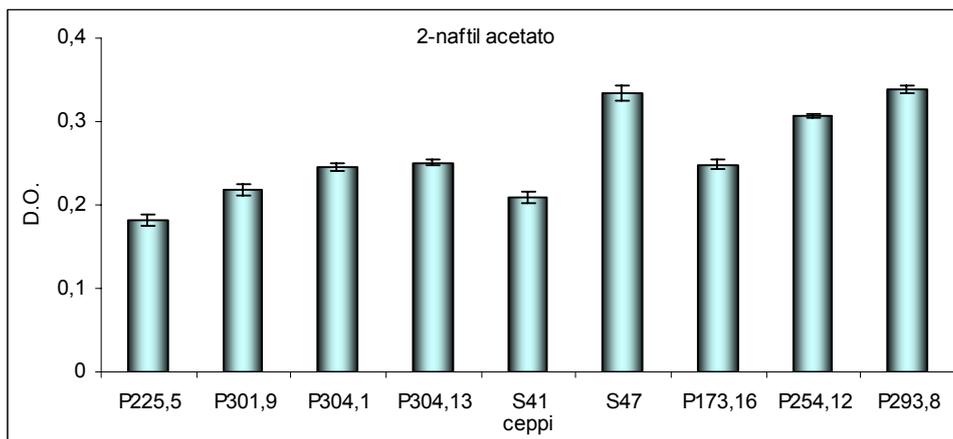


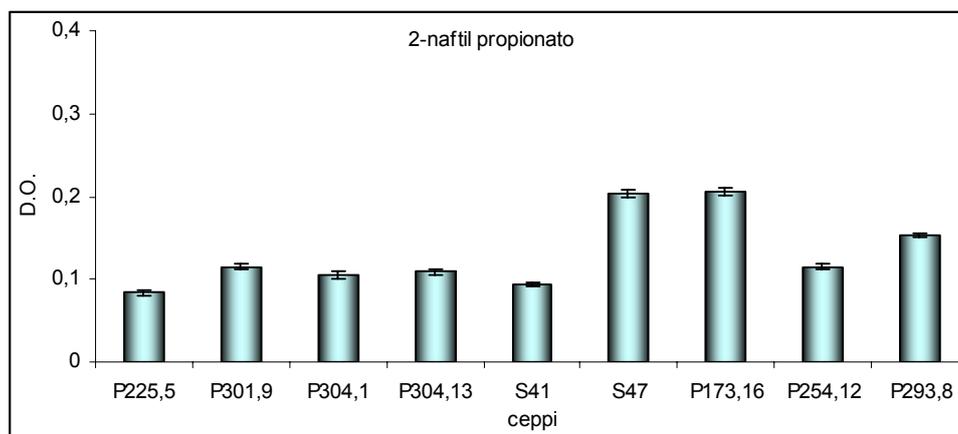
Figura 9: Quantità di proteina presente nel citoplasma dei ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* isolati da vinacce di prosecco, espressa in µg/ml di estratto liofilizzato (valore medio della proteina: 365µg/mg estratto liofilizzato; C.V.: 15%).

ATTIVITA' ESTERASICA

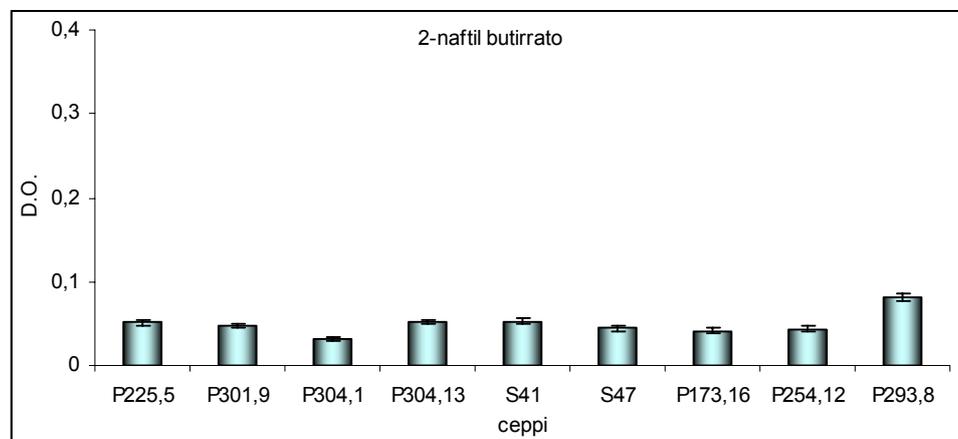
A



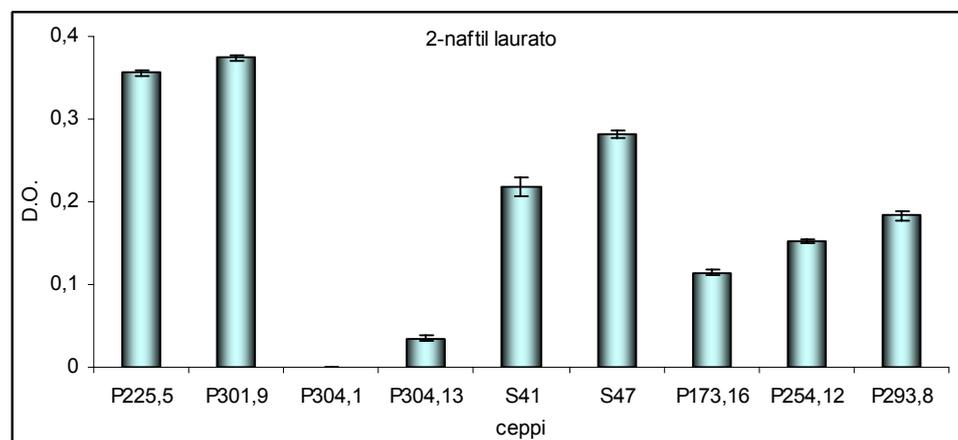
B



C



D



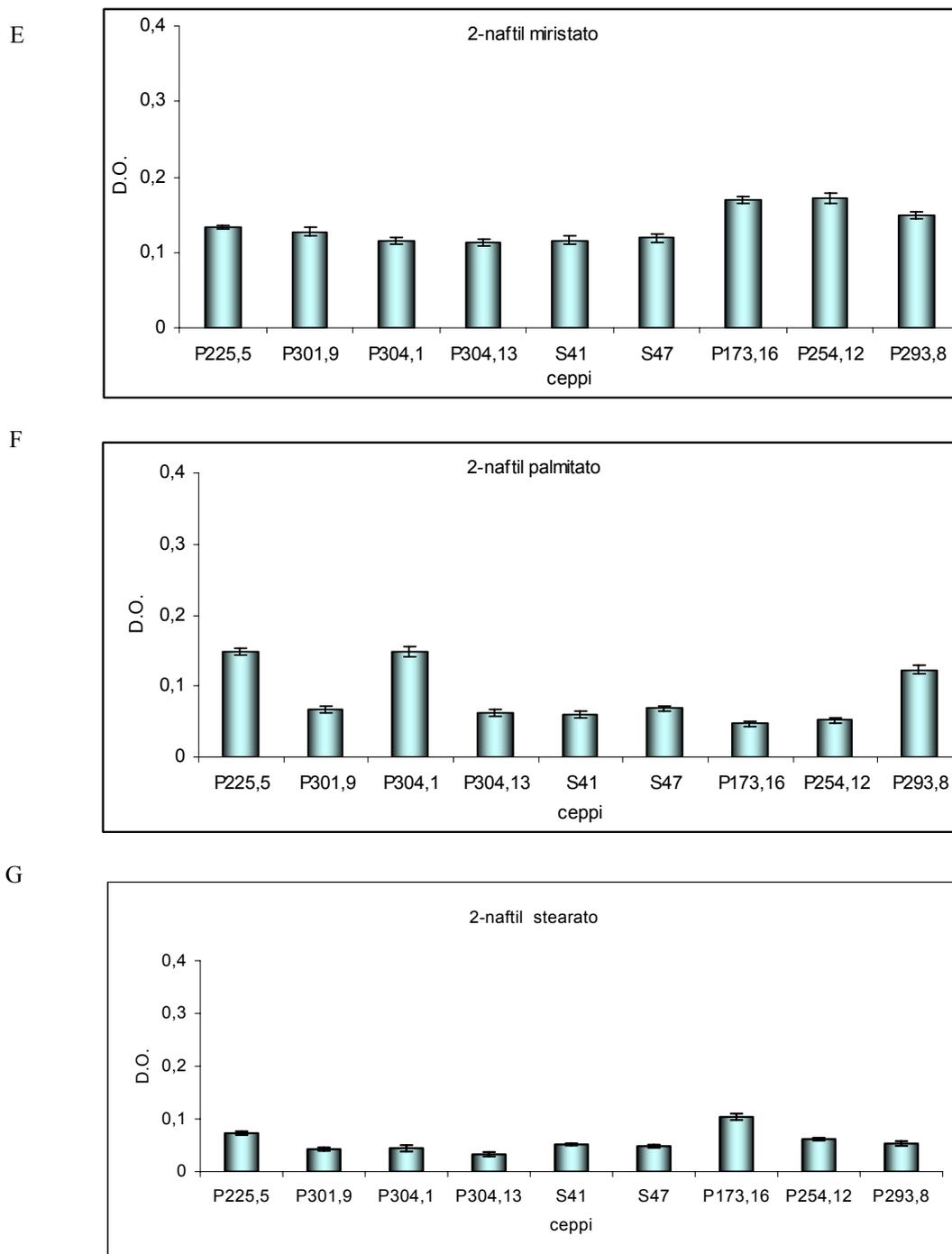


Figura 10: Attività esterasica rilevata nel citoplasma di ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* isolati da vinacce di Prosecco. L'attività esterasica è stata misurata in presenza di esteri del naftolo esterificato con acidi grassi a diversa lunghezza della catena di atomi di carbonio:

- A. 2-naftil acetato
- B. 2-naftil propionato
- C. 2-naftil butirato
- D. 2-naftil laurato
- E. 2-naftil miristato
- F. 2-naftil palmitato
- G. 2-naftil stearato

I risultati sono la media di 6 letture e l'attività è espressa in unità di densità ottica (D.O.).

| substrati | Attività esterasica media dei ceppi (espressa in D.O. ₄₀₀) | DEV.ST. | C.V. |
|---------------------|--|---------|------|
| 2-naftil acetato | 0,259 | 0,055 | 21% |
| 2-naftil butirrato | 0,050 | 0,014 | 27% |
| 2-naftil propionato | 0,132 | 0,046 | 35% |
| 2-naftil laurato | 0,191 | 0,131 | 69% |
| 2-naftil miristato | 0,135 | 0,023 | 17% |
| 2-naftil palmitato | 0,086 | 0,042 | 48% |
| 2-naftil stearato | 0,057 | 0,021 | 37% |

Tabella 4: Attività esterasica media presente nei citoplasmi dei 9 ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* in funzione degli esteri del naftolo.

DEV.ST.: deviazione standard

C.V.: coefficiente di variazione

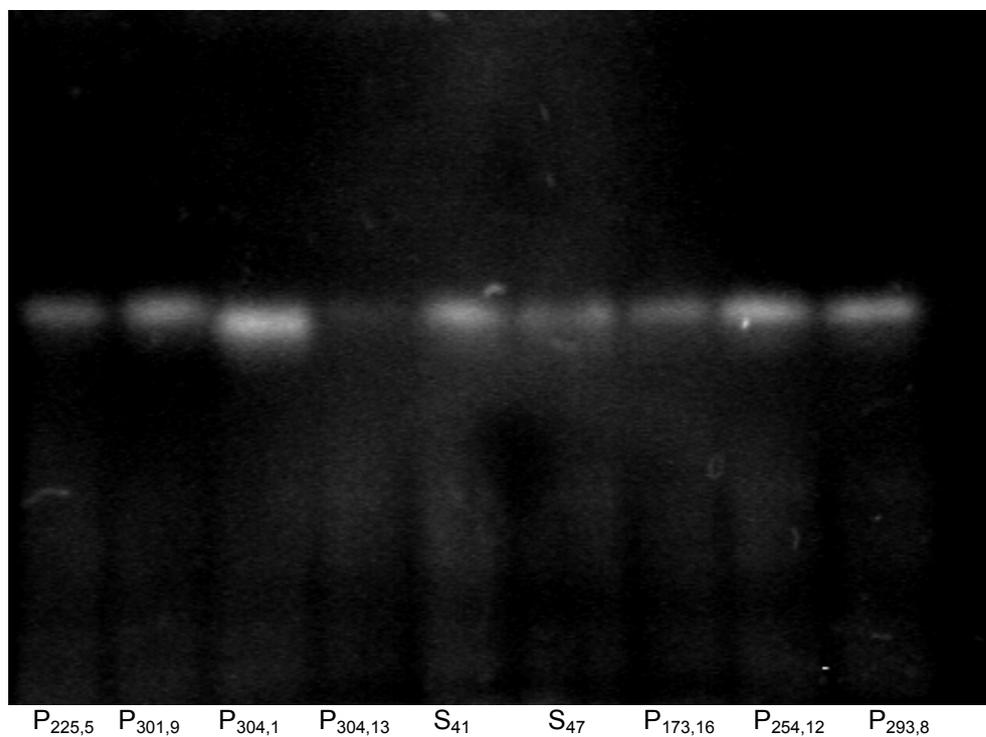


Figura 11: Zimogramma dell'attività esterasica rilevata nel citoplasma di ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* ed evidenziato in presenza di fluoresceina di acetato come substrato. La separazione degli estratti proteici (20µg di proteina caricati in ogni pozzetto) è avvenuta in condizioni native (T=8,5%).

