

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI
BOLOGNA
CAMPUS DI CESENA
SCUOLA DI AGRARIA E MEDICINA VETERINARIA
CORSO DI LAUREA IN TECNOLOGIE ALIMENTARI

DIGERIBILITÀ E BIOACCESSIBILITÀ DI COMPOSTI
BIOATTIVI IN DIVERSE CULTIVAR DI PEPERONI DOLCI

Relazione finale in
Scienze dell'Alimentazione

Relatore
Prof.ssa Alessandra Bordoni

Presentata da
Giulia Ragazzini

Correlatore
Dott.ssa Veronica Valli

Sessione II

Anno Accademico 2014-2015

Indice

1. <i>I peperoni</i>	5
1.1 Storia e origine.....	5
1.2 Specie e varietà.....	7
1.2.1 <i>Capsicum Annuum L</i>	7
1.3 Caratteristiche botaniche del gruppo <i>Capsicum Annuum</i>	8
1.4 Esigenti colturali.....	10
1.5 Aspetti nutrizionali.....	11
1.5.1 <i>Vitamina C</i>	13
1.5.2 <i>Vitamina A e carotenoidi</i>	14
1.5.3 <i>Polifenoli</i>	18
2. <i>La digestione</i>	22
2.1 Il sistema digerente.....	22
2.2 La bocca.....	24
2.3 L'esofago.....	26
2.4 Lo stomaco.....	26
2.5 L'intestino tenue.....	29
2.6 Il fegato e la bile.....	31
2.7 Il pancreas esocrino.....	32
2.8 L'intestino crasso.....	34
2.9 La digestione in vitro.....	35
2.9.1 <i>La fase orale</i>	35
2.9.2 <i>La fase gastrica</i>	36
2.9.3 <i>La fase duodenale</i>	36
2.10 Recenti applicazioni della digestione <i>in vitro</i>	36
2.11 Cost Action Infogest.....	37
3. <i>Scopo della tesi</i>	39
4. <i>Materiali e metodi</i>	42
4.1 Campioni analizzati.....	42
4.2 Estrazione con solvente.....	42
4.3 Digestione in vitro.....	43
4.4 Valutazione del contenuto fenolico totale.....	44
4.5 Valutazione del contenuto di acido ascorbico.....	46
4.6 Valutazione della capacità antiossidante totale.....	46
4.7 Valutazione della digeribilità e della bioaccessibilità.....	47
4.8 Analisi statistica.....	48
5. <i>Risultati</i>	49
5.1 Contenuto fenolico totale.....	49
5.2 Contenuto di vitamina C.....	51
5.3 Capacità antiossidante totale.....	53

6. <i>Discussione</i>	58
<i>Riferimenti Bibliografici</i>	63

Capitolo 1

I peperoni

1.1 Storia e origine

Il peperone ha origini molto antiche risalenti circa a 12000 anni fa in popolazioni dell'emisfero occidentale che gli attribuivano proprietà mistiche e spirituali. Civiltà come Inca, Maya e Aztechi ritenevano i peperoni frutti sacri, offrendoli come dono agli Dei durante i digiuni in segno di sacrificio. Inoltre, lo utilizzavano come mezzo di scambio e lo assumevano per le proprietà medicinali. I Maya infatti usavano i frutti come rimedio per tosse, asma e mal di gola; gli Aztechi invece ne usufruivano come cura per il mal di denti.

Le capsicine, alcaloidi responsabili della piccantezza dei peperoni, sono usate tuttora in creme per alleviare il dolore e come rimedio per l'artrite.

In Europa, il peperone si diffuse dopo la sua scoperta da parte di Cristoforo Colombo nel 1493.

Grazie alle sue caratteristiche organolettiche il peperone ha assunto un ruolo preponderante nel mercato moderno. Nel settore ortofrutticolo mondiale vengono prodotte innumerevoli varietà di peperone, tanto che oggi risulta tra gli ortaggi freschi di cui si coltivano più varietà.

1.2 Specie e Varietà

Il peperone appartiene al genere *Capsicum* parte della vasta famiglia di origine tropicale delle Solanaceae, che comprende anche pomodoro, patata e tabacco. Secondo alcuni il nome deriva dal latino *capsa* che significa “scatola”, attribuitogli per la morfologia. Per altri deriva dal greco *kapto*, che significa “mordere”, probabilmente per il sapore mordente della piccantezza.

Tutte le specie di *Capsicum* hanno origine dall'emisfero occidentale, tranne il *Capsicum anomalum* di origine asiatica. La prima classificazione botanica risale al 1699, in cui Morrison pubblicò *Plantarum Historiae Universalis Oxoniensis*,

individuando 33 varietà di peperoni. Nel 1953 Heiser e Smith suddivisero il genere *Capsicum* in quattro specie: *annuum*, *frutescens*, *baccatum* e *pubescens*.

Attualmente fanno parte del genere *Capsicum* 25 specie selvatiche e 5 specie domestiche: *Capsicum Annuum*, *Capsicum Pubescens*, *Capsicum Baccatum*, *Capsicum frutescens*, *Capsicum Chinense*.

Le specie possono essere raggruppate in tre complessi in base all'origine geografica, le caratteristiche morfologiche, l'analisi genetica, biochimica, molecolare, le modalità riproduttive. Tali complessi racchiudono le specie domestiche sopra citate e le corrispondenti specie selvatiche derivanti da un pool genetico primario comune.

- **Il complesso pubescens** individua il *C. pubescens* come specie addomesticata. Venne scoperta per la prima volta nel 6000 a.C. e viene coltivata nelle regioni dal Messico al Perù. La pianta ha fiori color porpora e semi neri. Il frutto è carnoso e succoso, di forma allungata o sferica, di colore rosso, giallo o arancione. È un peperone adatto alle alte temperature. Le corrispondenti specie selvatiche sono *C. cardenasii* e *C. eximium*.

- **Il complesso baccatum** racchiude specie i cui frutti sono di solito allungati e differiscono molto per la piccantezza e il colore. Hanno origine nelle zone che si estendono dal sud ovest del Brasile fino all'Oceano Pacifico. *C. Baccatum* var. *Pendulum* include le forme domestiche mentre *C. Baccatum* var. *Baccatum* è la forma selvatica con frutti di solito ovali, di piccole o medie dimensioni e di piccantezza bassa o media. Il gruppo *baccatum* comprende anche come specie selvatiche *C. praetemisum* e *C. trovarii*.

- **Il complesso annuum** distingue come specie domestiche *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, che sono diventate le specie più importanti a livello commerciale; mentre le corrispondenti selvatiche sono *C. galapagonense* e *C. chacoens*. *C. annuum*. Originario del Messico, comprende tutte le varietà più conosciute e diffuse di peperoni e peperoncini. *C. Chinense* è coltivata in USA, Centro America, Sud America, India, Cina, Giappone, Africa. Si distingue molto per forma, colore, dimensione e piccantezza. I colori possono infatti variare da giallo, marrone a violetto. Il tipo Habanero è noto per essere il più piccante al mondo. *C. frutescens* è stata addomesticata a Panama probabilmente e si è diffusa in Messico e nei Caraibi. Ha un frutto allungato, appuntito, o tondeggiante, rosso o giallo, di piccole o medie

dimensioni, spesso deciduo e rugoso. La cultivar Tabasco è la più conosciuta e coltivata per la preparazione della salsa di Tabasco.

La tassonomia suddivide i frutti in specie, in base alle caratteristiche genetiche, ma non considera rilevante la distinzione per varietà, che per il commercio risulta essere estremamente comoda in quanto è una distinzione più qualitativa che comprende criteri come forma, aroma e colore.

I parametri dell'orticoltura, che dividono i raccolti per cultivar e per i peperoni anche per forma, sono ampiamente utilizzati dal settore industriale. Ad oggi infatti esistono più di 3000 varietà tra peperoni e peperoncini: per orientarsi all'interno di tale abbondanza esiste una classificazione riferita al pod-type, come spiegato da Bosland P.W e Votava E.J. (2000), che tiene conto di forma, colore, dimensioni, piccantezza e destinazione del frutto. La nomenclatura contempla quindi, oltre al genere e alla specie, i pod-type di riferimento e infine la cultivar.

1.2.1 Capsicum annuum L.

La specie *Capsicum annuum* è la più diffusa a livello globale e include molti dei “chile peppers” messicani, i peperoni piccanti coltivati in Asia e Africa e le numerose cultivar di peperone dolce diffuse in Nord America e Europa. Un tempo se ne individuavano le varietà in base a forma e dimensioni del frutto, per esempio *Capsicum annuum var. cerasiforme, conoides, fasciculatum, grossum, longum*. Oggi invece la specie viene suddivisa in tantissimi pod-types.

Bell pod type ingloba tutti i peperoni dolci e la più ampia gamma di cultivar.

I frutti possono essere verdi, gialli, viola o anche con sfumature arancioni, gialle, verdi e marroni. In America si preferiscono cultivar di forma quadrata a fondo piatto tra cui una delle più antiche e apprezzate è la California Wonder. In Europa si coltiva un peperone allungato, il La Muyo dal fondo non piatto, con frutti allungati, sia rossi che verdi. In Italia tra le cultivar più caratteristiche troviamo Giallo o Rosso di Nocera, dalla forma più quadrata; Corno di Toro (Figura 1.1) di forma a corno; lungo di Nocera, dalla forma più allungata.

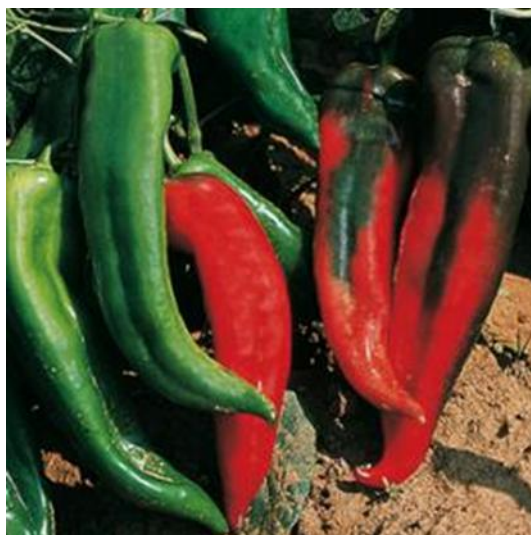


Figura 1.1 Cultivar Corno di Toro

Altro esempio di pod type che racchiude frutti non piccanti è il **Pimento**, a forma di cuore e con pareti molto spesse.

Tra i pod types piccanti di *Capsicum annuum* troviamo invece **Cayenne** con frutti rossi, rugosi, lunghi fino a 15 cm e curvi, molto piccanti; **Jalapeño** con varietà molto piccanti o dolci, di forma conica; **Serrano** è ancor più piccante del precedente e ha frutti rossi, marroni o arancioni; **New Mexican** di forma allungata e molti altri.

1.3 Caratteristiche botaniche del gruppo *Capsicum annuum*

Capsicum annuum nei nostri climi è una pianta erbacea annuale, con caratteristiche prevalentemente brevidiurne, con una durata ottimale del fotoperiodo di circa 12 ore al giorno ad accrescimento determinato o indeterminato nelle forme coltivate. La pianta presenta fusti eretti, con molte ramificazioni. Le radici sono tendenzialmente a sviluppo superficiale. Le foglie sono semplici, alterne a margine interno, ceroso. I fiori sono ermafroditi, a grappoli più o meno densi all'ascella delle foglie, in *Capsicum annuum* di colore bianco, con sei petali. Dal punto di vista botanico il frutto è una bacca che può essere sia eretta che pendula in base alla disposizione dei fiori. In base alla forma della bacca si distinguono i peperoni quadrati, i rettangolari e i conici. Lo sviluppo della forma dipende dalla divisione cellulare. I frutti che hanno forma a punta devono la loro morfologia al fatto che tale estremità cresce nella parte finale del fiore in cui si ha una minore divisione e moltiplicazione cellulare.

Il frutto (Figura 1.2) è sostenuto da un peduncolo più o meno lungo, con l'apice di forma trilobata. Il pericarpo è formato da cellule epidermiche ordinate con una spessa cuticola che si differenzia dalla buccia. L'esocarpo è sottile e lucente, l'endocarpo e la placenta sono membranacei, mentre il mesocarpo è carnoso. Lo strato più interno del frutto è costituito da cellule epidermiche, cellule di parenchima, cloroplasti e fasci vascolari, mentre lo strato esterno è costituito in maggior parte da una serie di fila di cellule non presenti nella parte più interna.

All'interno, il frutto è in parte cavo, in quanto privo di liquido membranaceo. Presenta l'ovario con tre loculi e di conseguenza tre logge sulle cui placente si inseriscono i semi. Nonostante esistano varietà senza semi, soggette a partenocarpia, in genere essi sono numerosi e sono divisi dalla placenta centrale, contenente le vescicole per la produzione di oleoresina e capsaicinoidi, metaboliti secondari sintetizzati a partire da fenilalanina e valina, la cui funzione principale è fornire nutrimento proprio per la crescita dei semi. Questi ultimi, essendo appunto localizzati sulla placenta, tendono ad assorbire la capsaicina, alcaloide tra i capsaicinoidi, principalmente responsabile della piccantezza del frutto. La concentrazione di capsaicina ha inoltre permesso a Wilbur Scoville nel 1912 di elaborare la scala Scoville con cui si misura proprio la piccantezza in Scoville Heat Unit (SHU). I peperoni dolci hanno valori da 0 a 50 su tale scala, mentre i peperoncini più piccanti, come l'Habanero, arrivano a valori di 16.000.000.

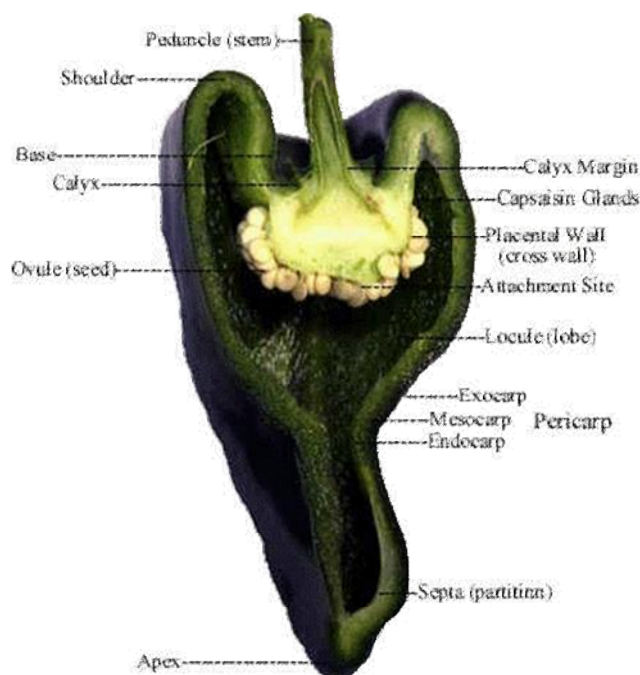


Figura 1.2 Sezione del frutto di peperone

All'interno dei semi di peperoni ritroviamo, tra i capsaicinoidi, anche il **capsidiolo**, una nota fitoalessina ad azione fungistatica contro i patogeni. Recentemente sono stati isolati quattro capsianosidi, glicosidi terpenici ciclici, nei frutti di *Capsicum Annuum*. È stata dimostrato che possiede proprietà batteriostatiche *in vitro* contro *Helicobacter pylori* (De Marino S. et al., 2006). L'aroma invece è determinato da una serie di molecole differenti anche a seconda del tipo di frutto: una delle molecole più potenti nei peperoni verdi è una **pirazina**, composto eterociclico aromatico, la 2 metossi-3 isobutil-pirazina.