7 SOTTOTITOLO 3: TEST IN VITRO PER VALUTARE L'ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE E ANTIMICROBICA DI UN ESTRATTO VEGETALE

Nel settore delle indagini di tipo fitochimico, lo screening dei bioestratti da utilizzare come ingredienti funzionali e/o tecnologici, anche negli alimenti, gioca un ruolo strategico. Tra le attività ricercate più frequentemente vi sono quella antiossidante e quella antimicrobica la cui presenza offre interessanti prospettive applicative (Sohn et al., 2004). I metodi di caratterizzazione e identificazione dei composti fenolici sono, come nel caso di altri principi attivi, la preparazione dell'estratto, lo screening biologico, il frazionamento, l'isolamento e la caratterizzazione strutturale. Una delle fasi più critiche è sicuramente quella in cui si valuta l'attività biologica, in quanto i metodi utilizzati, essendo difficilmente standardizzabili, rendono complicato un confronto tra differenti estratti o composti. In questo studio sono presentati i risultati ottenuti con due test *in vitro*, messi a punto per valutare l'attività antiossidante e quella antimicrobica di un estratto di vinaccioli, ricco in catechine ed epicatechine.

7.1 Valutazione dell'attività antiossidante

Il metodo prevede l'incubazione di linfociti bovini con dosi crescenti dell'estratto considerato (Leucoselect, Indena s.a.s, Milano). Al termine del periodo d'incubazione, i linfociti vengono sottoposti ad uno stress ossidativo (Onaran et al., 2006) con idroperossido di cumene (CuOH) misurando la produzione intracellulare di ROS con metodo fluorimetrico (Labieniec, Gabryelak, 2007). I linfociti bovini (1.0×10^6 cellule/ml) sono ottenuti da 3 ml di sangue in seguito a separazione su gradiente di densità di Ficoll-Hypaque (*Sentinel CH Srl*). L'incubazione è effettuata utilizzando un mezzo di coltura così composto: 10% *New Born Calf Sierum* (NCS), 1% Glutamina, 1% Penicilina e Streptomicina, 0.5% Concanavalina. Dopo 24 ore a 37°C ed in presenza di 5% CO₂, i linfociti sono stati trasferiti in piastre da 96 pozzetti a contatto con diverse concentrazioni dell'estratto di vinaccioli (0-10,5 mg/ml) per 24 ore. Successivamente le cellule sono incubate con una soluzione 15µM CuOH (Sigma) per 1 ora, modificando parzialmente il metodo proposto da (Onaran et al., 2006). La vitalità cellulare è valutata con Trypan Blu (0,4%). Le cellule vitali, secondo la metodica proposta da (Rosenkranz et al., 1992), vengono trattate per 20 minuti con 50µM di 2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA) (Sigma) misurando con uno spettrofluorimetro (*TECAN BioRad*), eccitazione 485nm ed emissione 535 nm, la

concentrazione del 2',7'-diclorofluorescina (DCF) prodotto. La forma esterificata del substrato non fluorescente DCFH-DA dopo aver attraversato la membrana cellulare si ossida nella forma fluorescente DCF, la cui presenza è correlata alla produzione intracellulare dei ROS. L'attività antiossidante dell'estratto è stata espressa in percentuale come "Scavenging activity" (SA%).

$$SA\% = \frac{\text{fluorescenza 1} - \text{fluorescenza 2}}{\text{fluorescenza 1}} * 100$$

dove fluorescenza 1 corrisponde alla lettura con lo spettrofluorimetro al tempo zero e fluorescenza 2, alla lettura dopo 10 secondi. Ogni esperimento è stato effettuato con tre ripetizioni. I risultati ottenuti sono sottoposti ad analisi della varianza e le differenze tra le medie analizzate mediante test di *Tukey*.

7.2 Valutazione dell'attività antimicrobica

E' stato adattato allo scopo un saggio di tipo qualitativo (PAR-TEST) già utilizzato, come metodo ufficiale, per determinare la presenza di sostanze antibatteriche in liquidi biologici come latte (Van Oss, 1975), urine e sangue. Per la prova sono impiegate piastre PS 500 A e B, seminate con una quantità standardizzata di spore di *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953 (Oxoid), riscaldate per 3 minuti a 60°C, temperatura di sviluppo del microrganismo. Dei dischi di carta di 13 mm di diametro vengono immersi, per pochi secondi, in soluzioni ottenute addizionando ad acqua sterile diverse concentrazioni (0, 1, 2, 3, 4, 5 e 10mg/ml) dell'estratto vegetale. I dischi imbevuti con la soluzione di estratto sono trasferiti sulla superficie agarizzata di ogni piastra, esercitando una leggera pressione per assicurare un buon contatto. Come controllo positivo (CP) è impiegato un disco delle medesime dimensioni contenente 0.01 U.I. di penicillina. Le piastre vengono incubate a 60 °C ± 2 °C per 24 ore fino alla comparsa di un alone di inibizione visibile, di cui viene misurato il diametro.

7.3 Risultati e discussione

La dose di estratto che determina la più elevata attività antiossidante, espressa come "scavenging activity", è la concentrazione di 2 mg/ml (Fig. 12). E' interessante notare come successivamente l'andamento diventi bi-modale all'aumentare della quantità di estratto impiegato. Dopo aver osservato che non si verifica alcuna proliferazione cellulare a tutte le concentrazioni testate, i risultati ottenuti potrebbero essere interpretati secondo due ipotesi. Una transitoria difficoltà

nell'assorbimento dell'antiossidante, che in alte concentrazioni può produrre i ROS causando stress ossidativo e tossicità (Barbehem et al., 2003; Khan et al., 2000), o come riportato da (Labienic, Gabryelak, 2007) una perdita momentanea del bilanciamento tra attività antiossidante e proossidante. Nelle cellule viventi, infatti, ambedue le attività sono in equilibrio. Si tratta di un equilibrio dinamico e quindi possono essere considerati “veri” antiossidanti solo i composti che lo mantengono. Alla luce dei nostri risultati, il test messo a punto, anche se necessita di ulteriori approfondimenti, può ben rappresentare questo aspetto e costituire un'ulteriore strumento per la caratterizzazione di antiossidanti diversi. Come riportato da (Kubo et al., 2002) se un estratto risulta essere un antiossidante, non necessariamente possiede un'attività antimicrobica e di conseguenza, anche in uno screening iniziale, risulta utile poter individuare i composti che presentano ambedue queste proprietà.

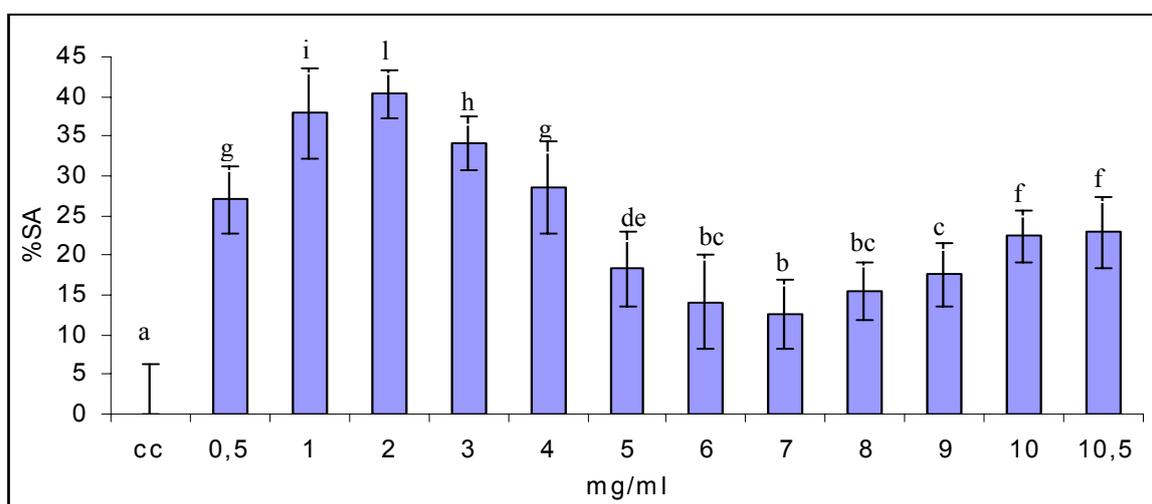


Figura 12: Valutazione della “SA” intracellulare mediante DCF-DA a diverse concentrazioni di antiossidante. (Lettere diverse indicano medie statisticamente differenti; Tukey t-test; P < 0.05).

Per quanto riguarda l'attività antimicrobica (Fig. 13), è stato utilizzato il sistema PAR-TEST che si basa sulla particolare sensibilità delle spore di *Bacillus stearothermophilus* ad una ampia gamma di principi attivi, in particolare antibiotici. I risultati ottenuti, pur essendo preliminari, confermano la possibilità di impiegare il test anche per saggiare l'attività antimicrobica di un estratto ed inoltre la semplicità di esecuzione del saggio su piastra permette di testare contemporaneamente numerosi estratti.

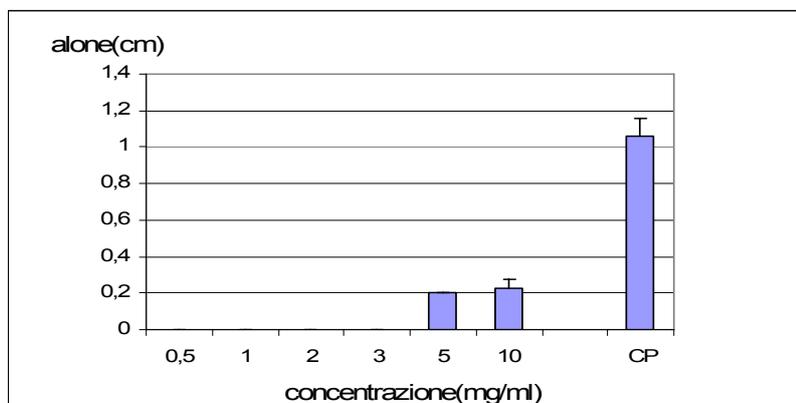


Figura 13: Attività antimicrobica dell'estratto vegetale, espressa come diametro dell'alone di inibizione della germinazione di spore di *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953.

Nello screening dei bioestratti, da utilizzare come ingredienti funzionali e/o tecnologici, la valutazione dell'attività antiossidante ed antimicrobica gioca un ruolo strategico. I due test *in vitro* messi a punto e testati con un estratto commerciale, possono essere considerati utili per evidenziare le potenzialità ed i limiti dei principi attivi studiati. A questo riguardo, la semplicità di esecuzione del saggio su piastra permette di testare contemporaneamente numerosi estratti, facilitando la fase di selezione iniziale. Il test *in vitro* con colture di linfociti bovini, anche se necessita di ulteriori approfondimenti, può ben rappresentare l'equilibrio intracellulare dinamico tra attività antiossidante e proossidante e costituire un'ulteriore strumento per la caratterizzazione di antiossidanti diversi.

8 SOTTOTITOLO 4: STUDIO DI FATTIBILITA' PER LA PRODUZIONE DI PANE SURGELATO FUNZIONALE

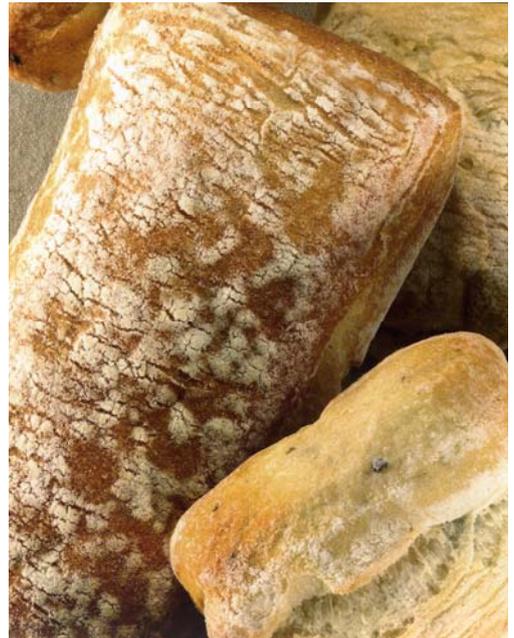
Il pane è uno dei prodotti alimentari più consumati in Italia, oltre che in molti altri paesi europei, rappresentando uno dei componenti fondamentali della dieta della popolazione italiana e mediterranea.