Durante la crescita del frutto, la clorofilla diminuisce e aumenta il contenuto di carotenoidi. Il complesso di carotenoidi presenti nei peperoni è molto diverso da quello contenuto ad esempio nei pomodori. Il contenuto e il tipo di carotenoidi dipendono dal tipo di buccia, e sono controllati dal genotipo e dal terreno in cui cresce la pianta (Hornero-Méndez D. et al., 2000).

1.4 Esigenze colturali

Il peperone è una pianta macroterma, sensibile al freddo che viene seminata in febbraio e raccolta nei mesi primaverili-estivi. I semi germinano rapidamente a temperature tra i 25 e 38°C. L'optimum di crescita è tra i 21 e 38°C, per l'allegagione è tra i 20 e 25°C e per lo sviluppo del colore tra i 18 e 24°C. Le piante non sono sensibili al fotoperiodo per la fioritura. I frutti di piccole dimensioni sono più tolleranti alle alte temperature. I peperoni richiedono terreni molto fertili, con concimazione di 120-150 unità d'anidride fosforica e 250 unità d'ossido di potassio da distribuirsi poco prima della piantagione, lasciando la concimazione azotata per la somministrazione in copertura, da calcolarsi in ragione di 140-150 unità d'azoto sotto forma nitroammoniacale. Il peperone è molto sensibile ai valori di salinità e mineralizzazione del terreno che dovrà rispettare pH tra 6.5 e 7. Richiede, inoltre frequenti innaffiature, in quanto risente di carenze idriche. Il trapianto in pieno campo si effettua verso il mese di maggio e la raccolta, scalare, ha inizio dopo circa due mesi da esso. I primi frutti che si formeranno alla base saranno più grossi e la loro polpa più spessa, mentre quelli in alto, soprattutto a fine stagione, saranno più piccoli e sottili.

1.5 Aspetti nutrizionali

In base alla loro composizione in nutrienti, gli alimenti sono stati suddivisi in diversi gruppi che compongono la cosiddetta “piramide alimentare”. Ad ogni gradino della piramide si trovano alimenti che devono essere consumati in quantità diverse: quelli situati al vertice dovrebbero essere consumati in piccole quantità, mentre gli alimenti che si trovano alla base andrebbero consumati con più frequenza e in quantità maggiori (Figura 1.3).

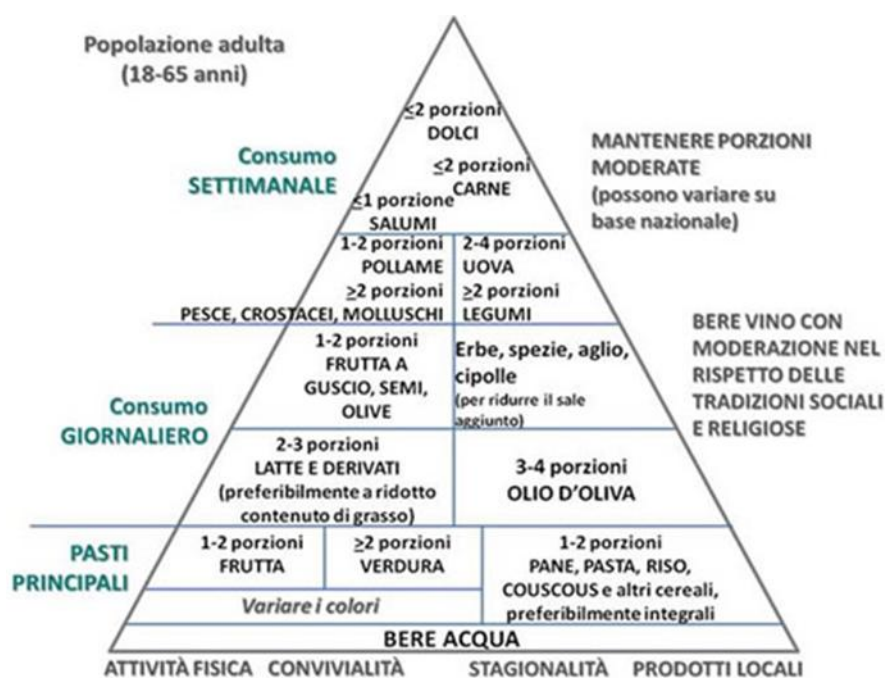


Figura 1.3 La piramide alimentare (www.inran.it)

I vegetali si trovano verso la base della piramide, infatti il loro tenore in grassi e l'apporto calorico complessivo sono limitati ma nello stesso tempo questi alimenti assicurano un rilevante apporto di fibra, vitamine, minerali, acidi organici e altre sostanze ad azione protettiva.

Il peperone è composto da un'altra percentuale di acqua, oli, carotenoidi, capsaicinoidi, resine, proteine, fibre e minerali (Tabella 2.1).

I carboidrati sono rappresentati da zuccheri semplici, pentosani e fibre solubili. Il contenuto di zuccheri varia a seconda della cultivar. La fibra e la cellulosa sono circa il 20% del peso secco del tessuto pericarpale (Bosland P.W., Votava E.J., 2000).

Il contenuto totale di **lipidi** è pressoché marginale e principalmente presente nei semi. I trigliceridi sono circa il 60% dei lipidi, composti principalmente da acido palmitico, linoleico e linolenico.

Le proteine sono contenute nel pericarpo e nei semi. Tramite studi effettuati in Ungheria (Somos A., 1984) sono stati individuati gli amminoacidi presenti nel peperone: lisina, arginina, prolina, tirosina, triptofano, metionina, valina, fenilalanina, leucina, acido glutammico, glicina, asparagina, alanina e treonina.

Tabella 2.1 Caratteristiche nutrizionali del peperone per 100 grammi di prodotto

Composizione chimica	valore per 100g
Parte edibile (%):	82
Acqua (g):	92.3
Proteine (g):	0.9
Lipidi(g):	0.3
Carboidrati disponibili (g):	4.2
Zuccheri solubili (g):	4.2
Fibra totale (g):	1.9
Fibra solubile (g):	0.43
Fibra insolubile (g):	1.47
Energia (kcal):	22
Sodio (mg):	2
Potassio (mg):	210
Ferro (mg):	0.7
Calcio (mg):	17
Fosforo (mg):	28
Tiamina (mg):	0.05
Riboflavina (mg):	0.07
Niacina (mg):	0.5
Vitamina A retinolo eq. (µg):	139
Vitamina C (mg):	151

Fonte: INRAN- tabelle di composizione degli alimenti

Il peperone ha un alto contenuto vitaminico, la cui quantità dipende dalla maturazione, dalla crescita e dalla cultivar. Oltre ad avere una concentrazione elevata di **vitamina C**, è ricco di **provitamina A**, **tiamina (B1)**, **riboflavina (B2)** e **niacina (B3)**. In questo frutto è presente anche la **vitamina E**: i semi contengono γ -tocoferolo, mentre il pericarpo contiene α -tocoferolo, la cui quantità dipende dal contenuto lipidico, che varia a seconda della cultivar e del grado di maturazione.

L'attenzione nutrizionale va però focalizzata su vitamina C, carotenoidi e composti fenolici, le cui concentrazioni nel peperone sono significative, rendendolo un potente antiossidante.

Gli antiossidanti sono sostanze in grado di prevenire l'azione negativa dei radicali liberi, molecole altamente instabili e molto reattive, che hanno uno o più elettroni spaiati negli orbitali esterni e per completare il loro ottetto sottraggono elettroni ad altre molecole, innescando così reazioni a catena con elevata produzione di molecole radicaliche. Quando la produzione di radicali è elevata, questi vanno ad interagire con le macromolecole danneggiandole, e provocando numerose alterazioni nella biochimica delle cellule che si ripercuotono dapprima sullo stato cellulare ed in seguito su quello tissutale. Proteine, lipidi, carboidrati, acidi nucleici sono tutti bersagli dell'azione lesiva dei radicali, considerati addirittura implicati nell'eziopatogenesi di diverse malattie.

Il sistema di difesa dai radicali liberi, secondo una suddivisione rilevante in campo nutrizionale, è classificabile in antiossidanti esogeni ed endogeni. Quest'ultimo gruppo comprende molecole e sistemi enzimatici biosintetizzati dall'organismo umano. I fattori esogeni comprendono, invece, composti antiossidanti non biosintetizzabili e che quindi devono essere assunti con la dieta. In questo gruppo si possono distinguere due categorie: quelli considerati nutrienti, vitamine e sali minerali, e altri che non sono considerati tali, ma che hanno tuttavia un ruolo nella difesa contro lo stress ossidativo, come i composti fenolici, i fitoestrogeni, i carotenoidi non vitaminici e i glucosinolati.

1.5.1 Vitamina C

La vitamina C o acido ascorbico fa parte delle vitamine idrosolubili, si presenta come forma enolica del 3-cheto-L-gulofuranolattone con alto potere riducente, grazie all'enediolo, formato da due ossidrili e due carboni interposti in un doppio legame. È una molecola che quindi perde facilmente elettroni e può essere definita un potente antiossidante, in grado di donare elettroni a radicali liberi. L'intermedio che si forma nelle numerose reazioni in cui può intervenire l'acido ascorbico è il deidroascorbato, che può essere nuovamente ridotto e riutilizzato (Figura 1.4).

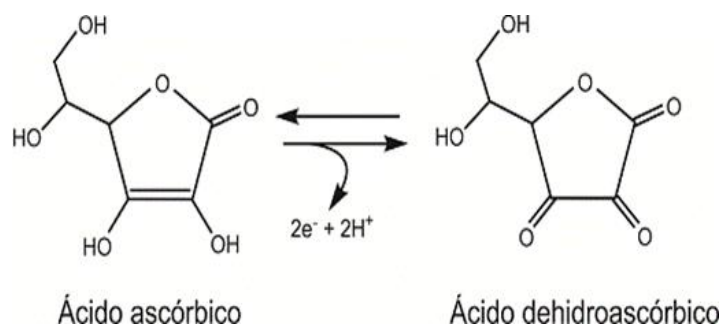


Figura 1.4 Reazione di ossidoriduzione dell'acido ascorbico/deidroascorbico

L'uomo, a differenza di altri animali, non è in grado di sintetizzare vitamina C, in quanto è privo dell'enzima *L-gluconolattone-perossidasi*, e pertanto deve introdurla con la dieta. La vitamina è assorbita da un sistema di trasporto facilitato sodio dipendente ed è accumulabile nell'organismo, a differenza di quanto avviene per le altre vitamine idrosolubili, principalmente nel fegato e nei surreni. Si è recentemente scoperto che il trasportatore del glucosio GLUT-1 trasporta acido deidroascorbico. (Sagun K.C. et al., 2005).

I vegetali freschi e gli agrumi sono ricchi di vitamina C. Vi sono perdite elevate se tali alimenti sono esposti all'aria, in contatto con il rame, che ne favorisce l'ossidazione, o in cottura, in quanto la vitamina è sensibile alle alte temperature.

I peperoni, tra i prodotti vegetali sono una delle più importanti fonti di vitamina C (46-243 mg 100g⁻¹ su peso fresco) e il suo contenuto cambia a seconda delle varietà, probabilmente per il differente contenuto di umidità. Anche cotto il frutto mantiene più della metà del suo contenuto iniziale di acido ascorbico (Osuna-Garcia J.A., 1996). Nel processo di essiccazione, essendo idrosolubile la vitamina C viene ossidata.

1.5.2 Vitamina A e carotenoidi

I carotenoidi sono i pigmenti delle piante più presenti in natura; sono localizzati nei cromoplasti cellulari dei tessuti fotosintetici, nei cromoplasti di fiori, radici.

Sono stati individuati più di 700 tipi di carotenoidi e possono essere suddivisi in due gruppi:

- caroteni, senza presenza di ossigeno (α -carotene, β -carotene, licopene)
- xantofille, contengono ossigeno in gruppo alcolico o carbonilico (zeaxantina, luteina).

Sono composti terpenici, derivanti dalla condensazione di otto unità isopreniche, con una catena idrocarburica centrale a 22 atomi di carbonio, comprendente differenti doppi legami coniugati, e da due unità terminali che possono contenere diverse funzioni, come alcolica o chetonica. I doppi legami coniugati costituiscono il sistema cromoforo responsabile dell'intenso colore di queste sostanze. Oltre alla funzione fotosintetica nelle piante, i carotenoidi, sono fotoprotettori, infatti essi proteggono i cromoplasti dalla fotossidazione. Tuttavia i carotenoidi sono sensibili all'esposizione alla luce, alle alte temperature e all'ossigeno. Per esposizione a questi agenti, tali composti, in cui i doppi legami non ciclici sono sempre nella configurazione trans, più stabile, possono trasformarsi in una miscela di stereoisomeri nei quali uno o più doppi legami si sono isomerizzati in posizione cis (isomerizzazione trans-cis). Il sistema cromoforo è infatti responsabile oltre che del colore anche della loro grande instabilità, ossidandosi facilmente all'aria e in presenza di luce.

Gli animali non sono in grado di sintetizzare carotenoidi, che sono quindi presenti solo negli alimenti vegetali. La composizione di carotenoidi delle specie vegetali è influenzata da una serie di fattori come la cultivar, la varietà, la parte della pianta in esame, grado di maturazione, clima e luogo di coltivazione, condizioni di raccolta e post raccolta, processi tecnologici e di conservazione (Rodriguez-Amaya D.B., 1993).

Tuttavia quelli presenti in quantità più apprezzabili in natura sono α -carotene, β -carotene, criptoxantina, zeaxantina, luteina e licopene. In particolar modo, negli alimenti vegetali e quindi anche nei peperoni, i carotenoidi sono presenti principalmente sotto forma di β -carotene, formato da quattro unità isopreniche condensate con quattro doppi legami nelle catene laterali. Una delle proprietà più note dei carotenoidi è il loro forte potere antiossidante: queste molecole infatti sono tra i più efficienti *quencher*, ovvero "spegnitori" per l'ossigeno singoletto e *scavenger*, "spazzini", nei confronti dei radicali liberi. I radicali liberi e l'ossigeno singoletto possono causare danni biologici a macromolecole importanti e a costituenti di membrana, e la presenza di questi naturali antiossidanti può controllare queste reazioni degradative. L'ossidazione di LDL, implicata nell'insorgenza dell'aterosclerosi, può essere ridotta dai carotenoidi, rendendoli agenti antiaterogenici (Shixian Q. et al., 2005).

Alcuni carotenoidi quali α -carotene, β -carotene e criptoxantina, oltre la funzione antiossidante, possono avere funzione provitaminica per la vitamina A, in quanto possono essere convertiti nell'organismo umano in retinolo (vitamina A). Il retinolo è presente in alimenti di origine animale e non viene sintetizzato dall'organismo umano. Considerando che non più del 75 % di retinolo viene assorbito, tali carotenoidi costituiscono quindi una potenziale fonte aggiuntiva assorbibile di vitamina A.

A concentrazioni fisiologiche l'assorbimento del retinolo avviene per diffusione facilitata, mentre a dosi più elevate avviene per diffusione passiva. I retinil esteri sono idrolizzati da alcune idrolasi presenti nel succo pancreatico o negli orletti a spazzola degli enterociti.

L'assorbimento dei carotenoidi, invece varia dal 5 al 50% del totale ingerito, avviene per diffusione passiva e la biodisponibilità, essendo molecole liposolubili, dipende dai trigliceridi presenti nel lume intestinale in grado di solubilizzare i carotenoidi presenti. La biodisponibilità dipende, inoltre, dal tipo di carotenoide (ad esempio la luteina è più disponibile del β -carotene, che, a sua volta ha maggiore biodisponibilità rispetto ad α -carotene), dalla matrice alimentare e dal processo di produzione (Reboul E. et al., 2006). Le fibre alimentari come le pectine riducono l'assorbimento di carotenoidi. (Costantini A.M. et al., 2006).

I carotenoidi con funzione provitaminica una volta assorbiti negli enterociti, possono essere trasformata in retinaldeide. Il β -carotene può essere scisso centralmente o perifericamente da due differenti enzimi *diossigenasi* della mucosa intestinale. Gli apo-carotinali che si formano dalla rottura periferica vengono successivamente trasformati in retinolo o in acido retinoico. Dalla rottura centrale tramite *15,15'-carotene-diossigenasi* si forma retinaldeide che viene trasformata in retinolo tramite la retinale reduttasi NADPH dipendente (Figura 1.5).

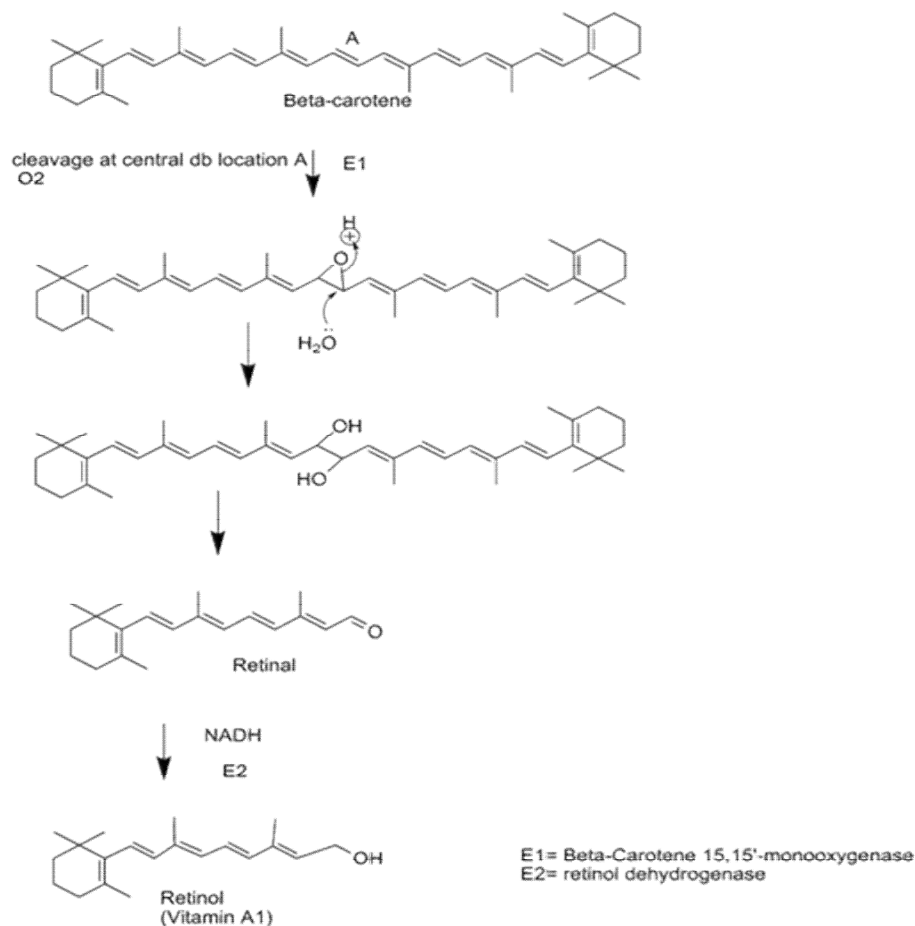


Figura 1.5 *Formazione di retinolo a partire da β -carotene tramite 15,15'-carotene-diossigenasi.*

I retinil-esteri e i carotenoidi lasciano gli enterociti come componenti dei chilomicroni e attraverso il sistema linfatico raggiungono la circolazione sanguigna. I carotenoidi presenti nei *remnants* dei chilomicroni, giunti nelle cellule epatiche, possono essere convertiti in retinoidi oppure possono essere secreti dalle cellule come componenti delle VLDL.

Il retinolo svolge numerose funzioni fisiologiche a livello di svariati organi: è coinvolto nella formazione della rodopsina, pigmento visivo dei bastoncelli della retina; controlla l'espressione di svariati geni in seguito al legame con recettori nucleari specifici; contribuisce a mantenere integri gli epitelii; è un fattore di crescita e ha proprietà immunostimolanti. Ha infine anche funzione antianemica, aumentando la disponibilità di ferro inorganico (Costantini A.M. et al., 2006).

I livelli di assunzione giornaliera di vitamina A vengono indicati in termini di retinolo equivalenti (RE):

1RE= 1µg retinolo= 6 µg β-carotene= 12 µg altri carotenoidi

I colori propri dei peperoni, rosso, verde, giallo e arancione derivano da più di trenta pigmenti carotenoidi individuati in questi frutti. I pigmenti verdi includono anche clorofille in forma a e b. I frutti gialli e arancioni devono la loro colorazione a pigmenti come luteina, zeaxantina, β-criptoxantina, violaxantina, anteraxantina e β-carotene. I pigmenti rossi sono invece capsantina, capsorubina e criptocapsina che si trovano solo nei frutti di peperoni.

Il 93% di provitamina A nei peperoni verdi e il 95% nei rossi è costituita da β-carotene. Analisi recenti su quattro varietà di colori differenti di peperoni ha dimostrato che il frutto rosso ha il più alto livello di β-carotene (5.4 µg g⁻¹) e luteolina (11.0 µg g⁻¹); il giallo ha il contenuto minore di β-carotene (0.2 µg g⁻¹), mentre il verde ha il più basso contenuto di luteolina (2.0 µg g⁻¹). I campioni prevengono senza particolari differenze l'ossidazione del colesterolo. Il peperone verde ha una capacità maggiore di prevenire l'ossidazione del DHA (Sun T. et al., 2007).

1.5.3 Polifenoli

I composti fenolici rappresentano un gruppo di circa 800 metaboliti secondari, formati nelle piante, responsabili della colorazione dei frutti, agenti protettivi contro gli insetti, parassiti e raggi UV. Si trovano in frutti, vegetali, vino, tè, cacao. Possiedono una struttura fenolica comune, infatti sono derivati del benzene con più gruppi idrossilati associati all'anello. I polifenoli possono essere divisi in base al numero di anelli fenolici e agli elementi strutturali legati a tali anelli in acidi fenolici, flavonoidi, tannini, stilbeni e diferuloilmetani (Figura 1.6).

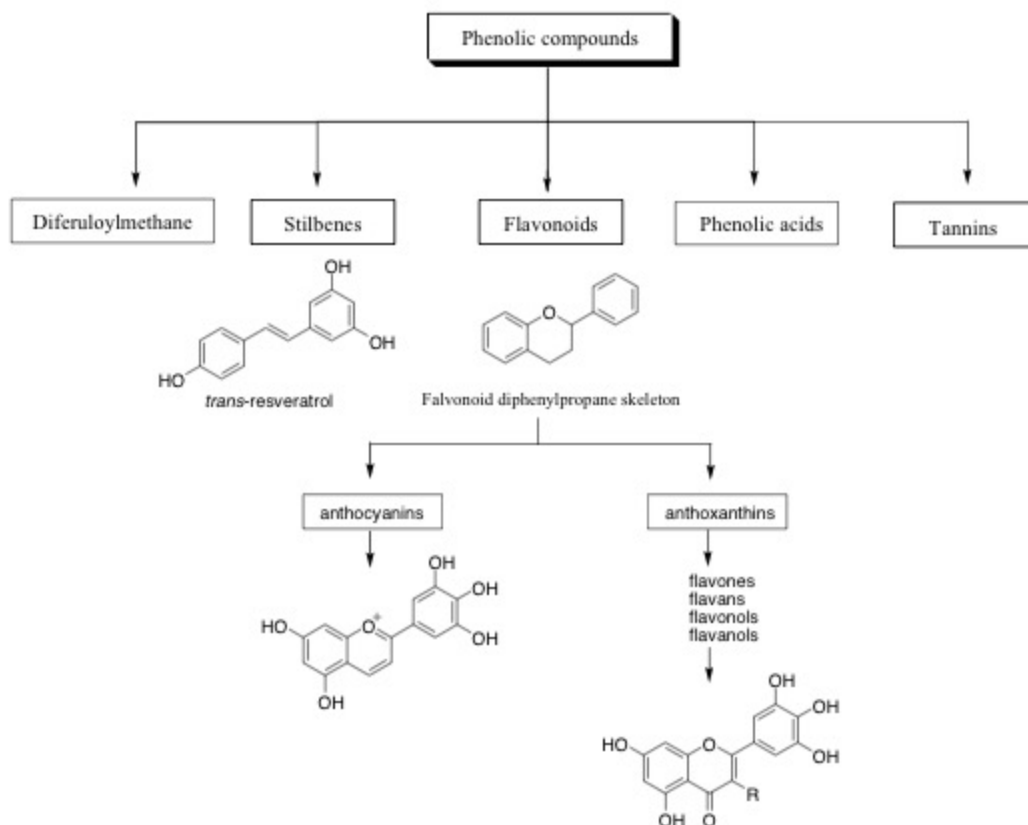


Figura 1.6 *Classificazione dei polifenoli*

Gli acidi fenolici derivano dagli acidi idrossibenzoici come l'acido gallico e da quelli idrossicinnamici come l'acido caffeico, il ferulico e il cumarico.

I flavonoidi si suddividono in flavonoli, flavoni, isoflavoni, antocianidine in base allo stato di ossidazione, al tipo di eterociclo e alla posizione dei vari sostituenti. Il grado di ossidazione dell'anello eterociclico, il numero e le specifiche posizioni dei gruppi OH o la natura dei gruppi funzionali, determinano la funzione dei flavonoidi come agenti antiossidanti, agenti antinfiammatori, agenti citotossici e agenti mutageni *in vitro* o *in vivo*, a dimostrazione di come piccole differenze di struttura determinano grandi diversità nelle attività biologiche (Carratù B. et al., 2005).

Gli stilbeni sono strutturalmente caratterizzati da un nucleo di 1,2-difeniletilene, con gli idrossili sull'anello aromatico ed esistono in forma monomerica e polimerica. Vi sono anche **lignani** e lignine polimeriche. I **tannini** sono fenoli idrosolubili e sono divisi in tannini condensati e idrosolubili, ad alto peso molecolare e con proprietà colloidali. I **diferuloilmetani** sono un piccolo gruppo di composti con due anelli aromatici sostituiti con gruppi idrossilici.

I polifenoli generalmente sono parzialmente assorbiti, largamente metabolizzati e rapidamente eliminati; il loro metabolismo avviene attraverso un pathway comune. Hanno una differente densità strutturale che influenza la loro biodisponibilità. (Manach C. et al., 2004). Isoflavoni e acidi fenolici come il caffeico e il gallico sono quelli più assorbiti. Dal momento che la maggior parte dei composti è presente negli alimenti come esteri, glucosidi (glicone-parte glucidica e aglicone-parte non glucidica) o polimeri che non possono essere assorbiti nella loro forma originaria, devono essere idrolizzati dagli enzimi intestinali o dalla microflora del colon. Questa microflora possiede una grande capacità di deglicosilazione che avviene molto rapidamente. L'assorbimento a livello gastrico è invece limitato sia per la ridotta area di scambio, confrontata con quella dell'intestino, sia per la resistenza all'idrolisi dovuta al pH e agli enzimi gastrici.

L' LPH (Lactase Phlorizin Hydrolase) è l'enzima che idrolizza i legami glicosidici tra polifenoli e zuccheri a livello della parete esterna dell'enterocita. Gli agliconi possono essere assorbiti negli enterociti per diffusione passiva e possono essere liberati all'interno dell'enterocita per azione di una β -glucosidasi citosolica (CBG); prima di passare nel flusso sanguigno gli agliconi sono metabolizzati in forme solfatate (SULT), glucuronate (UGT), metossilate (Del Rio D. et al., 2013).

Negli alimenti questi composti hanno un alto potere antiossidante nei confronti dei meccanismi di ossidazione endogeni ed esogeni: essi sono *scavenger* dei radicali liberi, neutralizzando e contrastando l'azione dei ROS (Reactive Oxygen Species), *quencher* nei confronti dell'ossigeno singoletto, chelanti per i metalli pro-ossidanti e forti agenti riducenti. I fenoli incrementano l'azione degli enzimi endogeni predisposti all'azione antiossidante e rafforzano le difese non enzimatiche. Curcumina e quercitina incrementano l'attività di glutazione perossidasi (Gpx), superossido dismutasi (SOD), catalasi (CAT) o glutazione reduttasi (GR) *in vivo* e *in vitro*. (Alia M. et al., 2006). L'efficacia antiossidante dei polifenoli è dovuta alla presenza di gruppi idrossilici legati alle strutture aromatiche ed alla geometria della molecola: essi sono in grado di originare radicali fenolici stabili, attraverso la delocalizzazione elettronica sulle strutture aromatiche ed alifatiche.

Numerosi studi hanno dimostrato che i composti fenolici svolgono una funzione di protezione del sistema cardiovascolare che consiste in una attività preventiva verso l'

aterosclerosi e l'ipertensione; favoriscono inoltre l'omeostasi dell' endotelio (Han X. et al., 2007).

Essi hanno avuto riscontri anche come neuroprotettori in grado di favorire il sistema cognitivo e l'attività psicomotoria e di prevenire malattie neurodegenerative. Studi effettuati su topi hanno dimostrato che i fenoli sono in grado di distruggere le placche e riparare le neuriti implicate nell'Alzheimer. (Garcia-Alloza M. et al., 2007). Hanno anche funzione antinfiammatoria, come mediatori per l'inibizione della produzione di citochine, riducono le neuroinfiammazioni.

I polifenoli hanno anche funzione anticancerogena e antimutagena, inibiscono l'ossidazione del DNA e bloccano i precursori per la formazione dei tumori: la curcumina esercita attività antitumorale inibendo la proliferazione delle cellule e l'angiogenesi, blocca la progressione del ciclo cellulare e la morte delle cellule *in vivo* e *in vitro* (Kunnumakkara A.B. et al., 2007).

I flavonoidi più presenti nel *Capsicum* sono **luteolina** e **quercitina**. Gli acidi fenolici sono presenti in minor quantità rispetto ai flavonoidi, con prevalenza di **acido protocatecuico**, **clorogenico**, **ferulico** e **cumarico**.

Il genere *Capsicum* contiene, inoltre, un gruppo unico di composti fenolici, noto come **capsaicinoidi**, responsabile della piccantezza dei frutti. Sono sette molecole omologhe alle catene laterali alchiliche della vanillamide esclusive del genere *Capsicum* (Torabi H., 1997). Sono composti inodori, incolori, insapori. La composizione della capsaicina è simile a quella della piperina, composto tipico del pepe nero.

In quattro varietà di peperone verde, giallo, arancione e rosso è stata studiata l'attività antiossidante e la quantità di fenoli presenti: il contenuto fenolico totale è risultato maggiore nei peperoni rossi, ed il potere antiossidante minore nei frutti verdi mentre negli altri due tipi non sono risultate differenze significative (Sansavini, S., Ranalli, P., 2012).

Il canferolo, la quercitina e l'acido caffeico estratti da un campione proveniente dall'Algeria hanno dimostrato attività antibatterica nei confronti di batteri sia Gram+ che Gram - (Mokhtar M. et al., 2015).

Capitolo 2

La digestione

2.1 Il sistema digerente

La digestione è l'insieme di processi fisico-meccanici e chimici che permette la riduzione di molecole complesse e quindi non accessibili e assorbibili come tali, in composti più semplici e utilizzabili dall'organismo. Il sistema digerente trasforma quindi gli alimenti in substrati utilizzabili come nutrienti da parte dell'organismo. Il sistema gastrointestinale è costituito dal tratto gastrointestinale che comprende la bocca, la faringe, l'esofago, lo stomaco, il duodeno, il digiuno, l'ileo, il colon, il retto e l'ano e da alcune strutture ghiandolari e annesse quali le ghiandole salivari, il fegato, la colecisti e il pancreas (Figura 2.1).