L'obiettivo di questa ricerca è di preparare su scala pilota un pane surgelato con aggiunta di sostanze antiossidanti di natura fenolica ad azione antiradicalica, in stretto contatto con una ditta padovana interessata a produrre una nuova linea di prodotti funzionali che sostituisca il 25 % dell'attuale offerta di pane surgelato.

L'Azienda ritiene che l'innovazione del proprio prodotto, non solo permetterà di mantenere i rapporti con gli attuali clienti, ma costituirà anche uno strumento di marketing, per i potenziali nuovi acquirenti che potrà raggiungere, grazie anche alla nicchia di mercato in cui intende inserirsi.

Dopo una accurata indagine bibliografica e messa a punto delle metodiche sperimentali, si è stabilito di impiegare un estratto commerciale Leucoselect della ditta Indena s.a.s (Milano) ad elevato titolo in catechine, ottenuto dai vinaccioli.

La scelta di un prodotto commerciale è nata dall'esigenza di assicurare la stabilità microbiologica e l'eventuale possibilità d'inserimento immediato del pane ottenuto nel circuito commerciale.





PAG. 1

PRODOTTO: LEUCOCIANIDINE

LEUCOSELECT(R)

CODICE N. : 9039000

CERTIFICATO DI ANALISI N. : 81417

DESCRIZIONE : LEUCOCIANIDINE

LAV. N. : 27924/M1

DATA DI FABBRICAZIONE : 12/2002

DATA DI RICONTROLLO : 12/2005

2005 000203

| DETERMINAZIONE | RISULTATI | SPECIFICHE | U.M. |
|--|-----------|--------------|------|
| TITOLO GPC di leucoselect. riferito alla sostanza anidra Secondo TM/0079 | 97,9 | 95,0 - 105,0 | % |
| TITOLO HPLC come somma di catechina ed epicatechina esoresa come catechina. riferito alla sostanza anidra Secondo TM/0076 | 16,0 | 13,0 - 19,0 | % |
| CARATTERI Polvere di colore arancione-brunastro | Conforme | Conforme | |
| SOSTANZE INSOLUBILI in acqua | 0,5 | <= 2,0 | % |
| IDENTIFICAZIONE Reazione di Bate-Smith | Conforme | Conforme | |
| IDENTIFICAZIONE GPC Secondo TM/0079 | Conforme | Conforme | |
| GRANULOMETRIA Almeno il 95 per cento deve essere inferiore a 70 µm (200 mesh) | Conforme | Conforme | |
| ACQUA (K. Fischer) Secondo USP | 4,9 | <= 8,0 | % |
| CENERI SOLFORICHE (Secondo USP - Ph. J.) | 0,2 | <= 0,5 | % |
| METALLI PESANTI Secondo USP | Conforme | <= 10,0 | ppm |
| SOLVENTI ORGANICI RESIDUI Secondo TM/0266 | | | |
| Etanolo | 15,0 | < 100,0 | ppm |



PAG. 2

CODICE: 9039000

CERTIFICATO DI ANALISI N. : B1417

| DETERMINAZIONE | RISULTATI | SPECIFICHE | U.M. |
|---------------------------------|-----------|-----------------|---------|
| Etile acetato | < LOD | < LOD (7.4 ppm) | |
| Acetone | 12,0 | < 50,0 | ppm |
| Metilene cloruro | Assente | < LOD (4.4 ppm) | |
| n-Butanolo | < 12,0 | < 15,0 | ppm |
| CONTROLLO MICROBIOLOGICO | | | |
| Secondo Farm. Eur. | | | |
| BATTERI | < 1000,0 | (= 1000,0 | ufc/g |
| Limite max. di accettabilita': | | | |
| 5 x 1000 ufc/g | | | |
| Secondo TM/0113 | | | |
| MUFFE e LIEVITI | < 100,0 | (= 100,0 | ufc/g |
| Limite max. di accettabilita': | | | |
| 5 x 100 ufc/g | | | |
| Secondo TM/0118 | | | |
| ENTEROBATTERI | < 100,0 | (= 100,0 | cell./g |
| Secondo TM/0015 e TM/0075 | | | |
| ESCHERICHIA COLI | Assente | Assente | /g |
| Secondo TM/0016 e TM/0075 | | | |
| SALMONELLA | Assente | Assente | /10g |
| Secondo TM/0017 e TM/0075 | | | |
| PSEUDOMONAS AERUGINOSA | Assente | Assente | /g |
| Secondo TM/0010 e TM/0011 | | | |
| STAPHYLOCOCCUS AUREUS | Assente | Assente | /g |
| Secondo TM/0008 e TM/0009 | | | |

Tabella 5: Certificato di analisi del Leucoselect

L'impiego dell'estratto durante il processo di panificazione si prestava ad alcune considerazioni:

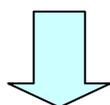
- a) Il momento della sua aggiunta all'impasto
- b) La forma fisica del principio attivo

Inizialmente si è scelto di aggiungere l'estratto nella sua forma naturale di polvere durante la fase d'impasto. Al termine del processo di produzione si è proceduto al prelievo dei campioni.

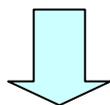
8.1 Impostazione della prima prova

Si sono utilizzati 45 g di principio attivo, che servono a preparare 300 panini da 100 g l'uno
per ogni panino 100 g = 150 mg di principio attivo

PANE (impasto pronto) + ESTRATTO IN POLVERE



ESTRAZIONE



ANALISI

- a. Polifenoli totali: **metodica Folin-Ciocalteu**
- b. Attività antiradicalica: **DPPH**
- c. Separazione e caratterizzazione dei polifenoli: **HPLC**

Il campionamento è stato effettuato in triplo nel seguente modo:

| | | | |
|---|----------------------------|---|------------------------------|
| 1) panini appena fatti(crudi) | 3campioni(con catechina) | + | 3 campioni(senza catechina) |
| 2) panini dopo la cottura | 3 campioni (con catechina) | + | 3 campioni (senza catechina) |
| 3) panini subito dopo surgelazione | 3 campioni (con catechina) | + | 3 campioni (senza catechina) |
| 4) panini surgelati dopo 7 gg di conservazione | 3 campioni (con catechina) | + | 3 campioni (senza catechina) |
| 5) panini surgelati dopo 15 gg di conservazione | 3 campioni (con catechina) | + | 3 campioni (senza catechina) |
| 6) panini surgelati dopo 21 gg di conservazione | 3 campioni (con catechina) | + | 3 campioni (senza catechina) |
| 7) panini surgelati dopo 28 gg di conservazione | 3 campioni (con catechina) | + | 3 campioni (senza catechina) |
| 8) panini surgelati dopo 35 gg di conservazione | 3 campioni (con catechina) | + | 3 campioni (senza catechina) |
| 9) panini surgelati dopo 45 gg di conservazione | 3 campioni (con catechina) | + | 3 campioni (senza catechina) |

8.2 Risultati della prima prova

| | | differenza | | |
|---|----------|------------|----------|---|
| pane senza catechina crudo | Ip = 47% | 29% | Ip = 76% | pane con catechina crudo |
| pane senza catechina cotto | Ip = 54% | 34% | Ip = 88% | pane con catechina cotto |
| pane senza catechina cotto congelato | Ip = 58% | 29% | Ip = 87% | pane con catechina cotto congelato |
| pane senza catechina cotto congelato dopo 7 gg | Ip = 57% | 34% | Ip = 91% | pane con catechina cotto congelato dopo 7 gg |
| pane senza catechina cotto congelato dopo 15 gg | Ip = 58% | 33% | Ip = 91% | pane con catechina cotto congelato dopo 15 gg |
| pane senza catechina cotto congelato dopo 21 gg | Ip = 53% | 36% | Ip = 89% | pane con catechina cotto congelato dopo 21 gg |
| pane senza catechina cotto congelato dopo 28 gg | Ip = 61% | 29% | Ip = 90% | pane con catechina cotto congelato dopo 28 gg |
| pane senza catechina cotto congelato dopo 35 gg | Ip = 61% | 29% | Ip = 90% | pane con catechina cotto congelato dopo 35 gg |
| pane senza catechina cotto congelato dopo 45 gg | Ip = 60% | 30% | Ip = 90% | pane con catechina cotto congelato dopo 45 gg |

Tabella 6: Determinazione dell'attività antiradicalica dopo 45 giorni di conservazione

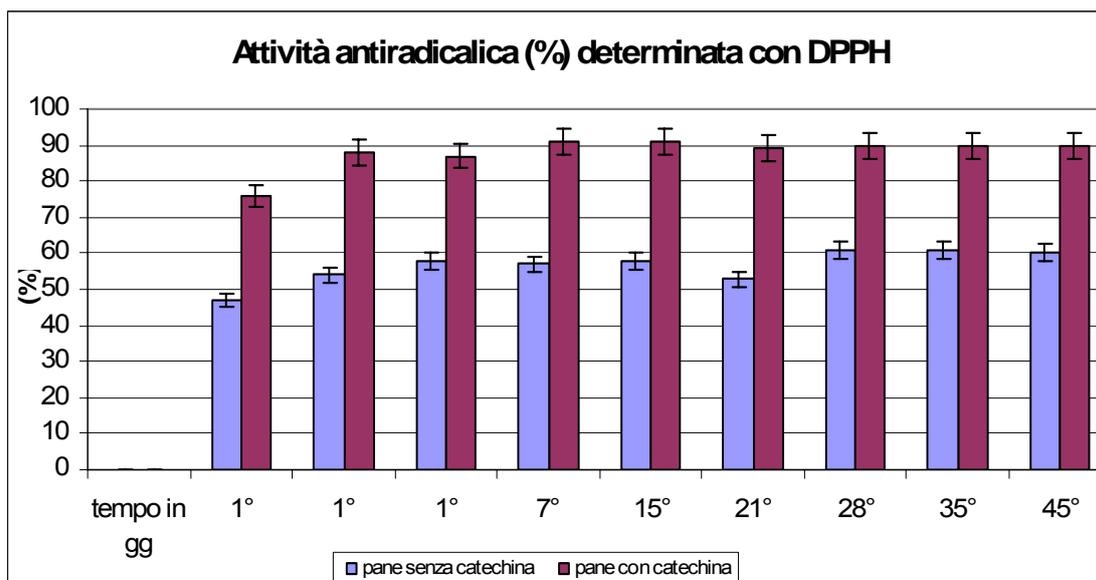


Figura 14: Variazione percentuale dell'attività antiradicalica in funzione del tempo di conservazione.

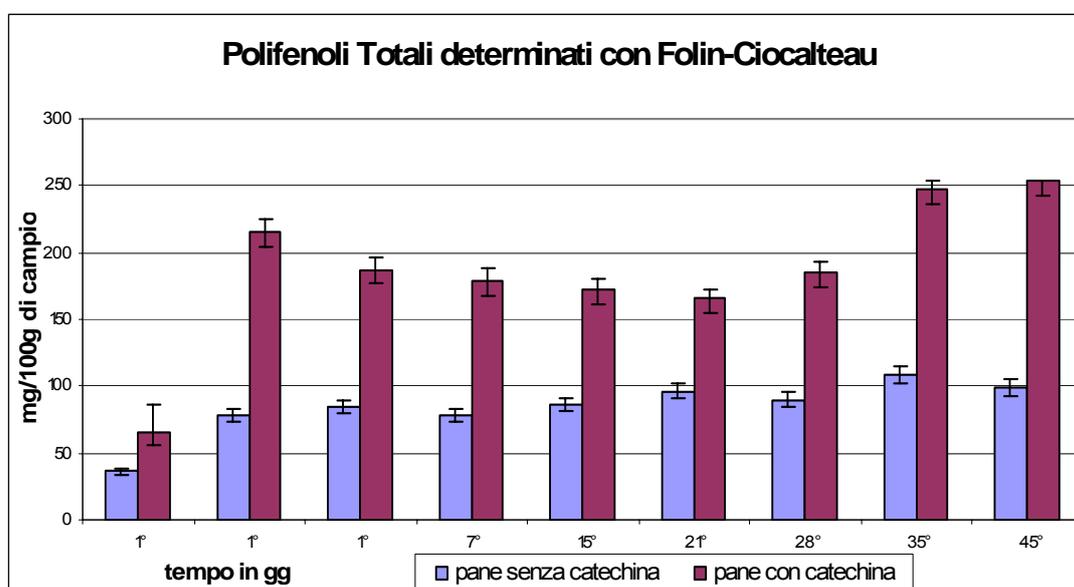


Figura 15: Variazione in funzione del tempo di conservazione della concentrazione di polifenoli totali valutati con la metodica del Folin-Ciocalteu.