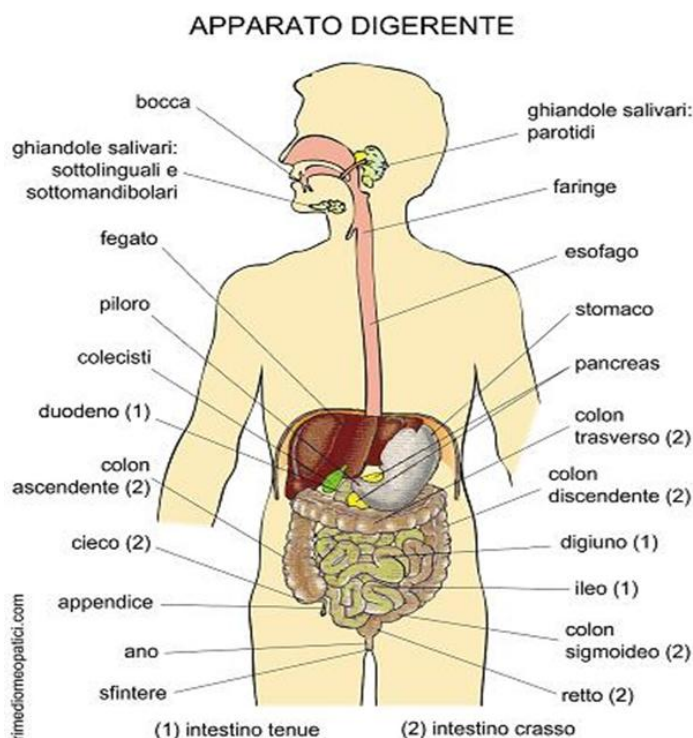


Figura 2.1 Il sistema digerente

Le funzioni fisiologiche dell'apparato digerente sono la digestione del cibo e l'assorbimento dei principi nutritivi nel sangue.

I nutrienti, quali aminoacidi, carboidrati, vitamine, sali minerali, acidi grassi, non sono quasi mai utilizzati totalmente dall'organismo per il suo mantenimento e accrescimento, ma solo una parte detta biodisponibile.

La **biodisponibilità** è definita come la percentuale del contenuto totale di un componente dell'alimento che viene assorbita e successivamente utilizzata dall'organismo per le sue specifiche funzioni, eventualmente dopo essere stata convertita in forma attiva (Ross K., 2014). La biodisponibilità dipende dalla **bioaccessibilità** cioè il contenuto del composto d'interesse che è rilasciato dalla matrice alimentare nel tratto gastrointestinale (Rubio L. et al., 2014). La bioaccessibilità è fortemente influenzata dalle proprietà fisico-chimiche della matrice (composizione, viscosità, solubilità, pH) e dai processi tecnologici usati nella produzione dell'alimento, oltre che dalle condizioni fisiologiche dell'individuo.

Nonostante tutti i processi digestivi siano strettamente connessi tra loro è possibile suddividerli schematicamente in singole fasi, in base all'organo che le compie:

- 1) masticazione (bocca),
- 2) deglutizione (bocca, faringe ed esofago),
- 3) demolizione, o scissione in unità semplici (stomaco e intestino),
- 4) assorbimento delle sostanze nutritive da parte del corpo (intestino),
- 5) espulsione dei materiali di rifiuto (intestino).

Gli organi o le ghiandole esocrine del tubo digerente o connesse ad esso realizzano i processi chimici tramite la produzione dei differenti succhi digestivi: saliva, succo gastrico, succo pancreatico, succo intestinale, bile.

A partire dalla bocca viene svolta la masticazione, triturazione dell'alimento dai denti e la riduzione dell'amido a destrine da parte dell' α -amilasi presente nella saliva. La digestione prosegue nello stomaco in cui la pepsina idrolizza le proteine in peptidi, ma gran parte del processo digestivo avviene per opera degli enzimi prodotti dal pancreas, tra cui tripsina, chimotripsina, lipasi, amilasi, e dall'intestino tenue, il cui citoplasma negli enterociti produce peptidasi. Infine nel colon i batteri della microflora intestinale fermentano i substrati non attaccati dagli enzimi digestivi.

Le funzioni del tratto gastrointestinale sono regolate e coordinate da una serie di ormoni, sostanze pancreatiche e neuroni. La regolazione delle funzioni gastrointestinali può essere perciò suddivisa in endocrina, paracrina o neurocrina, a

seconda della tipologia di cellula che produce le sostanze regolatrici e della via attraverso la quale essa raggiunge la cellula bersaglio. Le cellule endocrine sono localizzate nella mucosa e nella sottomucosa di stomaco, intestino e pancreas e producono una serie di ormoni: alcuni di questi agiscono sulle cellule secretorie presenti nella parete del tratto gastrointestinale, nel pancreas o nel fegato, altri agiscono sulle cellule muscolari lisce del tratto gastrointestinale. Anche le sostanze paracrine contribuiscono alla regolazione delle funzioni secretorie e motorie del tratto gastrointestinale. Il sistema nervoso gastrointestinale è coordinato dal sistema nervoso enterico, connesso al sistema nervoso centrale principalmente tramite il nervo vago e formato da un complesso di neuroni che si estendono dall'esofago all'ano. Il sistema simpatico agisce sulla muscolatura liscia del tratto gastrointestinale inibendone la funzione motoria e secretoria. Al contrario, il sistema parasimpatico stimola la motilità del tratto digestivo (peristalsi) e le secrezioni.

2.2 La bocca

La digestione ha inizio a livello della bocca (Figura 2.2), in cui il materiale viene tritato dai denti e impastato con la saliva; quest'ultima facilita la deglutizione e produce una serie di composti che danno inizio alla digestione chimica. La masticazione può essere compiuta volontariamente, ma più spesso è un'azione riflessa e favorisce l'inizio del processo digestivo. Essa è influenzata da una serie di fattori quali il volume e la composizione dell'alimento, la forza dei denti, i cicli di masticazione, il livello di fame e le abitudini.

La saliva viene prodotta dalle ghiandole salivari, presenti bilateralmente, tra cui le principali sono le parotidi, le ghiandole sottomandibolari, più piccole delle parotidi e le ghiandole sottolinguali, di dimensioni ancora inferiori. La sua secrezione è influenzata da una serie di parametri derivanti dalla frazione liquida degli alimenti tra cui il pH, la tensione superficiale e la viscosità. È secreta a velocità differenti sia in stato stimolato o non stimolato; il flusso di saliva sotto stimolazione che contribuisce alla digestione degli alimenti è un fluido ipo-osmotico (Gaviao M. B. D. et al., 2004, Pedersen A. et al., 2002).

La saliva contiene 99% di acqua, 0,3% di proteine e vari elettroliti come sodio, potassio, calcio, magnesio, fosfato e bicarbonato. Altri componenti sono glucosio e

prodotti nitrici come l'urea. Le principali proteine sono l'immunoglobulina A (IgA), l' α -amilasi (ptialina), il lisozima, la lattoferrina e le glicoproteine del muco (mucina) (Humphrey S.P., Williamson R.T., 2001).

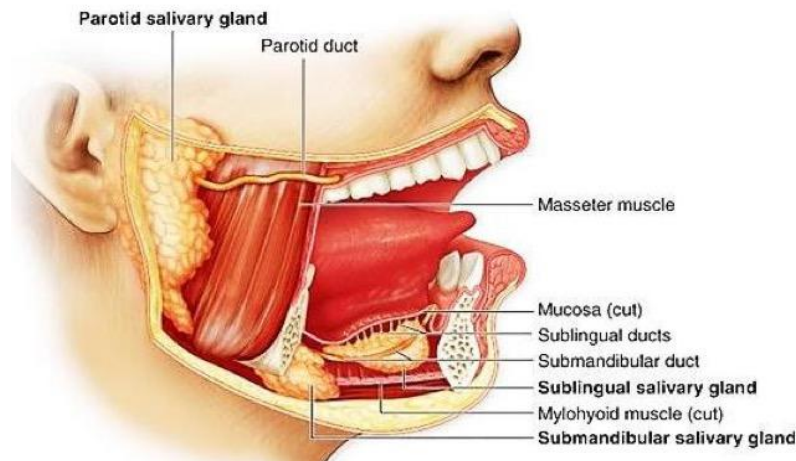


Figura 2.2 La bocca

La **ptialina** ha un pH ottimale a un valore di 6.8. La sua attività massima è nella bocca e alla fase gastrica iniziale, grazie alla capacità tamponante dell'alimento. Tale enzima è un' α -amilasi in grado di scindere i legami glucosidici α 1-4 dell'amido e del glicogeno, formando molecole più semplici quali oligosaccaridi e destrine fino al più semplice disaccaride maltosio. Alcuni studi effettuati sulla fase orale della digestione di pasta e spaghetti hanno dimostrato che il grado di idrolisi di amido da parte dell'amilasi salivare dipende dal tipo di alimento e dalla forza di masticazione che portano a secernere differenti valori di saliva (Hoebler C. et al., 1998).

Altro enzima presente nella saliva è la **lipasi salivare**, ma la sua attività diminuisce con l'età: nei bambini l'attività della lipasi è notevole nei confronti dei trigliceridi presenti nel latte.

Il **lisozima** è enzima antibatterico con funzione antisettica mentre la **mucina** è un complesso di glicoproteine con una bassa solubilità, alta viscosità, elasticità e adesività che svolge una attività lubrificante favorendo masticazione e deglutizione. Con la deglutizione il bolo alimentare arriva all'esofago, attraverso la parte posteriore della bocca e della faringe. La deglutizione può iniziare volontariamente ma le fasi successive sono sotto controllo riflesso. La deglutizione può essere divisa in fase orale,

faringea ed esofagea. Una volta che il bolo alimentare viene spinto all'indietro nella fase boccale, arriva nella faringe, dove vengono stimolati recettori tattili che danno inizio alla deglutizione. La faringe è la parte posteriore della cavità orale e il punto di intersezione tra apparato digerente e respiratorio. È l'epiglottide, valvola cartilaginea, che chiude le vie aeree al passaggio del cibo; infatti la respirazione è inibita per via riflessa durante la fase faringea.

2.3 L'esofago

Quando il bolo entra in esofago, esso si contrae per via riflessa e dà inizio ad un'onda peristaltica. Le pareti dell'esofago sono formate da strati muscolari che, con la forza impressa dalla deglutizione, si contraggono ritmicamente. La contrazione delle fibre circolari e il rilascio delle longitudinali comprime l'esofago mentre il processo inverso lo dilata. La contrazione della muscolatura circolare è governata da fibre nervose, ormoni e neuromodulatori. L'alternarsi dei movimenti di contrazione e rilassamento è detta appunto peristalsi e permette l'avanzamento del bolo nell'esofago in modo unidirezionale. L'esofago termina con una valvola formata da muscolatura liscia, sfintere esofageo inferiore o cardias, che, con i movimenti peristaltici, si rilascia, permettendo il passaggio del bolo nello stomaco. L'apertura è mediata da fibre del nervo vago. Qualora non vi siano onde peristaltiche lo sfintere esofageo deve rimanere chiuso per evitare il reflusso del contenuto gastrico.

2.4 Lo stomaco

Lo stomaco (Figura 2.3) è lungo circa 25 cm e il suo volume è di circa 1.5 litri, ma può variare da volumi di 50 mL a 6 mL. La risposta al riempimento gastrico giunge quando ha inizio un'onda peristaltica esofagea e in questo modo lo sfintere esofageo inferiore si rilascia. Gli alimenti si accumulano temporaneamente nello stomaco per essere sottoposti all'azione digestiva del succo gastrico, formando una soluzione detta chimo.

La parete interna dello stomaco, estremamente elastica, è sollevata in pieghe, dette pliche gastriche, la cui distensione consente l'adattamento a volumi di cibo differenti, sia solidi che liquidi. La mucosa dell'organo è disseminata di numerose strutture ghiandolari che secernano i componenti del succo gastrico. La componente acida del

succo gastrico (acqua e acido cloridrico) è prodotta dalle cellule parietali delle ghiandole gastriche a livello del corpo e del fondo dello stomaco; la componente alcalina e proteica del succo (bicarbonati, mucine e pepsina) è prodotta dalle cellule principali delle stesse ghiandole. La prima fase della secrezione gastrica (fase cefalica), oltre che dalla masticazione, è stimolata da impulsi nervosi provenienti dal sistema nervoso autonomo (parasimpatico e ortosimpatico) che il cervello invia allo stomaco e che coinvolgono la vista, l'odorato e il gusto ed è regolata con meccanismo nervoso riflesso.

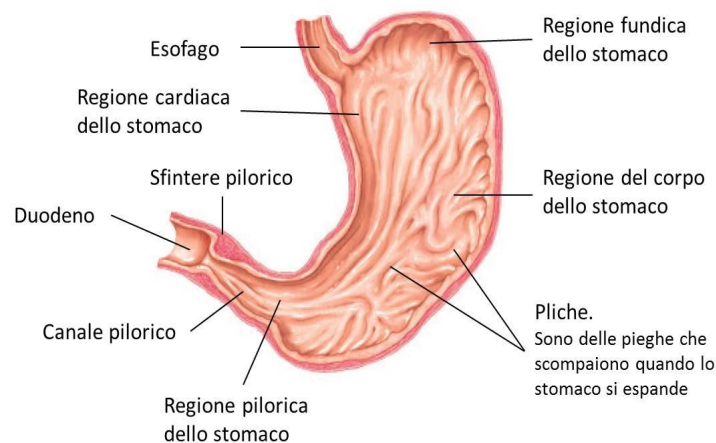


Figura 2.3 Lo stomaco

L'arrivo del bolo dello stomaco stimola la secrezione di determinate sostanze da parte di ormoni e neuropeptidi. Il GPR (Gastrin-releasing peptide) è stimolato dai nervi enterici a produrre gastrina, ormone che stimola direttamente la produzione di HCl da parte della cellule parietali delle ghiandole gastriche. La gastrina è prodotta dalla mucosa gastrica in presenza di proteine parzialmente digerite, quando è stimolata dal nervo vago o quando lo stomaco è disteso. La produzione di HCl è stimolata anche da acetilcolina e istamina. L'acido cloridrico abbassa il pH intragastrico fino a un valore di 2-3, uccidendo quasi tutti i batteri e parassiti presenti negli alimenti e creando l'azione favorevole all'azione della pepsina.

La pepsina è in grado di scindere legami peptidici tra aminoacidi aromatici: è un'endopeptidasi quindi scinde i legami interni delle proteine. Questo è l'unico enzima proteolitico presente nello stomaco umano, tuttavia esistono varie isoforme.

Le cellule principali delle ghiandole gastriche sintetizzano la pepsina nella forma inattiva di pepsinogeno per evitare il fenomeno di autodegradazione cellulare, in quanto nelle stesse cellule gastriche sono presenti numerose proteine che verrebbero quindi idrolizzate dalla pepsina stessa. Il pepsinogeno viene attivato a pepsina dall' HCl.

Nel succo gastrico è presente anche la lipasi gastrica. L'attività della lipasi gastrica negli adulti è molto più bassa ($10-120 \text{ U ml}^{-1}$) rispetto all'attività della lipasi pancreatica che agisce nel tratto duodenale ($80-7000 \text{ U ml}^{-1}$) (Armand M., 2007, Carrière F. et al., 2005). Tuttavia la lipasi gastrica è responsabile dell'idrolisi del 10-30% di trigliceridi e porta alla produzione di acidi grassi liberi che favoriscono l'ancoraggio del complesso lipasi-colipasi sull'interfaccia fra stato acquoso e lipidico (Bakala N'Goma J. et al., 2012, Lengsfeld H. et al., 2004). L'attività della lipolisi è infatti altamente influenzata dall'estensione della superficie delle gocce lipidiche e dalla loro composizione interfacciale.

Nei bambini la lipasi gastrica che dà inizio alla lipolisi si sviluppa molto precocemente e attacca direttamente i globuli di grasso del latte. Le condizioni fisiologiche di questo enzima, legate a particolari parametri fisico-chimici che influenzano molto la sua attività sono: un basso valore di pH ottimale per la sua attività quale 4-5; la stabilità alla pepsina e alla denaturazione a livelli di pH di circa 1.5; un alto potere tensioattivo che permette il suo assorbimento sull'interfaccia dei complessi lipidici con una bassa tensione superficiale.

Nel succo gastrico si trova anche il muco, la cui sintesi è stimolata da ossido nitrico e varie prostaglandine. Il muco lubrifica il contenuto gastrico e protegge la mucosa gastrica da danni meccanici e chimici. Nel succo gastrico è presente anche il fattore intrinseco, secreto dalle cellule parietali e necessario per assorbire la vitamina B12. La secrezione gastrica comprende infine anche sostanze alcaline glicoproteiche la cui funzione di barriera sulla superficie interna dello stomaco è ulteriore garante di protezione dal logorio dell'ambiente acido e degli enzimi proteolitici.

Nello stomaco non vi è assorbimento dei prodotti di digestione, ad eccezione dell'alcool.

Dopo un pasto, lo stomaco impiega da 1 a 4 ore a svuotarsi, compatibilmente alla concentrazione dei nutrienti e della tipologia di alimento ingerito. Il sistema nervoso

controlla il tempo e l'entità di svuotamento gastrico attraverso l'azione delle onde peristaltiche, provocate dalla presenza del chimo acido, che permettono l'apertura della valvola che separa i due organi: il piloro. In prossimità del piloro le onde peristaltiche raggiungono la massima intensità. La regione pilorica, ricolma di chimo gastrico, è sottoposta ad un'intensa azione meccanica. Quando i recettori avvertono la presenza di particelle di oltre un millimetro di diametro, il piloro si chiude, le onde peristaltiche si bloccano e gli alimenti sono spinti all'indietro. Tale movimento sminuzza le particelle del chimo fino a ridurle a un diametro di mezzo millimetro circa. A questo punto, sempre per le onde peristaltiche, il piloro si apre leggermente e in questo modo il chimo, in parti, passa in duodeno, prima parte dell'intestino tenue. Il fenomeno dello svuotamento gastrico è rallentato dalla presenza di soluzioni ipertoniche in duodeno e da soluzioni duodenali con pH inferiore a 3.5 e ricco di aminoacidi e peptidi. La velocità di svuotamento è anche rallentata dalla presenza nel duodeno di acidi grassi e monogliceridi che stimolano la liberazione di colecistochinina e del peptide gastro-inibitore (Berne R.B. et al., 2000).

2.5 L'intestino tenue

L'intestino tenue (Figura 2.4) è formato da duodeno, lungo 30 cm, digiuno, lungo 1-2 m e ileo, lungo 1.5 m. Circa il 90% dei processi digestivi avviene nelle prime due sezioni del piccolo intestino tra cui l'idrolisi delle molecole derivanti dagli alimenti da parte di enzimi secreti principalmente a livello pancreatico in molecole più semplici e il loro assorbimento.

Anche a livello intestinale vi sono movimenti di peristalsi che favoriscono l'avanzamento del contenuto intestinale verso l'intestino crasso. Il chimo si muove nell'intestino tramite stimolazione di contrazioni determinate dal sistema nervoso. La motilità e secrezioni intestinali sono stimulate da una serie di ormoni e peptidi: il Vip (Vasoactive Intestinal Polipeptide) è presente nei neuroni intestinali, stimola la secrezione intestinale e abbassa gli sfinteri gastrointestinali. Anche peptidi come motilin peptide, peptide P e l'ormone colecistochinina aumentano i movimenti intestinali. Al contrario, il peptide YY, la secretina e il glucagone-like peptide (GPL) inibiscono e rallentano la motilità intestinale.

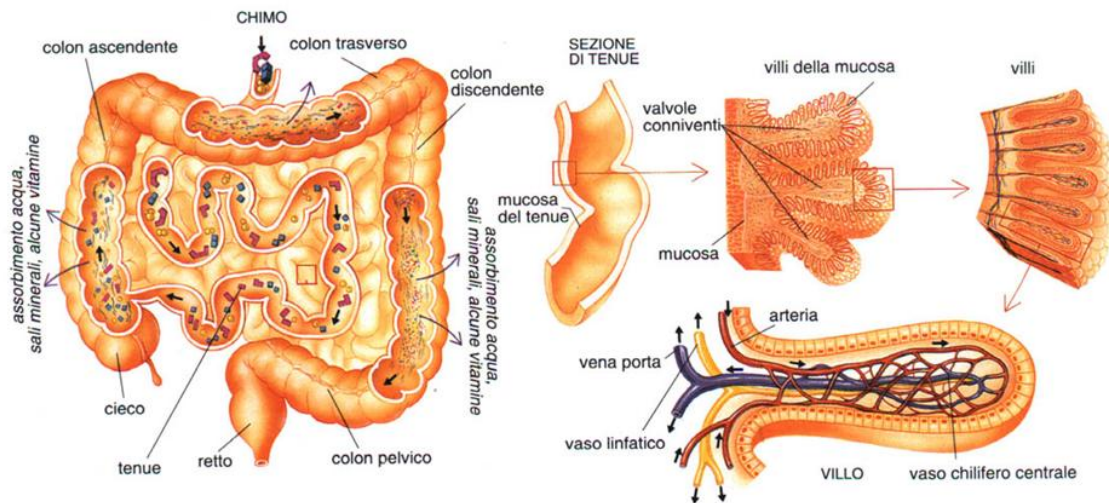


Figura 2.4 *Intestino e particolare del villo intestinale*

Nella muscolatura liscia intestinale vi sono anche movimenti di contrazione di segmentazione: contrazioni ad anello presenti nell'intestino a intervalli regolari che favoriscono il rimescolamento del bolo alimentare. Il rimescolamento è un fattore fondamentale per l'assorbimento dei nutrienti in quanto aumenta il tempo di contatto del bolo con gli enzimi presenti nella mucosa intestinale.

La mucosa è la parte più interna dell'intestino, a diretto contatto con il lume intestinale e quindi con i prodotti della digestione. Un monostrato continuo di cellule epiteliali delimita la mucosa dal lume intestinale: tali cellule sono accoppiate da strutture proteiche specializzate dette giunzioni strette che impediscono il flusso aspecifico di sostanze dal lume verso lo spazio interstiziale. La mucosa è caratterizzata da villi (Figura 2.4), estroflessioni rivolte verso il lume e formate nella parte apicale da centinaia di cellule chiamate enterociti. Questi ultimi, che costituiscono l'80% delle cellule epiteliali, sono ricoperti da estroflessioni chiamate microvilli che formano il cosiddetto orletto a spazzola. Sia i villi che i microvilli grazie alla loro conformazione aumentano la superficie assorbente dell'intestino.

La maggior parte degli enzimi digestivi prodotti dalla mucosa intestinale sono incorporati nell'orletto a spazzola e idrolizzano parzialmente carboidrati e proteine. Il monostrato di cellule epiteliali è composto anche da cellule staminali; cellule mucipare calciformi, che contribuiscono alla secrezione di muco; cellule

enteroendocrine, che portano alla secrezione di ormoni e peptidi bioattivi; cellule di Paneth che sintetizzano proteine con funzioni antimicrobiche.

Tutta questa organizzazione altamente differenziata delle cellule epiteliali della mucosa intestinale garantisce sia la funzione di barriera contro sostanze dannose per l'organismo, sia il trasporto vettoriale dal lume intestinale al circolo sanguigno. Il trasporto dal lume verso l'epitelio può avvenire mediante vie differenti. Le vie di trasporto possono essere per diffusione passiva e trasporto facilitato, secondo gradiente di concentrazione o per trasporto attivo, contro gradiente di concentrazione. Quest'ultimo richiede dispendio energetico.

I lipidi vengono assorbiti per diffusione passiva o tramite trasportatori specifici: I-FABP. Oligopeptidi e aminoacidi derivati dalla digestione delle proteine hanno un sistema di trasporto attivo o facilitato. La membrana basale possiede trasportatori specifici per i vari gruppi di aminoacidi che consentiranno il loro passaggio al flusso sanguigno. I monosaccaridi, ingeriti come tali o derivanti dalla digestione di amido o disaccaridi hanno bisogno di trasportatori specifici: sull'orletto a spazzola vi sono due trasportatori, SGLT-1 e GLUT-5. SGLT-1 è il trasportatore sodio-dipendente di galattosio e glucosio e l'energia per il trasporto è fornita dalla differenza di sodio tra citoplasma e liquido interstiziale. L'assorbimento del fruttosio avviene invece tramite un meccanismo di diffusione facilitato, tramite il trasportatore GLUT-5 che non provoca variazioni nel potenziale elettrico di membrana (Costantini A.M., et al., 2011).

2.6 Il fegato e la bile

Il fegato nella digestione svolge un ruolo molto importante in quanto secreta la bile, un liquido giallo-verde che una volta prodotto viene immagazzinato nella colecisti o cistifellea e poi immesso nel duodeno tramite il canale coledoco in seguito ad un pasto ricco di grassi.

La composizione della bile è molto eterogenea; nell'uomo è formata per il 67% da sali biliari e per il 22% da fosfolipidi (principalmente fosfatidilcolina) e in minor parte da colesterolo, bilirubina e proteine (Costantini G.M. et al., 2011). Gli acidi biliari si formano negli epatociti a partire dal colesterolo, che è ossidato ad acido chenodesossicolico e acido colico, i due acidi biliari principali che una volta formati, si

legano alla glicina formando i due acidi biliari coniugati glicochenodesossicolico e glicocolico.

La bile ha una funzione fondamentale nella digestione lipidica proprio poiché i suoi composti polari quali fosfolipidi e sali biliari hanno proprietà tensioattive e sono così in grado di formare e mantenere emulsioni grasso/acqua costituite da particelle più piccole, con maggiore sviluppo superficiale e quindi attaccabili più facilmente dalla lipasi pancreatico. In presenza di bile l'attività delle lipasi aumenta in maniera significativa anche grazie alla presenza di co-lipasi che facilita il legame della lipasi con il substrato perché si lega alla lipasi in modo da permetterle di essere assorbita sull'interfaccia acqua-olio.

La bile è continuamente riassorbita e riescreta secondo un meccanismo che prende il nome di circolo enteroepatico.

2.7 Il pancreas esocrino

Il pancreas (Figura 2.5) è un organo di forma allungata che si trova dietro la curva della stomaco, tra stomaco e duodeno.

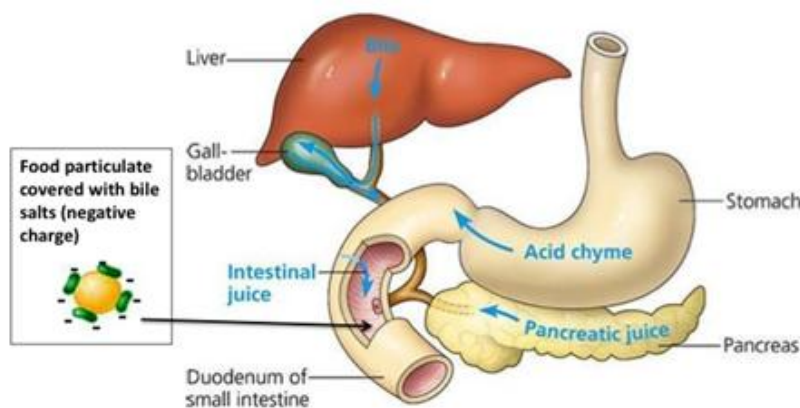


Figura 2.5 Rappresentazione di pancreas, stomaco, fegato e duodeno

Le cellule del pancreas possono essere divise in endocrine, che producono gli ormoni insulina e glucagone, ed esocrine, che sintetizzano gli enzimi digestivi inglobati in strutture secretorie chiamate granuli e riversati nel succo pancreatico. Quest'ultimo, oltre agli enzimi digestivi, contiene bicarbonato, fondamentale per neutralizzare il pH del chimo acido che passa da stomaco a duodeno, ed elettroliti come cationi di sodio,

potassio, calcio e anione cloro. Il succo pancreatico è secreto all'interno dei piccoli canali pancreatici che si fondono nel canale di Wirsung, più ampio e che arriva al duodeno.

La sintesi di succo pancreatico è stimolata dalla quantità di grassi e proteine presenti in duodeno. Esso è responsabile della maggior parte della digestione in quanto è ricco di enzimi come tripsina, chimotripsina, elastasi, carbossipeptidasi, amilasi e lipasi.

Tripsina, chimostripsina ed elastasi, come la pepsina, vengono secrete in forma di zimogeni inattivi, quali tripsinogeno, chimotripsinogeno e pro-elastasi, che vengono poi attivati per idrolisi nel duodeno. Il tripsinogeno viene attivato a tripsina in duodeno dall'enteropeptidasi duodenale ed interviene principalmente su legami tra aminoacidi basici. Il chimotripsinogeno viene attivato dalla presenza di tripsina ed interviene su legami peptidici tra aminoacidi aromatici. Anche l'elastasi è attivata dalla tripsina ed è l'unico enzima in grado di attaccare l'elastina presente nella carne.

Le **carbossipeptidasi** sono secrete in parte in forma attiva e in parte in forma inattiva. Esse sono esopeptidasi che scindono i legami carbossiterminali dei peptidi originati dall'attività di tripsina e chimotripsina. Tra le esopeptidasi vi sono anche **aminopeptidasi** e **dipeptidasi** che scindono rispettivamente i legami aminoterminali dei peptidi e i legami dei dipeptidi, e vengono prodotte dalle cellule della mucosa intestinale.

La **lipasi pancreatica** scinde i legami dei trigliceridi tra gli acidi grassi in posizione 1 e 3 e il glicerolo. La sua attività è favorita dalla presenza di bile in duodeno e dai suoi sali biliari con azione emulsionante.

L'**amilasi pancreatica** scinde i legami α 1-4 glucosidici delle catene di amilosio e amilopectina, polimeri del glucosio che compongono l'amido. L'amilosio è formato da molecole di glucosio unite linearmente con legami α 1-4 mentre l'amilopectina è una struttura più complessa ramificata con legami α 1-4 tra molecole di glucosio e α 1-6 in corrispondenza delle ramificazioni. L'amilasi quindi forma molecole di maltosio e glucosio dall'amilosio e maltosio, glucosio e destrine limite a partire dall'amilopectina. Le destrine contengono le ramificazioni e vengono attaccate da specifici enzimi, le destrinasi, presenti nell'orletto a spazzola. Sulla superficie apicale degli enterociti sono presenti anche le altre disaccaridasi come la maltasi che libera glucosio da maltosio e la lattasi che scinde le molecole di lattosio.

2.8 Intestino crasso

Grazie alle spinte peristaltiche il contenuto intestinale, dopo l'assorbimento, prosegue verso l'intestino crasso. Qui avviene il riassorbimento di acqua ed elettroliti e confluiscono tutti i prodotti non assimilati nell'intestino tenue che andranno a formare le feci. L'intestino crasso ha una lunghezza di 1.2 metri, non contiene villi intestinali e si divide in: colon ascendente, trasverso e discendente, sigma, retto e canale anali.

Nell'intestino crasso avviene la fermentazione batterica dei composti non assorbiti nell'intestino tenue come carboidrati, aminoacidi e proteine non digerite.