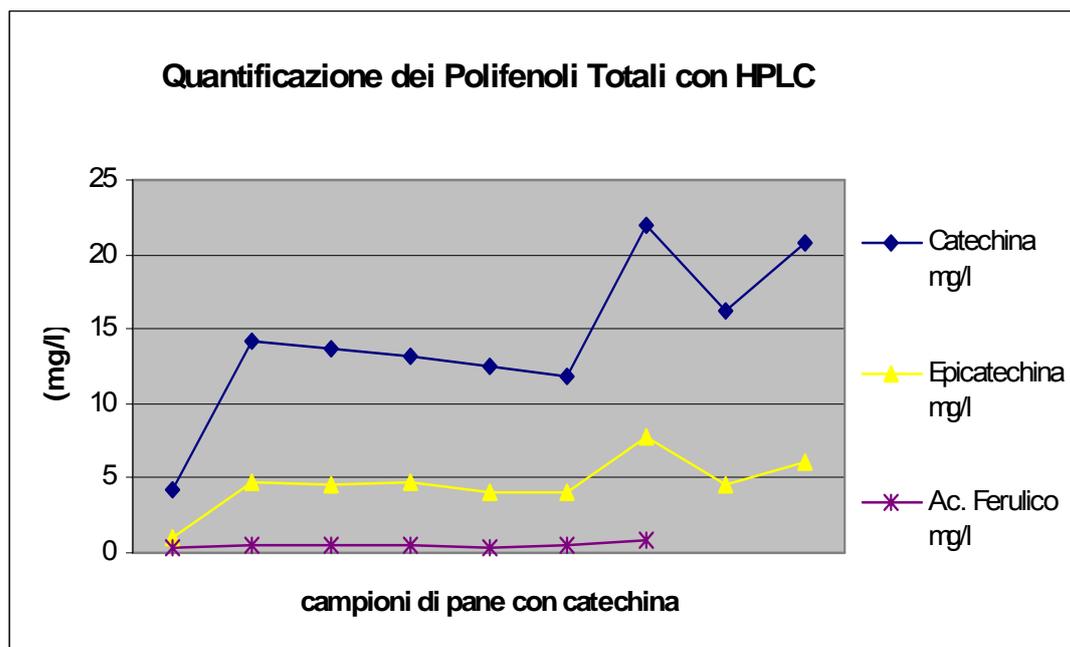


Figura 16: Separazione e caratterizzazione dei polifenoli con HPLC

Osservando la Tabella 6 e la Figura 14 si nota come il pane, a cui è stato aggiunto il principio attivo, mostri mediamente un'attività antiradicalica superiore (circa il 30%) ed un maggior contenuto di polifenoli totali rispetto al prodotto lavorato normalmente (Fig.15).

L'attività delle catechine non sembra perciò essere stata influenzata dai trattamenti tecnologici di impastamento, formatura, cottura e surgelazione.

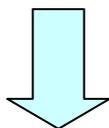
Sicuramente la forma fisica del principio attivo può giocare un ruolo chiave in quanto una non perfetta miscelazione (prodotto in polvere) è probabilmente responsabile di alcune fluttuazioni dei risultati ottenuti (Fig. 16), per esempio al 28 giorno di conservazione si è avuta una "variazione anomala" nella concentrazione di catechina ed epicatechina). I panini prodotti con principio attivo non hanno evidenziato particolari aspetti di colore ed odore differenti da quelli prodotti tradizionalmente. Un panel test, anche se effettuato non in modo rigoroso, ha avuto esiti positivi per quanto riguarda la morbidezza e la gradevolezza dell'aroma e del sapore.

In conclusione i risultati della prima prova sono sicuramente incoraggianti e confermano che è possibile ottenere un pane surgelato contenente antiossidanti che mantengono la loro attività anche dopo 45 giorni di conservazione a -18°C .

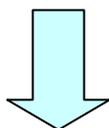
8.3 Impostazione della seconda prova

Si è proceduto esattamente come riportato per la 1° prova; le differenze sostanziali sono state l'aggiunta del principio attivo sotto forma liquida (sciolto in acqua prima di aggiungerlo all'impasto), il periodo di conservazione di 65 giorni anziché 45 e l'impasto effettuato non solo con 45 g di principio attivo ma anche con 90 g.

PANE (impasto pronto) + ESTRATTO LIQUIDO (sciolto in acqua prima di aggiungerlo all'impasto)



ESTRAZIONE



ANALISI

- a. Polifenoli totali: **metodica Folin Ciocalteau**
- b. Attività antiradicalica: **DPPH**
- c. Separazione e caratterizzazione dei polifenoli: **HPLC**

Si sono utilizzati 45 g di principio attivo, che servono a preparare 300 panini:

Per ogni panino di 100 g = 150 mg di principio attivo

Nello stesso tempo 90 g di principio attivo, che servono a preparare 300 panini:

Per ogni panino di 100 g = 300 mg di principio attivo

Il campionamento è stato effettuato in triplo nel seguente modo:

| | | | | | |
|---|------------------------------|---|-------------------------------|---|-----------------------------|
| 1) panini appena fatti(crudi) | 3campioni(con catechina) 90g | + | 3campioni (con catechina) 45g | + | 3campioni(se nza catechina) |
| 2)panini dopo la cottura | 3campioni(con catechina) 90g | + | 3campioni (con catechina) 45g | + | 3campioni(se nza catechina) |
| 3)panini subito dopo surgelazione | 3campioni(con catechina) 90g | + | 3campioni (con catechina) 45g | + | 3campioni(se nza catechina) |
| 4) panini surgelati dopo 8 gg di conservazione | 3campioni(con catechina) 90g | + | 3campioni (con catechina) 45g | + | 3campioni(se nza catechina) |
| 5)panini surgelati dopo 14 gg di conservazione | 3campioni(con catechina) 90g | + | 3campioni (con catechina) 45g | + | 3campioni(se nza catechina) |
| 6)panini surgelati dopo 23 gg di conservazione | 3campioni(con catechina) 90g | + | 3 campioni(con catechina) 45g | + | 3campioni(se nza catechina) |
| 7)panini surgelati dopo 31 gg di conservazione | 3campioni(con catechina) 90g | + | 3campioni (con catechina) 45g | + | 3campioni(se nza catechina) |
| 8)panini surgelati dopo 38 gg di conservazione | 3campioni(con catechina) 90g | + | 3 campioni(con catechina) 45g | + | 3campioni(se nza catechina) |
| 9) panini surgelati dopo 45 gg di conservazione | 3campioni(con catechina) 90g | + | 3campioni (con catechina) 45g | + | 3campioni(se nza catechina) |
| 10) panini surgelati dopo 51 gg di conservazione | 3campioni(con catechina) 90g | + | 3campioni (con catechina) 45g | + | 3campioni(se nza catechina) |
| 11) panini surgelati dopo 65 gg di conservazione | 3campioni(con catechina) 90g | + | 3campioni (con catechina) 45g | + | 3campioni(se nza catechina) |

8.4 Risultati della seconda prova

| Descrizione | Campioni di pane | Attività anti radicalica espressa in % | Campioni di pane | Attività anti radicalica espressa in % | Campioni di pane | Attività anti radicalica espressa in % | DIFFERENZA | |
|--|------------------------------|--|-------------------------------|--|-----------------------------|--|---|---|
| | | | | | | | Impasto 90g di catechina pane senza catechina | Impasto 45g di catechina pane senza catechina |
| 1) panini appena fatti(crudi) | 3campioni(con catechina) 90g | Ip=93% | 3 campioni(con catechina) 45g | Ip=93% | 3campioni (senza catechina) | Ip=65% | 28% | 28% |
| 2)pannini dopo la cottura | 3campioni(con catechina) 90g | Ip=93% | 3campioni (con catechina) 45g | Ip=92,5% | 3campioni (senza catechina) | Ip=61% | 32% | 31,5% |
| 3)panini subito dopo surgelazione | 3campioni(con catechina) 90g | Ip=93% | 3campioni (con catechina) 45g | Ip=93% | 3campioni (senza catechina) | Ip=63% | 30% | 30% |
| 4) panini surgelati dopo 8 gg di conservazione | 3campioni(con catechina) 90g | Ip=93% | 3campioni (con catechina) 45g | Ip=91,5% | 3campioni (senza catechina) | Ip=56% | 37% | 35,5% |
| 5)panini surgelati dopo 14 gg di conservazione | 3campioni(con catechina) 90g | Ip=93,6% | 3campioni (con catechina) 45g | Ip=92% | 3campioni (senza catechina) | Ip=63% | 30,6% | 29% |
| 6)panini surgelati dopo 23 gg di conservazione | 3campioni(con catechina) 90g | Ip=93,5% | 3campioni (con catechina) 45g | Ip=93% | 3campioni (senza catechina) | Ip=62% | 31,5% | 31% |
| 7)panini surgelati dopo 31 gg di conservazione | 3campioni(con catechina) 90g | Ip=93% | 3campioni (con catechina) 45g | Ip=92% | 3campioni (senza catechina) | Ip=63% | 30% | 29% |
| 8)panini surgelati dopo 38 gg di conservazione | 3campioni(con catechina) 90g | Ip=93% | 3campioni (con catechina) 45g | Ip=92% | 3campioni (senza catechina) | Ip=62 | 31% | 30% |
| 9) panini surgelati dopo 45 gg di conservazione | 3campioni(con catechina) 90g | Ip=93% | 3campioni (con catechina) 45g | Ip=93% | 3campioni (senza catechina) | Ip=57% | 36% | 36% |
| 10) panini surgelati dopo 51 gg di conservazione | 3campioni(con catechina) 90g | Ip=93% | 3campioni (con catechina) 45g | Ip=91% | 3campioni (senza catechina) | Ip=61% | 32% | 30% |
| 11) pane surgelati dopo 65 gg di conservazione | 3campioni(con catechina) 90g | Ip=90% | 3campioni (con catechina) 45g | Ip=87% | 3campioni (senza catechina) | Ip=61% | 29% | 26% |

Tabella 7: Determinazione dell'attività antiradicalica dopo 65 giorni di conservazione

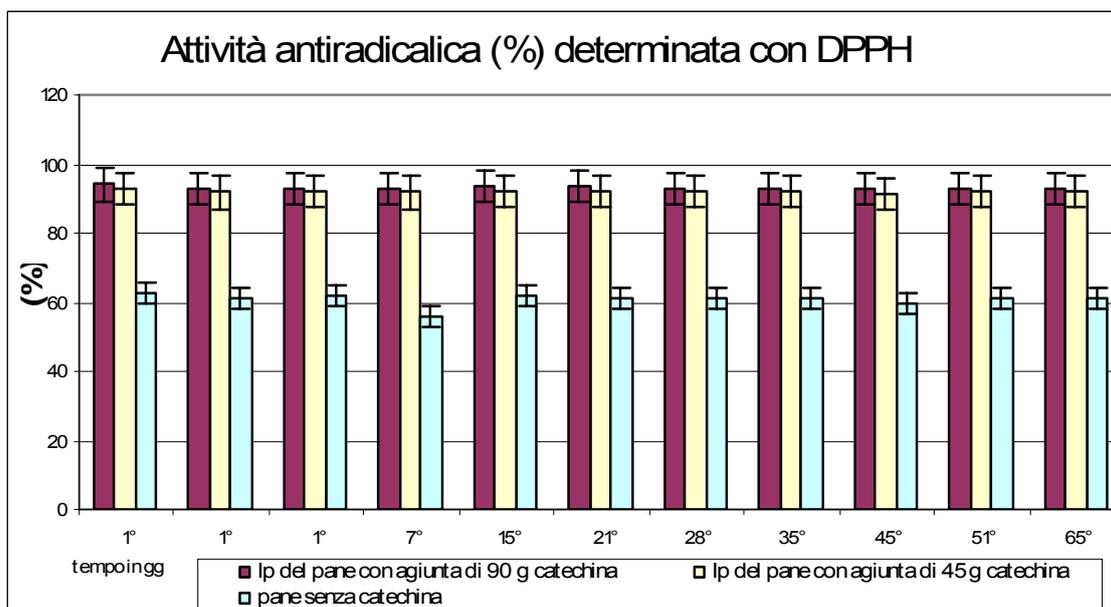


Figura 17: Variazione percentuale dell'attività antiradicalica in funzione del tempo di conservazione.