In particolare i batteri sono in grado di utilizzare alcuni carboidrati non glicemici a scopo energetico tramite vie anaerobiche fermentative. Infatti, a causa della struttura monosaccaridica non riconosciuta dai trasportatori intestinali o del tipo di legame chimico non idrolizzabile, i carboidrati non sono tutti utilizzabili dall'organismo umano e vanno a costituire la fibra alimentare. È la fibra detta fermentescibile che funge da substrato per i microrganismi che colonizzano l'intestino e sono in grado di scindere i legami glicosidici dei carboidrati non digeriti. La fermentazione produce acidi grassi a catena corta (SCFA) come lattato, butirato, propionato e acetato che abbassano il pH del colon, fungono da fonte di energia per i colonociti e influenzano l'assorbimento intestinale. Propionato e lattato sono assorbiti dalle cellule del colon e utilizzate dalle cellule epatiche.

La fibra alimentare è in grado di modificare selettivamente la microflora intestinale e quindi avere funzioni prebiotiche: con il termine prebiotico si definiscono sostanze di origine alimentare non digeribili e in grado di favorire la crescita di uno o più ceppi batterici (bifidobatteri e lattobacilli) che hanno effetti benefici per l'organismo. Esempi di prebiotici sono inulina e oligofruttosio.

Relativamente ad altri composti non assorbiti e non digeriti a livello intestinale e quindi potenziale substrato fermentativo nel colon, sono stati fatti numerosi studi. Uno di questi è inerente alla struttura dei globuli di grasso del latte e la sua digestione. I globuli di grasso del latte non solo determinano un'alta concentrazione di chilomicroni e trigliceridi nel plasma ma stimolano il rilascio di composti bioattivi non idrolizzabili che contribuiscono al benessere intestinale tramite la fermentazione da parte del microbiota, modulano il sistema immunitario e riducono l'assorbimento di colesterolo (Bourlieu C. et al., 2015).

2.9 La digestione *in vitro*

Il processo digestivo ha sempre attirato medici, scienziati, chimici, per comprendere la digeribilità, bioaccessibilità e biodisponibilità di farmaci, micotossine, macronutrienti, micronutrienti e componenti bioattivi. Numerosi modelli di digestione *in vitro* vengono utilizzati a questo scopo perché fino a poco tempo fa non esisteva un protocollo standard ed ufficiale.

La durata della digestione, la natura e la quantità di enzimi e il pH sono le tre variabili che generalmente cambiano da un metodo all'altro e che portano ad ottenere risultati difficilmente confrontabili tra loro.

I sistemi *in vitro* sono più veloci, meno costosi ed invasivi rispetto a esperimenti effettuati *in vivo* e non hanno restrizioni etiche. Tuttavia la digestione *in vitro* non può considerare né tutte le complesse interazioni che vi sono tra il corpo e l'alimento né la variabilità tra individuo e individuo.

Tutti i sistemi *in vitro* sono costituiti da una fase orale, una gastrica e una duodenale e, raramente, da una fermentazione intestinale. Esistono metodi dinamici molto sofisticati, che, al contrario dei metodi statici, simulano gli aspetti dinamici della digestione quali il trasporto dell'alimento digerito lungo tutto il tratto gastrointestinale e il rilascio graduale di succhi digestivi.

2.9.1 La fase orale

La prima fase della digestione è finalizzata a simulare la masticazione quindi la triturazione dell'alimento, riducendolo in parti più piccole, l'impastamento da parte della saliva e la prima azione idrolitica da parte dell'amilasi salivare. Qualora si abbia un prodotto liquido, questa fase può essere omessa. Per ottenere la triturazione del campione si può utilizzare un chopper, un tritacarne, mortaio e pestello a seconda dell'alimento, cercando comunque di rendere questa fase il più omogenea possibile per i vari campioni da esaminare. All'alimento viene aggiunta una soluzione elettrolitica per simulare la consistenza e la composizione della secrezione salivare, oltre all'enzima α -amilasi. Questa fase viene mantenuta ad un pH attorno a 7, con una temperatura di 37°C. Ogni fase richiede tale temperatura per simulare al meglio la condizione termica corporea. I tempi di digestione orale riportati in letteratura vanno da 2 a 15 minuti (Hur S.J. et al., 2011).

2.9.2 La fase gastrica

In questa fase si vogliono riprodurre le condizioni in cui il bolo alimentare giunge allo stomaco, viene prodotto fluido gastrico contenente pepsina e HCl e il chimo acido è sottoposto ai movimenti peristaltici che favoriscono il suo rimescolamento e transito nello stomaco. Viene quindi aggiunto HCl per abbassare il pH, fino a valori che vanno da 1.1 (Oomen A.G. et al., 2003) a 2.8 (Alexandropoulou I. et al., 2006) e per simulare i movimenti peristaltici la miscela viene mantenuta in agitazione su piastre o in bagnetti termostatati agitanti per tempi variabili, da 30 minuti a 180 minuti (Hur S.J. et al., 2011). La lipasi gastrica qualora non si stia effettuando digestione di trigliceridi o qualora il fine del processo sia individuare proprietà di nutrienti differenti dai lipidi può essere omessa. La presenza di un pH gastrico molto basso può essere motivo di bassa attività lipolitica, infatti l'optimum di pH per la lipasi gastrica è di 5.4 (Piper D.W. et al., 1965).

2.9.3 La fase duodenale

La fase della digestione intestinale, viene chiamata duodenale in quanto è il duodeno che sostiene la maggior parte della digestione. Vengono aggiunti la bile e la pancreatina, contenente il pool enzimatico pancreatico, insieme ad un buffer salino, ma solo dopo aver portato il pH a valori di neutralità tra 6.5 e 7.5 attraverso l'utilizzo di NaOH o NaHCO₃. Anche in questa fase la miscela va incubata a 37°C per tempi superiori alle 2 ore.

2.10 Recenti applicazioni della digestione *in vitro*

Sistemi di digestione *in vitro* sono stati utilizzati su molte matrici alimentari con obiettivi differenti. Nel 2015, ad esempio, una sperimentazione ha determinato come la struttura chimica dei prodotti per bambini abbia un impatto significativo sulla loro lipolisi e proteolisi. Si è visto come la differente struttura dell'emulsione dei globuli di grasso presente nel latte e nei prodotti per infanti vada ad influire sulla cinetica della digestione lipidica e quindi sul metabolismo (Bourlieau C. et al. 2015).

Un altro studio del 2015 è stato effettuato per determinare durante la digestione *in vitro* il contenuto di acrilammide su prodotti trattati termicamente quali prodotti da forno e patate fritte (Hamzaliou A. et Gokmen V., 2015).

Sono stati effettuati studi anche sulla quantità di polifenoli, carotenoidi e antiossidanti totali in yogurt di pesca e fragola prima e dopo la digestione *in vitro*. È emerso che la capacità di ostacolare i radicali liberi, durante la fase digestiva intestinale aumenta molto rispetto alla matrice non digerita (Oliveira A. et Pintado M., 2015).

Altri studi recenti hanno valutato l'interazione tra composti antiradicalici e antinfiammatori da caffè e zenzero. Tutti i campioni testati hanno mostrato azione antiradicalica e inibitoria nei confronti della lipossigenasi e tali attività aumentano durante la simulazione della digestione gastrointestinale. È stata valutata l'interazione antiossidante ed è emerso che l'aggiunta di zenzero al caffè ne modifica la capacità antiossidante poiché le sostanze fitochimiche presenti in entrambe le piante agiscono in sinergia tra loro (Durak A. et al., 2015).

Alcune analisi hanno valutato anche la bioaccessibilità di antiossidanti presenti in diversi alimenti, fattore importante per determinare il potenziale effetto di molecole bioattive. A tal proposito uno studio del 2014 ha valutato la bioaccessibilità di carotenoidi su venti varietà di peperoni piccanti essiccati gialli, verdi, arancioni tramite una procedura di digestione *in vitro*, e le xantofille sono risultate più bioaccessibili dei caroteni (Pugliese A. et al, 2014).

Un'altra ricerca ha invece valutato la biodisponibilità di polifenoli e le proprietà antiossidanti di olio di argan tramite digestione *in vitro* e assorbimento in cellule Caco-2 per poi valutare il ruolo protettivo della frazione bioaccessibile dell'olio contro lo stress ossidativo indotto (Seiquer I. et al, 2015).

2.11 Cost Action Infogest

Infogest nasce nel 2011 dalla prima e più avanzata organizzazione di cooperazione Europea per la coordinazione tra nazioni di piani di ricerca nazionali. La Cooperation in Science and Technology (COST) nasce nel 1971 e si basa su accordi intergovernativi tra 35 paesi. Il suo obiettivo è quello di rafforzare la ricerca scientifica interdisciplinare e favorire la cooperazione, la mobilità e la comunicazione tra ricercatori europei. L'azione COST Infogest, che si è conclusa nel Marzo 2015 è stata coordinata dal French National Institute for Agricultural Research e ha coinvolto più di 260 ricercatori scientifici di oltre 90 istituzioni di 32 paesi, compreso il gruppo di Chimica, Biochimica e Scienze dell'Alimentazione del Dipartimento di Scienze e

Tecnologie Agro-Alimentari dell'Università di Bologna. Si è presentata come una rete internazionale che si occupa di digestione e, in particolare di tutte le modifiche chimiche, fisiche e nutrizionali che avvengono durante il passaggio nel tratto gastro-intestinale. Infatti, comprendere gli effetti degli alimenti sulla salute umana e quindi conoscere quelli che sono i loro meccanismi digestivi è diventata una priorità non solo della ricerca Europea, ma anche dei consumatori. Uno dei principali obiettivi di Infogest è stato quello di incrementare le conoscenze su come gli alimenti vengono scomposti durante la digestione e così poter aiutare la comunità scientifica e le industrie ad elaborare nuovi alimenti con determinate proprietà nutrizionali e funzionali.

In particolare, le sfide principali che Infogest si è posto sono:

- Trovare le relazioni tra la struttura chimica degli alimenti e la bioaccessibilità delle singole componenti;
- Valutare gli effetti dei processi sulla bioaccessibilità dei componenti degli alimenti;
- Sviluppare metodi di caratterizzazione multi-scala della struttura dei cibi
- Identificare i componenti che possono portare benefici all'interno degli alimenti durante la digestione;
- Sostenere l'effetto benefico di tali alimenti per la salute umana;
- Migliorare la conoscenza sulla digeribilità delle proteine e le relazioni con effetti allergenici;
- Dimostrare gli effetti della digestione dei cibi sulla sazietà;
- Migliorare la conoscenza degli effetti della microflora batterica umana sulla componente proteica dei cibi;
- Armonizzare i metodi e i modelli per la digestione *in vitro* a livello europeo.

Relativamente all'ultimo punto, Infogest nel 2014 ha messo a punto un metodo standardizzato per la digestione *in vitro* proponendo un metodo di digestione statica, pratico e standardizzato, considerando le condizioni fisiologiche più rilevanti, spiegando e motivando le scelte prese. Tale metodo può essere utilizzato per vari scopi e può essere modificato a seconda degli obiettivi sperimentali (Minekus M. et al., 2014).

Capitolo 3

Scopo della tesi

Il valore nutrizionale di un alimento di origine vegetale non è solo basato sul contenuto di nutrienti caratteristici (vitamine, minerali, zuccheri e fibra alimentare) ma anche sulla presenza di componenti bioattivi o fitochimici, la cui importanza in termini di alimentazione corretta e mantenimento dello stato di salute è crescente, sulla base delle evidenze scientifiche.

In particolare, il ruolo protettivo contro l'insorgenza di patologie croniche degenerative di alcuni alimenti vegetali viene ascritto non solo alla presenza di vitamine C ed E ma anche di polifenoli e carotenoidi, tutti componenti a cui è stato attribuito prevalentemente un ruolo come antiossidanti.

La prevalenza di polifenoli in alimenti di origine vegetale ha ispirato una serie di studi per determinare la loro capacità nel contenere il danno ossidativo nell'uomo. E' stata dimostrata, ad esempio, una aumentata capacità antiossidante plasmatica postprandiale dopo l'assunzione di alimenti ricchi di catechine e complessi di procianidine (Dragsted O.D., 2002).

È stato anche evidenziato che i carotenoidi hanno altri numerosi effetti biologici oltre l'attività antiossidante, tra cui il miglioramento della risposta immunitaria, il controllo della crescita cellulare e della differenziazione (Stahl W. et al., 1999), la promozione di proprietà antinfiammatorie e antitumorali, la diminuzione del rischio di malattie cardiovascolari, l'azione epitelio protettiva. (Alves-Rodrigues A. et al., 2004)

Quindi il contenuto di nutrienti e bioattivi nell'alimento è importante per determinarne il valore nutrizionale, ed infatti gli alimenti vengono generalmente valutati in base alla loro composizione chimica, ossia in base al contenuto di nutrienti e di componenti bioattivi in 100 g di parte edibile dell'alimento stesso, solitamente considerato crudo. La composizione chimica è però solo una indicazione approssimativa del possibile effetto dell'alimento *in vivo*.

Infatti, i nutrienti e i componenti bioattivi presenti nell'alimento per poter essere di reale beneficio all'individuo devono essere assorbiti e passare nel torrente ematico, ossia all'interno dell'organismo. Ma affinché l'assorbimento avvenga, l'alimento deve essere prima digerito, ed i diversi componenti liberati dalla matrice devono eventualmente essere scissi in molecole più piccole.

La digestione è un processo definito come l'idrolisi enzimatica delle macromolecole organiche nelle loro componenti di base. Questo evento fisiologico e dinamico condiziona la relazione alimento/uomo ed è un passaggio obbligatorio e fondamentale affinché si ottengano molecole disponibili all'assorbimento.

La digeribilità di un alimento dipende da diversi fattori:

1. fattori soggettivi, dipendenti dall'individuo in esame. Tra essi, ad esempio, l'entità della secrezione di enzimi e bile, il grado di acidità dello stomaco, l'uso di farmaci antiacidi, ecc.;
2. fattori oggettivi, legati alle caratteristiche chimico-fisiche della matrice alimentare.

La digeribilità può essere modificata anche dai processi tecnologici a cui l'alimento è sottoposto, sia a livello industriale che casalingo. Ad esempio, trattamenti termici blandi di solito aumentano la digeribilità, mentre trattamenti termici drastici la riducono.

Anche il processo fermentativo può influenzare la digeribilità e di conseguenza la capacità antiossidante di un alimento vegetale: ad esempio la biodisponibilità delle antocianine in cavoli rossi freschi risulta maggiore del 10% rispetto a quelli fermentati (Wiczowski W. et al., 2016).

Alimenti vegetali di specie diverse possono avere diversa digeribilità, ma differenze si possono riscontrare anche nelle diverse cultivar della stessa specie.

La digeribilità è un parametro importante per la valutazione nutrizionale e salutistica di un alimento, che dipende non solo dal suo contenuto di particolari nutrienti caratteristici, ma anche, o soprattutto, dalla biodisponibilità degli stessi (ossia dalla quantità che è resa disponibile per essere assorbita).

Scopo della ricerca oggetto di questo elaborato di laurea è stato valutare, mediante un sistema di digestione *in vitro* accoppiata a sistemi di rilevazione, una eventuale differenza di digeribilità tra due varietà di peperone, la “Corno di Toro” e la “Lamuyo”, quest’ultima essendo una delle varietà maggiormente commercializzata in Italia. Sono state esaminate 3 diverse tipologie (due rosse ed una gialla) di ognuna delle due varietà di peperone.

I peperoni sono stati esaminati sia come tali, dopo estrazione con una soluzione idro-alcolica, sia dopo essere stati sottoposti a digestione *in vitro* secondo un protocollo standard che permette di mimare le fasi orale, gastrica e duodenale della digestione *in vivo*. Alla fine della digestione, il digestato è stato filtrato con membrane da 0,2 micron (campione digerito tal quale, TQ) e un'aliquota sequenzialmente filtrata con colonnine Amicon Ultra con cut-off a 3 kDa (campione digerito <3K) al fine di separare le molecole con massa molare fino a 3000 g/mol (circa 25 AA) che si sono liberate. Queste dimensioni sono compatibili con il possibile assorbimento delle molecole stesse, e quindi permettono di definire questa frazione come “bioaccessibile”.

Sui diversi campioni sia di prodotto fresco (estratto) sia di prodotto digerito (TQ e <3K) sono state effettuate le seguenti analisi:

1. contenuto in fenoli totali
2. contenuto di vitamina C
3. capacità antiossidante

I risultati ottenuti per i vari prodotti sono stati quindi confrontati, al fine di discriminare l’eventuale diversa digeribilità e bioaccessibilità delle sostanze bioattive nei diversi tipi di peperone.

Sulla base del disegno sperimentale di questo studio, infatti, le determinazioni effettuate rappresentano un parametro di digeribilità e bioaccessibilità, in quanto è evidente che se una maggiore concentrazione di sostanze si è resa potenzialmente biodisponibile il processo di digestione è avvenuto con maggiore efficienza.

Capitolo 4

Metodi

4.1 Campioni analizzati

Sono stati analizzati 3 diverse tipologie di peperone varietà Corno di toro e 3 diverse tipologie di peperone varietà Lamuyo:

Corno di toro

- Rosso E1 (CORN R E1),
- Rosso 3T (CORN 3T),
- Giallo (CORN G),

Lamuyo

- Rosso I (LAM R I),
- Rosso II (LAM R II),
- Giallo (LAM G),

4.2 Estrazione con solvente

Al fine di valutare il contenuto fenolico totale, il contenuto di Vitamina C e la capacità antiossidante totale dei peperoni tal quali è stata necessaria una estrazione preliminare. È stato utilizzato un metodo che impiega una soluzione di etanolo/acqua 70:30, che è riportato avere una buona capacità estrattiva dei composti in esame (Rababah T.M. et al., 2010) . Questi ultimi infatti possono essere sia idrosolubili (come la vitamina C e alcuni polifenoli) e quindi estraibili tramite acqua che liposolubili (per esempio, la vitamina E e i carotenoidi), estraibili con etanolo.

La procedura utilizzata è stata la seguente:

- solubilizzazione di 1 g di estratto in 8 mL di etanolo/acqua 70:30 e agitazione con vortex;
- incubazione in bagnetto termostato a 40°C per 20 minuti (agitazione con vortex dopo 10 minuti);

- centrifugazione a 3000g per 5 min;
- filtrazione e raccolta del sovranatante;
- aggiunta di 4 ml di soluzione etanolo/acqua 70:30 e agitazione con vortex;
- centrifugazione a 3000g per 10 minuti;
- filtrazione e unione dei sovrinatanti;
- unione dei sovrinatanti.

4.3 Digestione *in vitro*

Le digestioni *in vitro* delle varietà di peperone in esame sono state realizzate seguendo il protocollo standard di Minekus M. et al. (2014), un metodo standard simula fase orale, gastrica e duodenale del processo digestivo (Figura 4.1). La digestione è stata riprodotta in una beuta da 250 mL mantenuta in agitazione a una temperatura costante di 37°C mediante un bagnetto agitante termostato.

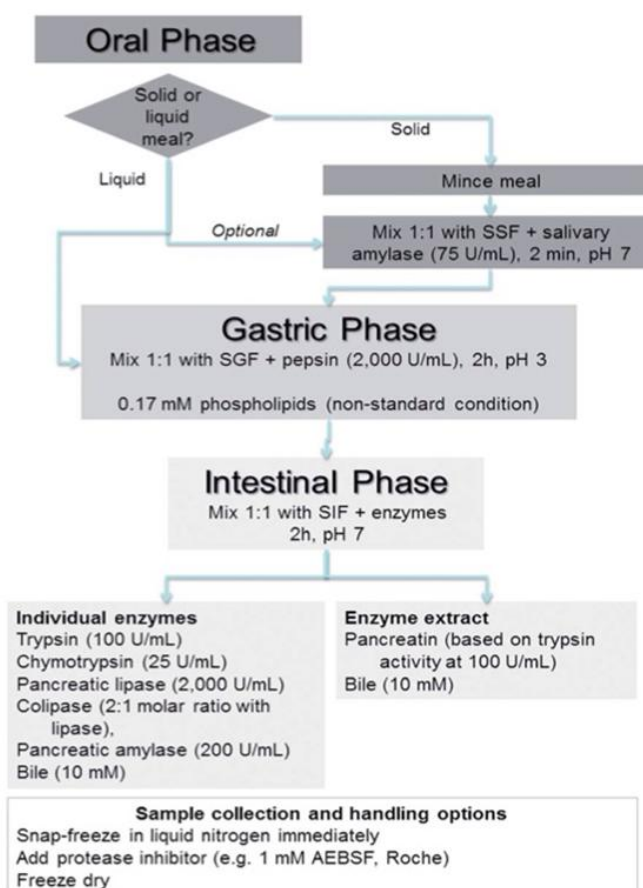


Figura 4.1 Schema della digestione *in vitro* eseguita (Minekus M. et al., 2014). SSF, SGF e SIF sono rispettivamente fluido salivare (Simulated Salivary Fluid), fluido gastrico (Simulated Gastric Fluid) e fluido salivare (Simulated Intestinal Fluid).

La composizione dei fluidi digestivi, così come il pH e i diversi periodi di permanenza, sono stati adeguati in modo da simulare le condizioni fisiologiche di bocca, stomaco e intestino e in ogni fase è stata aggiunta una soluzione tampone elettrolitica formata da KCl, KH₂PO₄, NaHCO₃, NaCl, MgCl₂(H₂O)₆, NaCO₃, CaCl₂. Volumi variabili di NaOH e HCl sono stati utilizzati per aggiustare il pH.

La masticazione e l'azione della saliva sono state riprodotte tritutando l'alimento tramite *chopper* e aggiungendo all'alimento un buffer salivare a una concentrazione di 75 U/mL di α -amilasi.

Successivamente è stata aggiunta la soluzione tampone che simula il fluido gastrico, il pH è stato ridotto a 3 usando HCl 6M e la digestione gastrica è stata così avviata con l'aggiunta di pepsina alla concentrazione finale di 2000 U/mL. Dopo 2 ore in agitazione a 37° C il pH è stato portato a 7 con NaOH 6M per fermare l'azione peptica. La digestione duodenale ha avuto inizio con l'aggiunta di fluido duodenale, bile (10 mM) e pancreatina (100 U/ml). La digestione è stata così prolungata per altre 2 ore. Al termine della digestione i campioni sono stati centrifugati (21000g per 30 min) e filtrati con membrane da 0,2 micron (campione digerito tal quale, TQ). Un'aliquota è stata poi sequenzialmente filtrata con colonnine Amicon Ultra con cut-off a 3 kDa (campione digerito <3K) al fine di separare le molecole con massa molare fino a 3000 g/mol (circa 25 AA) che si sono liberate. Queste dimensioni sono compatibili con il possibile assorbimento delle molecole stesse, e quindi permettono di definire questa frazione come "bioaccessibile".

Ogni prodotto è stato soggetto a due diverse digestioni in vitro.

4.4 Valutazione del contenuto fenolico totale (TPC)

La valutazione spettrofotometrica dei fenoli totali è stata eseguita secondo il metodo di Folin-Ciocalteau (Singleton V.L. e Rossi J. A., 1965) con alcune modifiche che permettono l'utilizzo di piastre da 96 pozzetti (Figura 4.2), come descritto da Dicko M.H. et al. (2002).

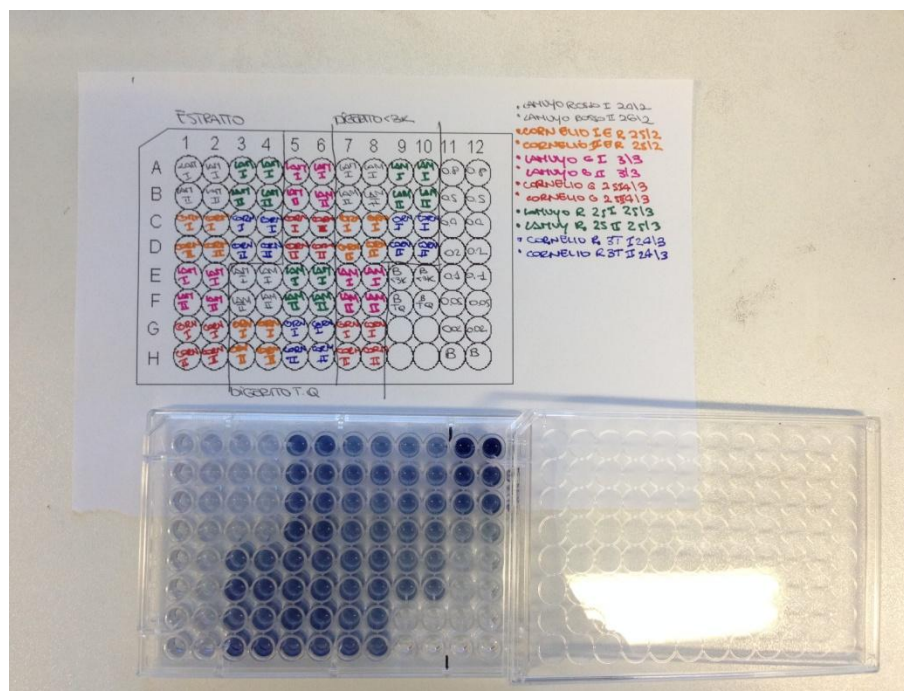


Figura 4.2 Piastra da 96 pozzetti con reattivo di Folin

Il reattivo di Folin-Ciocalteu è costituito da una miscela di acido fosfotungsticico e acido fosfomolibdico. I gruppi ossidrilici dei composti fenolici contenuti nel campione di alimento, in ambiente moderatamente basico, vengono ossidati dal reattivo a chinoni, mentre gli acidi del reattivo si riducono dando un complesso blu. La colorazione blu prodotta ha un massimo assorbimento intorno a 760 nm.

Inizialmente sono stati pipettati in ogni pozzetto 45 μL di acqua, quindi sono stati aggiunti 5 μL di estratto o di digerito e 25 μL di reattivo di Folin-Ciocalteu 50% in acqua (v/v). Dopo 5 minuti di incubazione, sono stati aggiunti 25 μL di Na_2CO_3 20% e 100 μL di acqua fino ad arrivare ad un volume finale in ogni pozzetto pari a 200 μL . Il bianco, la cui assorbanza è stata sottratta ad ogni lettura, è stato preparato sostituendo l'acqua al campione. L'assorbanza è stata misurata dopo 60 min a 750 nm con un lettore di micropiastre Infinite M200 Tecan (Tecan, Männedorf, Svizzera).

L'acido gallico è stato utilizzato come standard per la taratura. La concentrazione finale di fenoli è stata espressa in mg equivalenti di acido gallico, scelto come fenolo di riferimento, per g di campione. Tale equivalenza è resa possibile dalla conversione dei valori effettuata sulla base di una retta di taratura costruita a partire da una serie di soluzioni a concentrazione nota e variabile di acido gallico.

4.5 Valutazione del contenuto di acido ascorbico

La determinazione dell'acido ascorbico è stata effettuata mediante titolazione iodometrica diretta. Come indicatore è stata utilizzata salda d'amido che, reagendo con lo iodio, assume una colorazione blu (Figura 4.3).

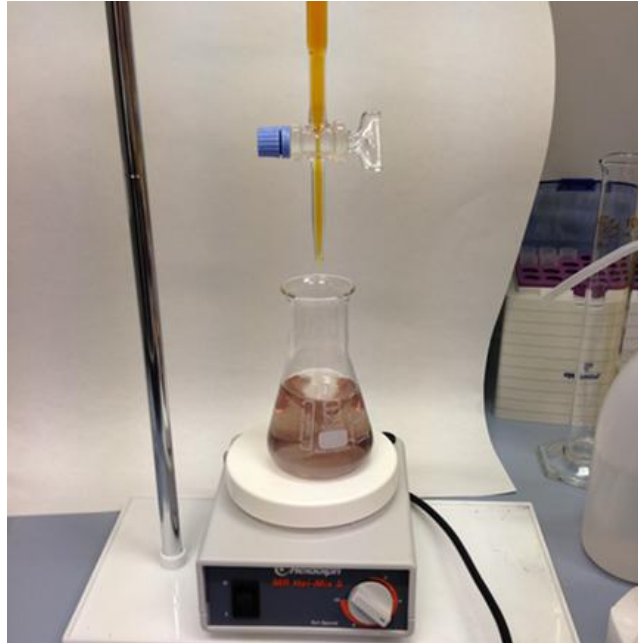
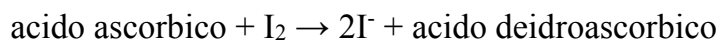


Figura 4.3 *Titolazione iodometrica*

Man mano che lo iodio è aggiunto durante la titolazione, l'acido ascorbico viene ossidato ad acido deidroascorbico, mentre lo iodio è ridotto a ioduro.

Una volta che tutto l'acido ascorbico è stato ossidato, l'eccesso di iodio è libero di reagire con l'indicatore salda d'amido formando un complesso di colore blu, che indica il punto finale della titolazione (Tadese A. et al., 2014).

Il numero di moli di acido ascorbico è stato determinato in base all'equazione seguente:



La concentrazione di Vitamina C è stata espressa come $\mu\text{mol Vit. C/g}$ di campione.

4.6 Valutazione della capacità antiossidante totale (TAC)

La valutazione della TAC è stata effettuata tramite il metodo dell'ABTS (Re R. et al., 1999), basato sulla capacità delle molecole antiossidanti presenti nel campione di svolgere un'azione di *quenching* nei confronti del catione radicalico 2,2'-azino-bis (3

etilbenzotiazolin-6-sulfonico) o $ABTS^{\bullet+}$, un cromoforo blu-verde che presenta un assorbimento caratteristico a 734 nm.

La radicalizzazione dell'ABTS è stata effettuata mediante l'aggiunta di $K_2S_2O_8$ (potassio persolfato) ad una soluzione acquosa di ABTS. La soluzione così ottenuta è stata mantenuta al buio per almeno 6 ore prima dell'utilizzo per permettere la completa radicalizzazione. È la reazione con gli antiossidanti del campione a provocare la riduzione dell'ABTS che si deradicalizza e quindi si decolora, con conseguente variazione dell'assorbimento (Figura 4.4).

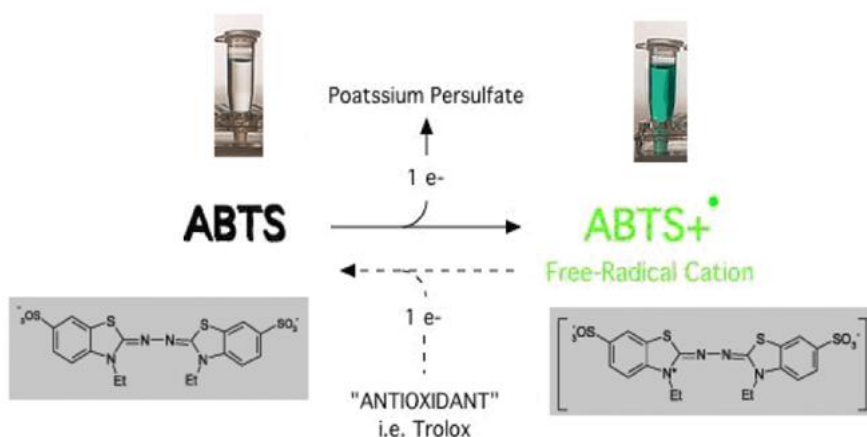


Figura 4.4 Reazione di deradicalizzazione/radicalizzazione di ABTS e $K_2S_2O_8$

L'intensità della decolorazione è proporzionale alla concentrazione di antiossidanti presenti, in accordo con la legge di Lambert-Beer.