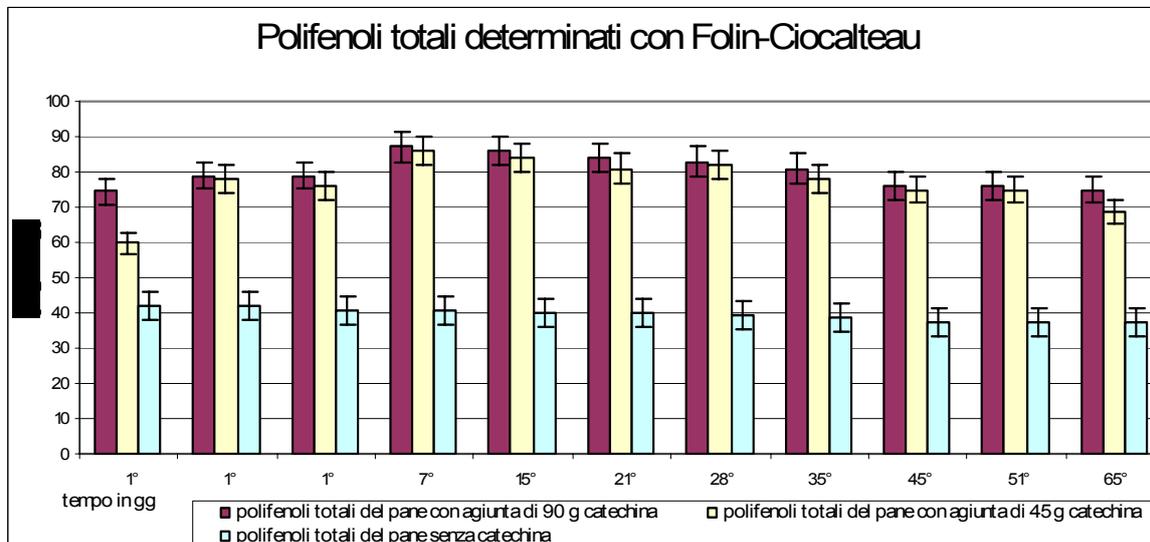


Figura 18: Variazione in funzione del tempo di conservazione della concentrazione di polifenoli totali valutati con la metodica del Folin-Ciocalteu

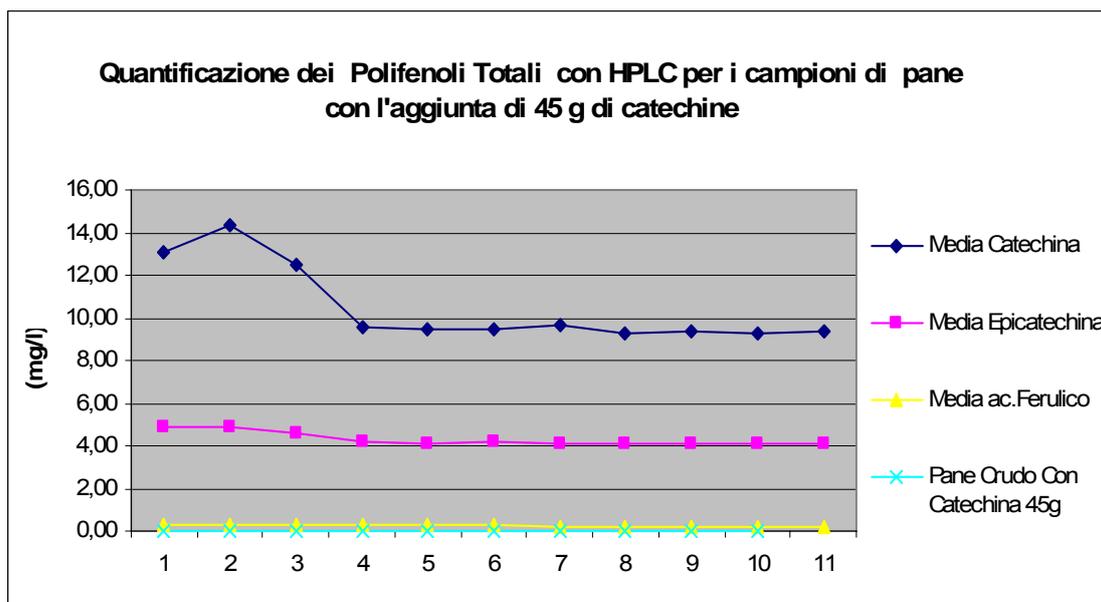


Figura 19: Separazione e caratterizzazione dei polifenoli durante 65 giorni di conservazione.

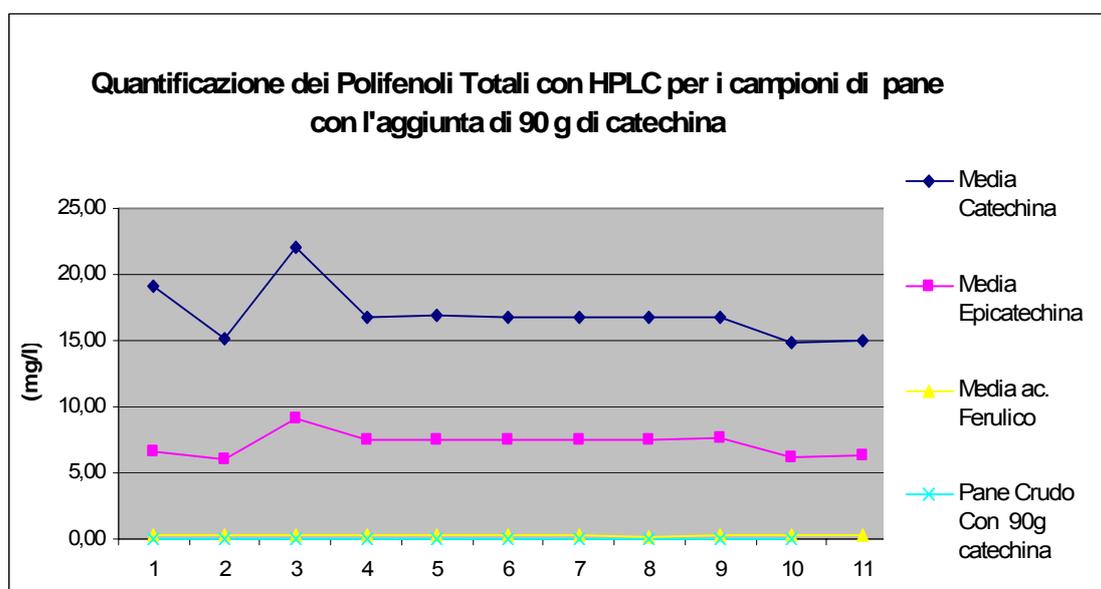


Figura 20: Separazione e caratterizzazione dei polifenoli durante 65 giorni di conservazione.

Osservando la Tabella 7 e la Figura 17, anche nella seconda prova si nota come il pane, a cui è stato aggiunto il principio attivo, mostri mediamente un'attività antiradicalica superiore al 30% ed un maggior contenuto di polifenoli totali rispetto al prodotto lavorato normalmente (Fig.18). Tuttavia i risultati sperimentali non indicano una differenza sostanziale in attività antiradicalica, al variare del contenuto in principio attivo. Il suo raddoppio, infatti, nel pane, ha provocato un aumento medio dell'attività antiradicalica di circa l'1% in più rispetto al pane con 45 g di antiossidante.

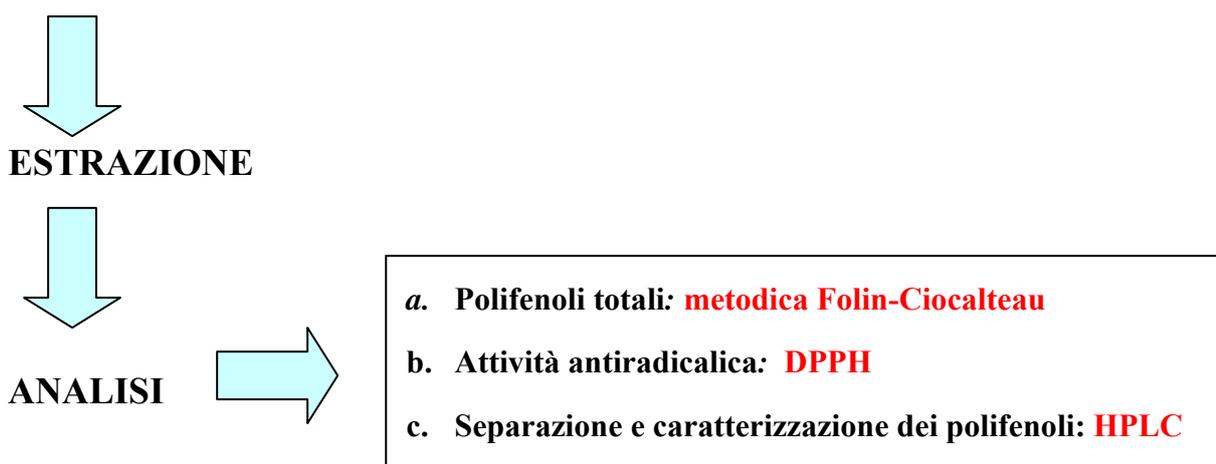
E' stata evidenziata, inoltre, una maggiore uniformità di risposte con il principio attivo aggiunto in forma liquida rispetto a quello utilizzato in precedenza in polvere.

Dopo la seconda prova si conferma che è possibile ottenere un pane surgelato contenente antiossidanti che mantengono la loro attività anche dopo 65 giorni di conservazione a -18°.

8.5 Impostazione della terza prova

Si è proceduto esattamente come riportato per la 1° prova; la differenza sostanziale è stata l'aggiunta di principio attivo (polvere) prima della preparazione dell'impasto e la durata di conservazione di 51 giorni. L'impasto è stato eseguito con 45 g di principio attivo, che servono a preparare 300 panini.

PANE + ESTRATTO POLVERE (aggiunto prima della preparazione dell'impasto insieme alla farina)



8.6 Risultati della terza prova

| | | differenza | | |
|--|-----------|------------|----------|--|
| panini senza catechina appena fatti (crudi) | Ip = 54% | 32 | Ip = 86% | panini con catechina appena fatti (crudi) |
| panini senza catechina dopo la cottura | Ip = 56% | 34 | Ip = 90% | panini con catechina dopo la cottura |
| panini senza catechina subito dopo surgelazione | Ip = 58% | 33 | Ip = 91% | panini con catechina subito dopo surgelazione |
| panini senza catechina surgelati dopo 7 gg di conservazione | Ip = 63% | 30 | Ip = 93% | panini con catechina surgelati dopo 7 gg di conservazione |
| panini senza catechina surgelati dopo 15 gg di conservazione | Ip = 61% | 32 | Ip = 93% | panini con catechina surgelati dopo 15 gg di conservazione |
| panini senza catechina surgelati dopo 21 gg di conservazione | Ip = 58% | 35 | Ip = 93% | panini con catechina surgelati dopo 21 gg di conservazione |
| Panini senza catechina surgelati dopo 28 gg di conservazione | Ip = 60% | 33 | Ip = 93% | panini con catechina surgelati dopo 28 gg di conservazione |
| panini senza catechina surgelati dopo 35 gg di conservazione | Ip = 59% | 31 | Ip = 90% | panini con catechina surgelati dopo 35 gg di conservazione |
| panini senza catechina surgelati dopo 38 gg di conservazione | Ip = 56% | 33 | Ip = 89% | panini con catechina surgelati dopo 38 gg di conservazione |
| panini senza catechina surgelati dopo 45 gg di conservazione | Ip = 50% | 40 | Ip = 90% | panini con catechina surgelati dopo 45 gg di conservazione |
| panini senza catechina surgelati dopo 51 gg di conservazione | Ip = 57 % | 35 | Ip = 92% | panini con catechina surgelati dopo 51 gg di conservazione |

Tabella 8: Determinazione dell'attività antiradicalica dopo 51 giorni di conservazione

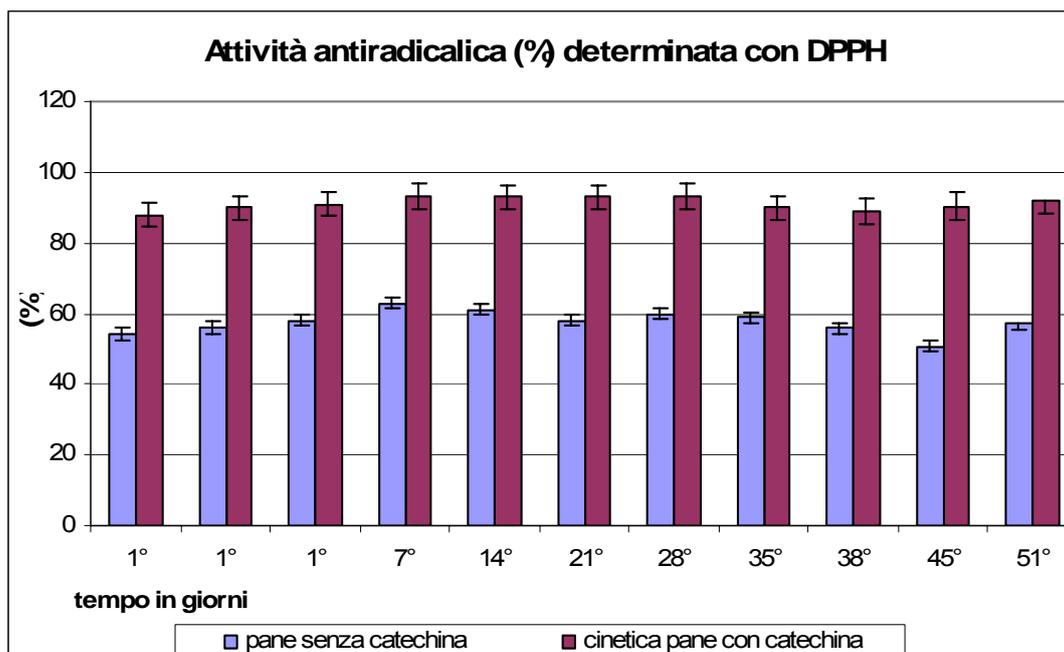


Figura 21: Variazione in percentuale dell'attività antiradicalica in funzione del tempo di conservazione

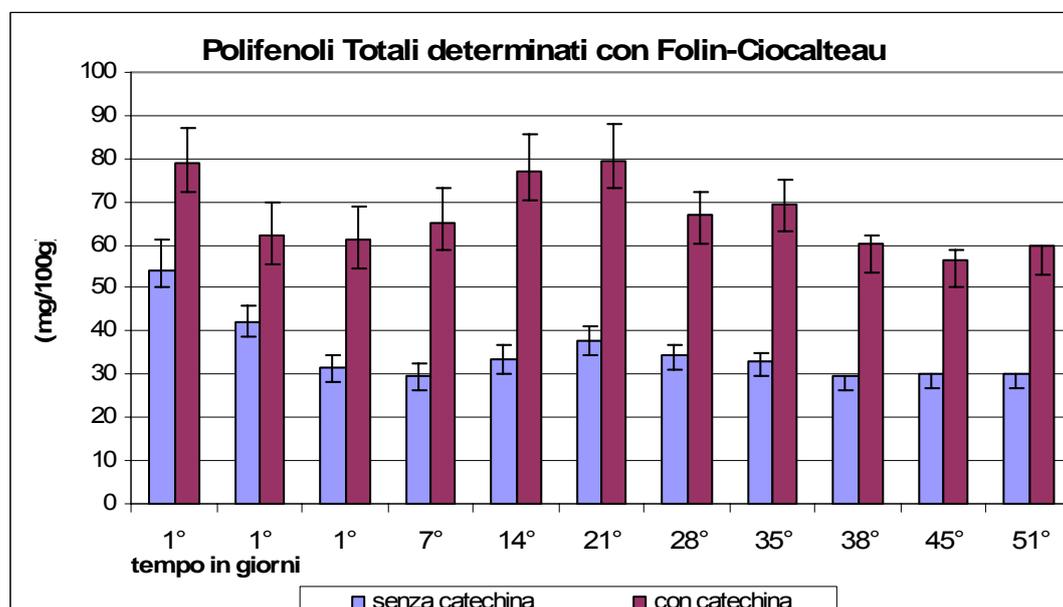


Figura 22: Variazione in funzione del tempo di conservazione della concentrazione di polifenoli totali valutati con la metodica del Folin-Ciocalteu

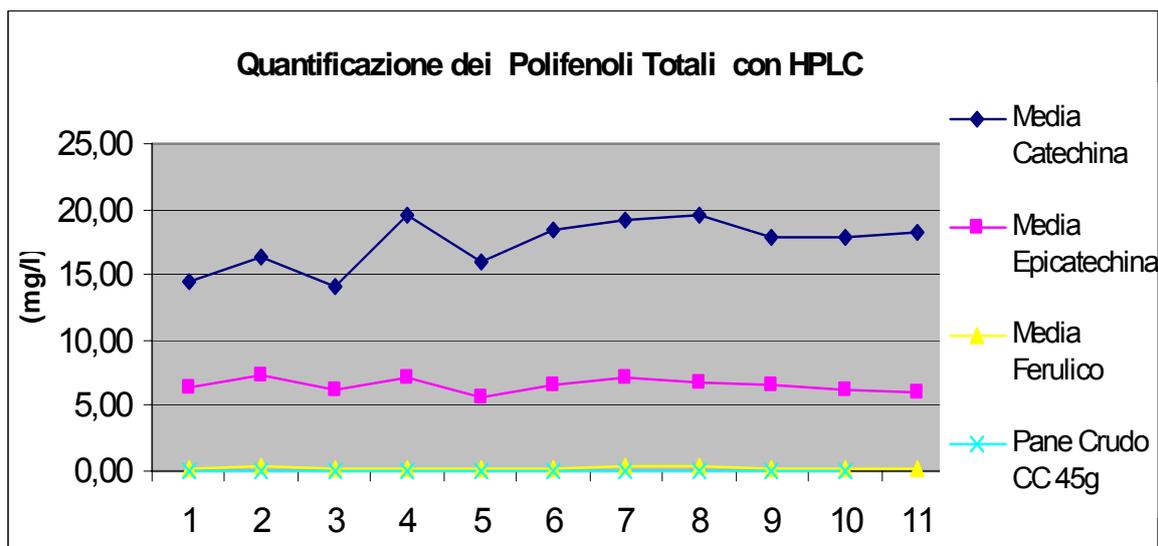


Figura 23: Separazione e caratterizzazione dei polifenoli durante 65 giorni di conservazione

I risultati della terza prova effettuata aggiungendo il principio attivo direttamente alla farina prima dell'impasto mostrano una media dell'attività antiradicalica del 33.4% superiore rispetto ai campioni di pane tal quale (Tab.7 e Fig.21) e naturalmente un contenuto di polifenoli totali sensibilmente più alto (Fig.22). Anche la determinazione delle sostanze fenoliche con HPLC sembra essere più "uniforme" con valori medi di circa 7 e 17 mg/l, rispettivamente, per epicatechina e catechina (Fig.23), vicini a quanto rilevato nella seconda prova in campioni di pane ottenuti con 90 g di principio attivo (Fig.20).

E' stato, quindi, confermato che è possibile preparare un pane surgelato che mantiene durante la sua conservazione a -18°C un discreto contenuto di sostanze antiossidanti di natura fenolica ad azione antiradicalica e che non modifica le sue caratteristiche organolettiche una volta portato in condizioni di consumo.

9 Conclusioni

Possiamo considerare la tesi di Dottorato suddivisa principalmente in due parti: la prima ha riguardato la scelta del sottoprodotto vegetale su cui valutare la presenza o meno di sostanze dotate di proprietà antiossidanti e nel caso specifico delle vinacce, se la normale flora microbica presente potesse con i propri enzimi variarne la struttura con un possibile aumento delle caratteristiche antiossidanti.

Sulla base dei risultati ottenuti possiamo affermare che le vinacce sia vergini che “esauste” di uva Raboso Piave contengono apprezzabili quantità di polifenoli ad elevata attività antiossidante, mentre tra i solventi utilizzati per l'estrazione, la combinazione acqua acidificata ed etanolo sembra rappresentare una buona soluzione anche in termini economici.

L'utilizzo di substrati sintetici quali gli esteri del naftolo e della fluoresceina ci hanno permesso di caratterizzare 9 ceppi di lievito *Saccharomyces cerevisiae* isolati dalle vinacce di Prosecco sulla base della loro attività esterasica. Dall'analisi spettrofotometrica ed elettroforetica degli estratti citoplasmatici si evince che, con alcune eccezioni, non esistono differenze rilevanti tra i 9 ceppi. I risultati ottenuti rappresentano certamente un punto di partenza per ulteriori approfondimenti sull'affinità delle esterasi di lievito verso substrati naturali quali gli antiossidanti esterificati e sulla possibile modificazione delle loro proprietà mediante test *in vitro* e *in vivo*.

Nella seconda parte abbiamo utilizzato estratti commerciali derivati da sottoprodotti dell'industria enologica cioè i vinaccioli, poiché nostra intenzione era quella di approfondire le potenzialità antiossidanti ed antimicrobiche delle molecole fenoliche in essi presenti, nonché la loro successiva aggiunta in un prodotto di largo consumo come il pane. Quindi estratti standardizzati nella composizione, microbiologicamente sicuri e di possibile uso alimentare.

I due test *in vitro*, messi a punto e valutati con un estratto commerciale, hanno evidenziato che essi possono essere utili per capire le potenzialità ed i limiti dei principi attivi studiati. A questo riguardo, la semplicità di esecuzione del saggio su piastra permette di testare contemporaneamente numerosi estratti, facilitando la fase di selezione iniziale. Il test *in vitro* con colture di linfociti bovini, poi, anche se necessita di ulteriori approfondimenti, potrebbe ben rappresentare l'equilibrio intracellulare dinamico tra attività antiossidante e proossidante e costituire un ulteriore strumento per la caratterizzazione di antiossidanti diversi.

Nel caso della preparazione di un alimento funzionale, la metodica utilizzata ci ha permesso di ottenere un pane surgelato contenente composti fenolici, la cui attività antiradicalica rimane inalterata anche dopo 65 giorni di conservazione a -18°C.

Alla fine di questo periodo di conservazione il pane portato in condizioni di consumo presenta:

- gusto-buono
- sapore-“appetitoso “
- colore-leggermente dorato
- consistenza-ottima

La fattibilità del processo è stata, poi, positivamente valutata su scala pilota.

Poiché ultimamente è molto sentita dalla popolazione l'interazione alimento-salute e vi è una continua ricerca da parte del consumatore di cibo che, oltre alla normale funzione nutritiva ed edonistica, aiuti l'organismo a difendersi dagli stress a cui è quotidianamente sottoposto, la Ditta con la quale abbiamo collaborato a realizzare il pane funzionale surgelato sta valutando la possibilità di inserire il prodotto nel proprio circuito commerciale.

La proposta di una nuova tipologia di pane funzionale surgelato, infatti, trova i suoi presupposti nella generale constatazione che l'applicazione della surgelazione del prodotto finito è una tecnologia in rapida crescita nel settore della panificazione. Il successo è sicuramente dovuto alla possibilità di programmare più facilmente i ritmi di produzione aziendali, altrimenti molto onerosi.

In conclusione la produzione di un nuovo pane funzionale surgelato può sicuramente costituire uno strumento di marketing nella nicchia di mercato dei prodotti funzionali, largamente diffusi a livello di GDO (Grande Distribuzione Organizzata), e migliorare le caratteristiche nutrizionali della dieta anche nei modelli ristorativi veloci.

10 Pubblicazioni scientifiche:

- Lante A., Mane E., Spettoli P. “Un approccio alla valorizzazione di vinaccia esausta”.
VI Congresso Nazionale di Chimica degli Alimenti, Alba (Torino), 7-10 Novembre (2006).
- Lante A., Zocca F., Lo molino G., Mane E., Zanoni S., Spettoli P. “Grape pomace polyphenols from distillery to food ingredients”. First International Symposium on Macromolecules and Secondary Metabolites of Grapevine and Wines, Reims, 18-20 May (2006).
- Lante A., Cordeiro Da Silva A., Mane E., Lo molino G., Spettoli P., Gabbai G., Lignitto L. “TEST in vitro per valutare l’attività antiossidante e antimicrobica di un estratto vegetale”. *Ingredienti Alimentari* VI, 35: 14-16 (2007).

11 Bibliografia

- Abramson S.B., Weaver A.L. Current state of therapy for pain and inflammation. *Arthritis Res Ther* 7: S1-S6 (2005).
- Aggarwal B.B., Kumar A., Bharti A.C. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 23: 363-398 (2003).
- Ahmed S., Rahman A., Hasnain A., Lalonde M., Goldberg V.M., Haqqi T.M. Green tea polyphenol epigallocatechin-3 gallate inhibits the IL-1 beta-induced activity and expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human chondrocytes. *Free Radic Biol Med* 33: 1097 -1105 (2002).
- Allinger N.L. Reazioni degli alcani e dei cicloalcani. In chimica organica 575-598 (1982). *Bologna: Ed. Zanichelli*.
- Arts I.C.W. and Hollman P.C.H. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 81: 317S-325S (2005).
- Arvanitoyannis I. A., Ladas D., Mavromatis A. Potential uses and application of treated wine waste: a review. *International Journal of Food and Technology* 40: 1-13 (2005).
- Astley S.B. Dietary antioxidants: past, present and future? *Trends Food Sci Technol* 14: 93-98 (2003).
- Azzi A., Davies K.J.A., Kelly F. Free radical biology: terminology and critical thinking. *FEBS Lett* 558: 3-6 (2004).
- Barbe Ch., Dubourdeu D. Research on contaminating esterase activity in pectolytic preparations. *Technological applications*, France : (N°: 95 BOR2 2003) 1995 .
- Barbehenn R.V., Poopat U., Spencer B. Semiquinone and ascorbyl radicals in the gut fluids of caterpillars measured with EPR spectrometry. *Insect Biochem. Mol. Biol* 33(1):125-30 (2003).
- Bardi L., Dell'Oro V., Delfini C. L'attività esterasica dei lieviti vinari. *Riv. Vitic.Enol* 3: 2-12 (1992).
- Bardi L., Dell'Oro V., Delfini C., Marzona M. A rapid spectrophotometric method to determine esterase activity of yeast cells in an aqueous medium. *J. Inst. Brew.* 99: 385-388 (1993).

- Bechtold T., Mussak R., Mahmud-Ali A., Ganglberger E., Geissler S. Extraction of natural dyes for textile dyeing from coloured plant wastes released from food and beverage industry. *Journal of the Science of food and Agriculture* 86: 233-242 (2006).
- Berger A., Mutch D.M., German J.B., Roberts M.A. Dietary effects of arachidonate-rich fungal oil and fish oil on murine hepatic and hippocampal gene expression. *Lipids Health Disease* 1: 2 (2002).
- Birrell M.A., McCluskie K., Wong S., Donnelly L.E., Barnes P.J., Belvisi M.G. Resveratrol, an extract of red wine, inhibits lipopolysaccharide induced airway neutrophilia and inflammatory mediators through an NF-kappaB-independent mechanism. *FASEB J* 19: 840 -841 (2005).
- Biswas S.K., McClure D., Jimenez L.A., Megson I.L., and Rahman I. Curcumin induces glutathione biosynthesis and inhibits NF-kappaB activation and interleukin -8 release in alveolar epithelial cells: mechanism of free radical scavenging activity. *Antioxid Redox Signal* 7: 32-41 (2005).
- Blanquart C., Barbier O., Fruchart J.C., Staels B., Glineur C. Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J Steroid Biochem Molecular Biol* 85: 267 -273 (2003).
- Bonilla F., Mayen F., Merida J., Medina M. Extraction of phenolics compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. *Food Chemistry* 66: 209-215 (1999).
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* (AN: 76250790) 72: 248-254 (1976).
- Campbell A.M., Evetts J.E. Flux Vortices and Transport Currents in Type II Superconductors. Electrical and Magnetic Phenomena (MD). *Advances in Physics* 21: 9090; 33: 199-428 (3/1972).
- Cavin C., Delannoy M., Malnoe A., Debefve E., Touche A., Courtois D. *et al.*, Inhibition of the expression and activity of cyclooxygenase-2 by chicory extract. *Biochem Biophys Res Commun* 327: 742-749 (2005).
- Culpitt S.V., Rogers D.F., Fenwick P.S., Shah P., De Matos C., Russell R.E. *et al.*, Inhibition by red wine extract, resveratrol, of cytokine release by alveolar macrophages in COPD. *Thorax* 58: 942-946 (2003).
- Curtis H., Barnes N.S. Respirazione in: Le scienze biologiche. *Bologna- Ed. Zanichelli*: 133-137 (1994).

- Dawling S., Roodi N., Mernaugh R.L., Wang X., Parl F.F. Catechol- O-Methyltransferase (COMT)-Mediated metabolism of catechol estrogens: comparison of wild-type and variant COMT isoforms. *Cancer Res* 61: 6716-6722 (2001).
- de Boer V.C., Dihal A.A, van der Woude H., Arts I.C., Wolffram S., Alink G.M. Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. *J Nutr* 135: 1718-1725 (2005).
- Delfini C., Bardi L., Cocito C., Conterno L., Dell'Oro V., Ravaglia S. Aroma composition of the wine as related to grape must contents of oxygen, amino acids, fatty acids and free sterols. Istituto Sperimentale per l'Enologia, Sez. di Microbiologia, I-14100 Asti, Italy. *Symposium International*, 9-10 Fevrier (1993), Montpellier, France(1994).
- Dell'Oro V., Bardi L., Delfini C. Esterasi nei lieviti e nei vini. *Vini d'Italia* 3: 49-54 (1992).
- Deshane J., Chaves L., Sarikonda K.V., Isbell S., Wilson L., Kirk M. *et al.*, Proteomics analysis of rat brain protein modulations by grape seed extract.. *J Agric Food Chem* 52: 7872-7883 (2005).
- Dewanto V. *et al.*, Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3010-3014 (2002).
- Donovan J.L., Bell J.R., Kasim-Karakas S., German J.B., Walzem R.L., Hansen R.J., *et al.*, Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine. *J Nutr* 129: 1662-1668 (1999).
- Donovan J.L., Kasim-Karakas S., German J.B., Waterhouse A.L. Urinary excretion of catechin metabolites by human subjects after red wine consumption. *Br J Nutr* 87: 31-37 (2002).
- Dubourdieu D., A. Sokol., J. Zucca A., Thalouarn C., Dattéc M., Aigle. Identification of yeast strains isolated from wines by their mitochondrial DNA analysis. M - Microbiology of Wine. W0 8803m0003. *Connaiss. Vigne Vin* 21: 267-278 (1987).
- Egan M.E., Pearson M., Weiner S.A., Rajendran V., Rubin I., Glockner-Pagel J. *et al.*, Curcumin, a major constituent turmeric, corrects cystic fibrosis defects. *Science* 304: 600-608 (2004).
- Fang M.Z., Wang Y., Ai N., Hou Z., Sun Y., Lu H. *et al.*, Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res* 63: 7563-7570 (2003).

- Fantozzi P. Tecniche d'estrazione e purificazione di antiossidanti naturali. In antiossidanti naturali negli alimenti. Aspetti tecnologici e qualitativi. *Udine- Ed. Raisa*: 13-33 (1995).
- Fleschhut I., Kratzer F., Rechkemmer G., Kulling S.E. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *Eur J Nutr* 45: 7-18 (2006).
- Fraga M.F., Ballestar E., Paz Maria F., Ropero S., Setien F., Ballestar Maria L. *et al.*, Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 10604-10609 (2005).
- Frankel E.N., Kanner J., German J.B., Parks E., Kinsella J.E. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 341: 454-457 (1993).
- Frankel EN., Meyer AS. The problems of using one dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J Sci Food Agric* 80: 1925-1941 (2000).
- Gayon-Ribèreau P., Glories Y., Maujean A. and Dubourdieu D. The Microbiology of Wine and Vinifications. 3: 454 (2000).
- Gayon-Ribèreau P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. Handbook of Enology, John Wiley & Sons: New York, 1: 288 (2000).
- Gayon-Ribèreau P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. Handbook of Enology. John Wiley & Sons: New York, 2: 188-191 (2000).
- Ghai G., Boyd C., Ghaiszar K., Ho C-T., Rosen R.T. inventors; *Rutgers*, The State University of New Jersey, assignee. Methods of screening foods for nutraceuticals. US patent : 5,955,269. September 21 (1999).
- Gouillet P., Picard B. The electrophoretic polymorphism of bacterial esterases. *FEMS Microbiol. Rev* 16: 7-31 (1995).
- Grimble R.F., Howell W.M., O'Reilly G., Turner-Stephen J., Markovic O., Hirrell S. *et al.*, The ability of fish oil to suppress tumor necrosis factor alpha production by peripheral blood mononuclear cells in healthy men is associated with polymorphisms in genes that influence tumor necrosis factor alpha production. *Am Clin Nutr* 76: 454-459 (2002).
- Gu L., House S.E., Prior R.L., Fang N., Ronis M.J., Clarkson T.B. *et al.*, Metabolic phenotypes of isoflavones differs among rats, pigs, monkeys and women. *J Nutr* 136: 1215-1221 (2006).

- Gu L., Kelm M.A., Hammerstone J.F., Beecher G., Holden J., Haytowitz D. et al., Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *J Nutr* 134: 613-617 (2004).
- Hodgson J.M., Burke V., Beilin L.J., Croft K.D., Puddey I.B. Can black tea influence plasma total homocysteine concentrations? *Am J Clin Nutr* 77: 907-911 (2003).
- Howard C.J. Rate constants for the gas-phase reactions of OH radicals with ethylene and halogenated ethylene compound. *J. Chem. Phys* 65: 4771-4777 (1976).
- Ichiyanagi T., Rahman M.M., Kashiwada Y., Ikeshiro Y., Shida Y., Hatano Y. et al., Absorption and metabolism of delphinidin 3-O-beta-D-glucoside in rats. *Biofactors* 21: 411-413 (2004).
- Industrie alimentari Maggio (2007).
- Jang M., Cai L., Udeani G.O., Slowing K.V., Thomas C.F., Beecher C.W. et al., Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275: 218-220 (1997).
- Jenner A.M., Rafter J., Halliwell B. Human fecal water content of phenolics: the extent of colonic exposure to aromatic compounds. *Free Radic Biol Med* 38: 763-772 (2005).
- Jongen W.M.F., Linnemann A.R. Gli antiossidanti vegetali. In Ruolo delle sostanze antiossidanti della dieta nel mantenimento della salute. *Milano-Centro studi sull'alimentazione Gino Alfonso Sada*: 109-129 (1996).
- Kay C.D., Mazza G.J., Holub B.J. Anthocyanins exist in the circulation primarily as metabolites in adult men. *J Nutr* 135: 2582-2588 (2005).
- Keppler K., Humpf H.U. Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorg Med Chem* 13: 5195-5205 (2005).
- Khan N.S., Ahmad A., Hadi S.M. Anti-oxidant, pro-oxidant properties of tannic acid and its binding to DNA. *Chem. Biol. Inter* 125:177-189 (2000).
- Kliewer S.A., Xu H.E., Lambert M.H., Willson T.M. Peroxisome proliferator-activated receptors: From genes to physiology. *Recent Prog Horm Res* 56: 239-263 (2001).
- Kong A.N., Owuor E., Yu R., Hebbar V., Chen C., Hu R. et al., Induction of xenobiotic enzymes by the MAP kinas pathway and the antioxidant or electrophile response element (ARE/EpRE). *Drug Merab Rev* 33: 255-271 (2001).
- Kormman K.S., Martha P.M., Duff Gordon W. Genetic variations and inflammation: a practical nutrigenomics opportunity. *Nutrition* 20: 44-49 (2004).

- Kubo I., Masuoka N., Xiao P., Haraguchi H. Antioxidant activity of dodecyl gallate. *J. Agric Food Chem* 50(12): 3533-3539 (2002).
- Labieniec M., Gabryelak T. Antioxidative and oxidative changes in the digestive gland cells of freshwater mussels *Unio tumidus* caused by selected phenolic compounds in the presence of H₂O₂ or Cu (2+) ions. *Toxicol In Vitro* 21(1):146-56 (2007).
- Lau F.C., Shukitt-Hale B., Joseph J.A. Beneficial effects of berry fruit polyphenols on neuronal and behavioral aging. *J Sci Food Agric* 86: 2251-2255 (2006).
- Lewin. "Modern Evolutionary Theory," in "*Principles of Human Evolution*" GN281 L489. 4: 29-35 (1998).
- Lewin. "Principles of Human Evolution" in "*Human Evolution as Narrative*" GN281 L489. 2: 11-19 (1998).
- Liu Y., Rosen R.T., Ramji D., Jhoo J-W., Ho C-T., Ghai G.R. *et al.*, Inhibitory effects of black tea constituents on 12 O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced inflammation pro-inflammatory cytokine expression and arachidonic acid metabolism. *Paper presented at: 94th Annual Meeting AACR*. Toronto, Canada (2003).
- Lomolino G., Lante A., Crapisi A., Spettoli P. Studi innovativi dell'attività esterasica in *Saccharomyces Cerevisae* e Industrie delle bevande, Italia. 184: 139-141 (2003).
- Lomolino G., Lante A., Rizzi C., Spettoli P., Curioni A. Comparison of Esterase Patterns of Three Yeast Strains As Obtained with Different Synthetic Substrates *J. Inst. Brew.* 111 (2): 234–236, (2005).
- Lu H., Meng X., Yang C.S. Enzymology of methylation of tea catechins and inhibition of catechol-O- methyltransferase by (-)-epigallocatechin gallate. *Drug Metab Disp* 31: 572-579 (2003).
- Marshall E., Genes in action: Getting the noise out of gene arrays. *Science* 306: 630-631 (2004).
- Mattivi F., Tonon D., Sanchez C. "il buono nei cibi": caratterizzazione di functional food e valutazione di antiossidanti naturali (2001).
- Meagher E., Rader D.J. Antioxidant therapy and atherosclerosis: animal and human studies. *Trends Cardiovasc Med* 11: 162-165 (2001).
- Morton L. W. *et al.*, Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. *Clinical and Experimental Pharmacology and Psycology* 27: 152-159 (2000).
- Murota K., Terao J. Quercetin appears in the lymph of unanesthetized rats as its phase II metabolites after administered into the stomach. *FEBS Lett* 579: 5343-5346 (2005).

- Nakamura K., Kariyazono H., Komokata T., Hamada N., Sakata R., Yamada K. Influence of preoperative administration of omega -3 fatty acid-enriched supplement on inflammatory and immune responses in patients undergoing major surgery for cancer. *Nutrition* 21: 639-649 (2005).
- Natsume M., Osakabe N., Oyama M., Sasaki M., Baba S., Nakamura Y. *et al.*, Structures of (-)-epicatechin glucuronide identified from plasma and urine after ingestion of(-)- -epicatechin: differences between human and rat. *Free Radic Biol Med* 34: 840-849 (2003).
- Nemeth K., Plumb G.W., Berrin I.G., Iuge N., Iacob R., Naim H.Y. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell betaglucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr* 42: 29-42 (2003).
- Ness S.A., Kowenz-Leutz E., Casini T., Graf T., Leutz Myb A. NF-M Combinatorial activators of myeloid genes in heterologous cell types. Zentrum für Molekulare Biologie, Universität Heidelberg (ZMBH), Germany. GENES & DEVELOPMENT. ISSN 0890-9369. 7: 749-759 (1993).
- Olivé C., Teisser E., Duriez P., Rolando C. Effect of catechin o-methylated metabolites and analogues on human LDL oxidation. *Free Radic Biol Med* 34: 850-855 (2003).
- Onaran I., Guven G.S., Ozdas S.B., Kanigur G., Vehid S. Metformin does not prevent DNA damage in lymphocytes despite its antioxidant properties against cumene hydroperoxide-induced oxidative stress. *Mutat Res* 10; 611(1-2):1-8 (2006).
- Ordovas J.M., Corella D., Demissie S., Cupples L.A., Couture P., Coltell O. *et al.*, Dietary fat intake determines the effect of a common polymorphism in the hepatic lipase gene promoter on high - density lipoprotein metabolism. *Circulation* 106: 2315-2321 (2002).
- Ordovas J.M., Mooser V. Nutrigenomics and nutrigenetics. *Curr Opin Lipidol* 15: 101-108 (2004).
- Parkkinen E., Suomalainen H. Esterases of baker's yeast. II. Substrate specificities towards esters formed during sugar fermentations. *J. Inst. Brew.* 88: 34-38 (1982).
- Pégorier J-p., May C.L., Girard J. Control of gene expression by fatty acids. *J Nutr* 134: 2444S-2449S (2004).
- Pinelo M., Del Fabbro P., Manzocco L., Nunez M.J., Nicoli M.C. Optimization of continuous phenol extraction from Vitis Vinifera byproducts. *Food Chemistry* 92: 109-117 (2005).

- Piskula M.K., Terao J. Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J Nutr* 128: 1172-1178 (1998).
- Porrini M., Testolin G. Ruolo salutistico e nutrizionale degli antiossidanti della dieta. *Tecnologie alimentari* 7: 64-70 (1997).
- Rahman I., MacNee W. Lung glutathione and oxidative stress: Implications in cigarette smoke - induced airways disease. *Am J Physiol* 277: L1067 -L1088 (1999).
- Rahman I., MacNee W. Role of oxidants/antioxidants in smoking-induced airways diseases, *Free Rad Biol Med* 21: 669-681 (1996).
- Rahman I., Marwick J., Kirkham P. Redox modulation of chromatin remodeling: impact on histone acetylation and deacetylation, NF-kappa B and pro-inflammatory genes expression. *Biochem Pharmacol* 168:1255-1267 (2004).
- Rampersaud G.C., Kauwell G.P., Hutson A.D., Cerda J.J., Bailey L.B. Genomic DNA methylation decreases in response to moderate folate depletion in elderly women. *Am J Clin Nutr* 72: 998-1003 (2000).
- Rice- Evans C.A., Miller N.J., Pagagna G. Antioxidant properties of Phenolic compounds. *Plant Science* 2(4): 152-157 (1997).
- Rios L.Y., Bennett R.N., Lazarus S.A., Remesy C., Scalbert A., Williamson G. Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *Am J Clin Nutr* 76: 1106-1110 (2002).
- Rizzi C., Lomolino G., Lante A., Crapisi A., Spettoli P., Curioni A. Solubilization and activity detection in polyacrylamide gels of a membrane-bound esterase from an oenological strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Inst. Brew.* 109 (2003).
- Roche H.M. Dietary lipids and gene expression. *Biochem Soc Trans* 32: 999-1002 (2004).
- Rosenkranz A.R., Schmaldienst S., Stuhlmeier K.M., Chen W., Knapp W., Zlabinger G.J. A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescein-acetate. *J Immunol Meth* 156: 39-45, 1992.
- Sandra A., de Oliveira C., Marcos A.C., Maria de Fátima P.S. M. Differential gene expression for isozymes in somatic mutants of *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) Department of Cell Biology and Genetics, State University of Maringá, Avenida Colombo, 5790, 87020-900 Maringá, PR., Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology*, (33) 7: 691-703 (2009).

- Sang S., Lambert J.D., Yang C.S. Bioavailability and stability issues in understanding the cancer preventive effects of tea polyphenols. *J Sci Food Agric* 86: 2256-2265 (2006).
- Schermers F.H., Duffus J.H., MacLeod A. Studies on yeast esterase. *J. Inst. Brew.* 82: 170-174 (1976).
- Sciancalepore V. Sostanze polifenoliche. In *Industrie agrarie. Torino-Ed UTET*: 228-235 (1998).
- Seifert H.E., Anderson D.E., Sorkin B.C., Costello R.B. Free radicals: the pros and cons of antioxidants. Executive summary report. *J Nutr* 134: 3143S-3163S (2004).
- Shogren-Knaak M., Ishii H., Sun J-M., Pazin M.J., Davie J.R., Peterson C.L. Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* 311: 844-847 (2006).
- Sohn H.Y., Son K.H., Kwon C.S., Kang, S.S. Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai. *Phytomedicine* 11(7-8): 666-672 (2004).
- Soldatini G.F. Gli antiossidanti vegetali. Il Ruolo delle sostanze antiossidanti della dieta nell mantenimento della salute. *Milano-Centro studi sull'alimentazione Gino Alfonso Sada*: 67-105 (1996).
- Soldatini G.F. Gli antiossidanti vegetali. *Tecnologie alimentari* 7: 71-86 (1997).
- Song Y., Sonawane N.D., Salinas D., Qian L., Pedemonte M., Galletta L.J. *et al.*, Evidence against the rescue of defective Delta F508-CFTR cellular processing by curcumin in cells, culture and mouse models. *J Biol Chem* 279: 40629-4063 (2004).
- Soumalainen H. Yeast esterases and aroma esters in alcoholic beverages. *Journal of the Institute of Brewing* 87: 296-300 (1981).
- Subbaramaiah K., Bulic P., Lin Y., Dannenberg A.J., Pasco D.S. Development and use of a gene promoter-based screener to identify novel inhibitors of cyclooxygenase-2 transcription *J Biomol Screen* 6: 101-110 (2001).
- Surh Y.J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemical *Nat Rev Cancer* 3: 780-798 (2003).
- Surh Y.J., Chun K.S., Cha H.H., Han S.S., Keum Y.S., Park K.K. *et al.*, Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat Res* 480-481: 243-268 (2001).

- Talavera S., Felgines C., Texier O., Besson C., Gil-Izquierdo A., Lamaison J.L. *et al.*, Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain. *J Agric Food Chem* 53: 3902-3908 (2005).
- *Tecnologie alimentari*, Gennaio / Febbraio (2006).
- *Tecnologie alimentari*, Gennaio / Febbraio (2007).
- *Tecnologie alimentari*, Novembre / Dicembre (2004).
- *Tecnologie alimentari*, Novembre / Dicembre (2005).
- *Tecnologie alimentari*, Settembre (2004).
- *Tecnologie alimentari*, Settembre (2005).
- Temple N.J. Antioxidants and disease: more questions than answers. *Nutr Res* 20: 449-459 (2000).
- Tirosh O., Reznick Z.A. Chemical bases and biological relevance of protein oxidation. In *Handbook of oxidants and antioxidants in exercise. Elsevier B.V.* 89-114 (2000).
- Tsang C., Auger C., Mullen W., Bornet A., Rouanet JM., Crozier A. *et al.*, The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins following the ingestion of a grape seed extract by rats. *Br J Nutr* 94: 170-181 (2005).
- Van Oss J.L., Lameris S.A., Doodewaard J., Oostendrop J. G. Diffusion Test for the determination of antibiotic residues in milk. *Neth. Milk Dairy J.* 29:16 (1975).
- Vinson J.A. *et al.*, Phenol Antioxidants. Quantity and Quality in Foods: Vegetables. *Journal of Food Chemistry of Agriculture* 46: 3630-3634 (1998).
- Vinson J.A. *et al.*, Phenol Antioxidants. Quantity and quality in Foods: Fruits. *Journal of Food Chemistry of Agriculture* 49: 5315-5321 (2001).
- Vita J.A., Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *Am J clin Nutr* 81: 292S-297S (2005).
- Weisburger J.H. Eat to live, not live to eat. *Nutrition* 16: 767-773 (2000).
- Witztum J.L., Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc Med* 11: 93-102 (2001).
- Wu X., Pittman H.E., McKay S., Prior R.L. Aglycones and sugar moieties alter anthocyanin absorption and metabolism following berry consumption in the weanling pig. *J Nutr* 135: 2417-2424 (2005).
- Wu X., Pittman H.E., Prior R.L. Pelargonidin is absorbed and metabolized differently than cyanidin after marionberry consumption in pigs. *J Nutr* 134: 2603-2610 (2004).
- Yamamoto H., Hanada K., Kawasaki K., Nishijima M. Inhibitory effect on curcumin on mammalian phospholipase D activity. *FEBS Lett* 417: 196-198 (1997).

- Yang F., de Villiers W.J., McClain C.J., Varilek G.W. Green tea polyphenols block endotoxin -induced tumor necrosis factor production and lethality in a murine model. *J Nutr* 128: 2334-2340 (1998).
- Yilmaz Y., Toledo R. T. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 41-48 (2006).
- Zern T.L., Wood R.J., Greene C., West K.L., Liu Y., Aggarwal D. *et al.*, Grape polyphenols exert a cardioprotective effect in preand postmenopausal women by lowering plasma lipids and reducing oxidative stress. *J Nutr* 135: 1911-1917 (2005).
- Zocca F., Lomolino G., Curioni A., Spettoli P., Lante A. Detection of pectinmethylesterase activity in presence of methanol during grape pomace storage. Padova. Italy, *Food Chemistry, Volume (102.) 1: 59-65*(2006).

Acknowledgements

Throughout the course of this *PhD* study numerous people were of immense help and to whom I would like to express my sincere gratitude.

First and foremost, I wish to thank ***Prof. Paolo Spettoli*** for his tremendous supervision, advice and critical reading of this thesis.

I also wish to thank ***Prof. Anna Lante, Researcher Giovanna Lomolino*** and ***Prof. Gianfranco Gabbai*** for their excellent supervision and help during my PhD in ITALY. I also wish to thank ***Dr Stefania Zanoni*** and ***Dr Luca Gregoletto*** for pursuing some experiments and for their excellent technical assistance. Sincere thanks to ***Dr Laura Lignitto, Dr Alexandre Cordeiro Da Silva*** for their help and for their excellent collaboration! Thank you for introducing me to the magical world of Scienze!!

Special thanks to ***Prof. Anna Lante***, who has been my “Italian mum and friend”!

Special thanks to ***Prof. Giorgio Franceschetti*** for his fundamental help and understanding especially in the last few months of PhD, which have been extremely difficult for me!

I wish to express my sincere thanks to all my special friends: ***Prof. Laura Secco, Dr Nagla Dawelbait, Dr Elena Pisani, Dr Gianluca Santi, Dr Mauro Masiero,*** and ***Dr Diego Florian*** for the immense help to me for understanding and living in the Italian reality.

Thanks for helping me out with the Italian language and forcing me to learn it, especially ***Dr Luciano Magro***! I am grateful to you.

*Il più sentito ringraziamento per **Dr Luigi Cavestro** ed i suoi meravigliosi genitori **Gianni e Luciana**, ai quali devo tanto! Senza di voi sarebbe stato molto più difficile! Vi sarò sempre grata.*

*Ndiej per detyrë morale të falenderoj profesorin e nderuar shqiptar **Ilirjan Malollari**, për frymëzimin dhe vendosmërine, me te cilën më ka shtyrë ti futem rrugës së vështirë të shkencës. Ju faleminderit Profesor! Rruga që më këshilluat ka qenë shumë e vështirë por jo e pamundur dhe ka ndryshuar jeten time në mënyrë shume pozitive. Shpresoj të mos kem zhgënjyer besimin e madh që keni demonstruar ndaj meje në momente vendimtare.*

Këtë Doktoraturë Shkencore me gjithë mundimin dhe sakrificat që kam përballuar, ia kushtoj familjes time të shtrenjtë në Shqipëri!

Babait tim të mbrekullueshëm Z. Nexhmedin Mane,

Nënës time të përkryer Znj. Lumturi Mane,

Motrës time të dashur që po bëhet shembull i përkryer për sjelljen dhe zotësinë në Universitetin e Padovas në Itali: Erionila Mane,

Vëllait tim të adhureshëm Endrit Mane, që s'ka asnjë difekt dhe besoj s'do me zhgënjejë!