L'azione antiradicalica dell'alimento è stata valutata comparando la sua capacità antiossidante con uno standard appropriato, quale il Trolox, un analogo idrosolubile della vitamina E, ed è stata espressa in μ mol di Trolox Equivalenti (TE)/g di digerito o di prodotto fresco.

La curva di calibrazione è stata costruita utilizzando soluzioni di Trolox in etanolo a concentrazioni scalari (0,5 mM, 1 mM e 1,5 mM).

4.7 Valutazione della digeribilità e della bioaccessibilità

La digeribilità dei diversi prodotti è stata definita come:

- contenuto di fenoli o vit C in 1 g di prodotto fresco/ contenuto di fenoli o vit C nel digerito TQ ottenuto da 1 g di prodotto fresco.

Questo rapporto è un indice della disgregazione della matrice, ossia della quantità di antiossidanti rilasciati dall'alimento stesso nel tratto gastrointestinale.

La bioaccessibilità è invece calcolata come:

- contenuto di fenoli o vit C in 1 g di prodotto fresco/ contenuto di fenoli o vit C nel digerito <3K ottenuto da 1 g di prodotto fresco.

Questo rapporto è un indice della potenziale biodisponibilità dei componenti bioattivi rilasciati.

4.8 Analisi statistica

I dati sono riportati come medie \pm DS (n= 4). L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando l'analisi della varianza ad una via ed il test di Tukey come post-test per confrontare tra loro le diverse tipologie di peperone.

Capitolo 5

Risultati

5.1 Contenuto Fenolico Totale

Le Tabelle 5.1, 5.2 e 5.3 mostrano rispettivamente il contenuto fenolico totale nei peperoni freschi opportunamente estratti, nei digeriti TQ e nelle frazioni bioaccessibili <3K.

Il contenuto fenolico totale (TPC) è apparso significativamente più elevato nel Corn G rispetto al Lam G, mentre non si sono riscontrate differenze significative tra i peperoni rossi (Tabella 5.1).

In seguito al processo digestivo (Tabella 5.2) i campioni che appaiono possedere il maggiore TPC sono entrambi i peperoni gialli LAM G e CORN G, ed il CORN R 3T, mentre i Lamuyo rossi presentano il contenuto più basso di fenoli totali. Il campione che presenta il maggiore contenuto di fenoli bioaccessibili (digerito <3K) è il CORN G, mentre il contenuto minore è stato evidenziato nel CORN R E1 e nel LAM R II (Tabella 5.3). In generale, il contenuto fenolico è apparso maggiore nell'estratto di peperone fresco rispetto al digerito. È quindi evidente che l'estrazione chimica con il solvente usato è in grado di liberare dalla matrice una maggiore quantità di sostanze fenoliche rispetto al processo digestivo in vitro.

	TPC (mg GAE/g)
Campioni	Prodotto fresco
LAM R I	1,092 ± 0,057 ^{a,b}
CORN R E1	1,179 ± 0,037 ^a
LAM R II	1,088 ± 0,026 ^{a,b}
CORN R 3T	1,030 ± 0,051 ^{a,b}
LAM G	0,945 ± 0,074 ^b
CORN G	1,167 ± 0,134 ^a

Tabella 5.1. Contenuto fenolico totale (TPC) dell'estratto di peperoni freschi.
 I dati sono stati riportati come medie ± DS. L'analisi statistica è stata effettuata mediante ANOVA a una via ($p < 0,01$) utilizzando il test di Tukey come post test. Lettere diverse indicano differenze significative.

	TPC (mg GAE/g)
Campioni	Digerito TQ
LAM R I	0,525 ± 0,069 ^c
CORN R E1	0,527 ± 0,048 ^{b,c}
LAM R II	0,489 ± 0,023 ^c
CORN R 3T	0,638 ± 0,062 ^{a,b}
LAM G	0,659 ± 0,027 ^a
CORN G	0,637 ± 0,049 ^{a,b}

Tabella 5.2. Contenuto fenolico totale (TPC) di digeriti TQ.
 I dati sono stati riportati come medie ± DS. L'analisi statistica è stata effettuata mediante ANOVA a una via ($p < 0,001$) utilizzando il test di Tukey come post test. Lettere diverse indicano differenze significative.

	TPC (mg GAE/g)
Campioni	Frazione <3K
LAM R I	0,524 ± 0,043 ^b
CORN R E1	0,275 ± 0,005 ^c
LAM R II	0,342 ± 0,034 ^c
CORN R 3T	0,465 ± 0,042 ^b
LAM G	0,492 ± 0,014 ^b
CORN G	0,606 ± 0,045 ^a

Tabella 5.3. Contenuto fenolico totale (TPC) di frazioni digerite <3K.

I dati sono stati riportati come medie ± DS. L'analisi statistica è stata effettuata mediante ANOVA a una via ($p < 0,001$) utilizzando il test di Tukey come post test. Lettere diverse indicano differenze significative.

5.2 Contenuto di Vitamina C

Le Tabelle 5.4, 5.5 e 5.6 mostrano il contenuto di Vitamina C nei peperoni freschi, nei digeriti TQ e nelle frazioni <3K.

Nel prodotto fresco il contenuto di acido ascorbico è apparso variare significativamente a seconda della tipologia del peperone, con una minore concentrazione della vitamina nel peperone CORN R 3T e nei peperoni gialli (Tabella 5.4).

La digestione *in vitro* determina, in tutte le tipologie, una liberazione di Vitamina C dalla matrice e nella quasi totalità dei campioni il processo appare più efficace dell'estrazione chimica. Considerando il digerito TQ la tipologia Corn R E1 presenta una concentrazione di acido ascorbico significativamente superiore rispetto a tutte le altre tipologie, mentre la concentrazione più bassa è riferibile alle varietà LAM R1, CORN R 3T e LAM G (Tabella 5.5).

I campioni in cui la digestione rilascia il maggiore contenuto di Vitamina C bioaccessibile (digerito <3K) sono LAM R I, CORN R 3T e CORN G (Tabella 5.6).

	Vit. C ($\mu\text{mol Vit. C/g}$)
Campioni	Prodotto fresco
LAM R I	6,0750 \pm 0,106 ^b
CORN R E1	6,4500 \pm 0,212 ^{a,b}
LAM R II	6,5250 \pm 0,318 ^a
CORN R 3T	4,7250 \pm 0,106 ^d
LAM G	5,1750 \pm 0,106 ^c
CORN G	5,3250 \pm 0,106 ^c

Tabella 5.4. Contenuto in Vitamina C nell'estratto di peperoni freschi.

I dati sono stati riportati come medie \pm DS. L'analisi statistica è stata effettuata mediante ANOVA a una via ($p < 0,001$) utilizzando il test di Tukey come post test. Lettere diverse indicano differenze significative.

	Vit. C ($\mu\text{mol Vit. C/g}$)
Campioni	Digerito TQ
LAM R I	5,850 \pm 0,289 ^{c,d}
CORN R E1	8,800 \pm 0,041 ^a
LAM R II	7,507 \pm 0,777 ^b
CORN R 3T	4,900 \pm 0,344 ^d
LAM G	5,250 \pm 0,378 ^d
CORN G	6,550 \pm 0,715 ^{b,c}

Tabella 5.5. Contenuto in Vitamina C di digeriti TQ.

I dati sono stati riportati come medie \pm DS. L'analisi statistica è stata effettuata mediante ANOVA a una via ($p < 0,001$) utilizzando il test di Tukey come post test. Lettere diverse indicano differenze significative.

	Vit. C ($\mu\text{mol Vit. C/g}$)
Campioni	Frazione <3K
LAM R 1	4,567 \pm 0,252 ^a
CORN R E1	3,367 \pm 0,067 ^c
LAM R II	2,367 \pm 0,001 ^d
CORN R 3T	4,167 \pm 0,393 ^{a,b}
LAM G	3,767 \pm 0,073 ^b
CORN G	4,167 \pm 0,393 ^{a,b}

Tabella 5.6. Contenuto in Vitamina C di frazioni digerite <3K.

I dati sono stati riportati come medie \pm DS. L'analisi statistica è stata effettuata mediante ANOVA a una via ($p < 0,001$) utilizzando il test di Tukey come post test. Lettere diverse indicano differenze significative.

5.3 Capacità antiossidante totale

Le Tabelle 5.7, 5.8 e 5.9 mostrano i valori di capacità antiossidante totale rispettivamente in peperoni freschi, digerito TQ e frazione <3K.

Nel prodotto fresco la TAC è apparsa differire significativamente nelle diverse tipologie di peperoni, come osservabile in Tabella 5.7. Questa differenza si riduce nel digerito TQ, e scompare nella frazione di digerito <3K (Tabelle 5.8 e 5.9).

In generale, la TAC è apparsa estremamente più alta nei digeriti rispetto ai vegetali freschi; questo dipende sicuramente dal rilascio di molecole bioattive durante la digestione, ma anche alla presenza di antiossidanti nei succhi digestivi.

	TAC ($\mu\text{mol TE/g}$)
Campioni	Prodotto fresco
LAM R 1	7,950 \pm 0,543 ^{a,b}
CORN R E1	8,630 \pm 0,692 ^a
LAM R II	8,096 \pm 0,600 ^{a,b}
CORN R 3T	6,533 \pm 0,016 ^c
LAM G	6,848 \pm 0,227 ^c
CORN G	7,196 \pm 0,558 ^{b,c}

Tabella 5.7. TAC dell'estratto di peperoni freschi.

I dati sono stati riportati come medie \pm DS. L'analisi statistica è stata effettuata mediante ANOVA a una via ($p < 0,01$) utilizzando il test di Tukey come post test. Lettere diverse indicano differenze significative.

	TAC ($\mu\text{mol TE/g}$)
Campioni	Digerito TQ
LAM R I	58,909 \pm 4,064 ^a
CORN R E1	50,005 \pm 4,654 ^{a,b}
LAM R II	49,582 \pm 5,271 ^b
CORN R 3T	49,357 \pm 4,806 ^b
LAM G	54,908 \pm 0,826 ^{a,b}
CORN G	54,135 \pm 2,598 ^{a,b}

Tabella 5.8. TAC di digeriti TQ.

I dati sono stati riportati come medie \pm DS. L'analisi statistica è stata effettuata mediante ANOVA a una via ($p < 0,05$) utilizzando il test di Tukey come post test. Lettere diverse indicano differenze significative.

	TAC ($\mu\text{mol TE/g}$)
Campioni	Frazione <3K
LAM R I	31,179 \pm 3,098
CORN R E1	31,043 \pm 1,886
LAM R II	31,484 \pm 4,602
CORN R 3T	36,335 \pm 2,126
LAM G	34,254 \pm 3,017
CORN G	32,442 \pm 3,631

Tabella 5.9. TAC di frazioni <3K.

I dati sono stati riportati come medie \pm DS. L'analisi statistica è stata effettuata mediante ANOVA a una via (frazione <3K: ns).

Si è quindi proceduto a calcolare la digeribilità delle diverse tipologie di peperone, intesa come rapporto tra la concentrazione di fenoli totali e di vitamina C nel digerito e nella stessa quantità di prodotto fresco, non digerito.

Questo rapporto è un indice indiretto di digeribilità, in quanto indica :

- l'efficienza del processo digestivo relativo alla liberazione del composto in esame dalla matrice (indice di digeribilità, definibile come rapporto digerito TQ/estratto dell'alimento fresco x 100)
- l'efficienza del processo digestivo relativa alla liberazione dalla matrice di molecole sufficientemente piccole da poter essere assorbite (indice di bioaccessibilità, definibile come rapporto digerito <3K/estratto dell'alimento fresco x 100).

Utilizzando i fenoli totali come componente di riferimento, l'indice di digeribilità dei diversi tipi di peperone è apparso significativamente diverso ($p < 0.001$). Come evidenziato in Figura 5.1 A il LAM G e il CORN 3T presentano i più alti indici di digeribilità.

Anche l'indice di bioaccessibilità relativo ai fenoli è apparso differire significativamente nelle diverse tipologie di peperoni ($p < 0.001$), ed è apparso più elevato nei peperoni gialli, senza differenza tra le due tipologie, nel LAM R1 e nel CORN R 3T (Figura 5.1 B).

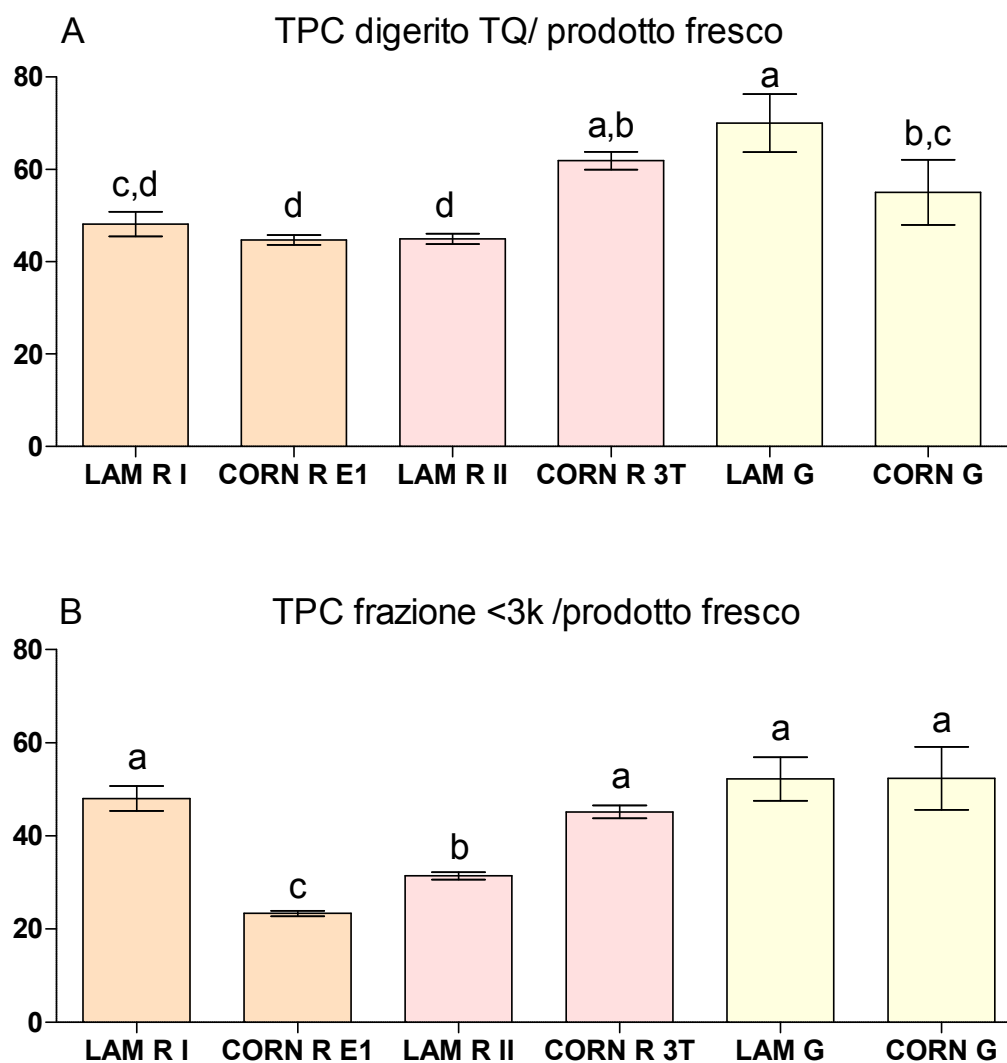


Figura 5.1 Digeribilità (A) e Bioaccessibilità (B) dei fenoli totali.

I dati sono stati riportati come medie \pm DS. L'analisi statistica è stata effettuata mediante ANOVA a una via (A e B: $p < 0,001$) utilizzando il test di Tukey come post test. Lettere diverse indicano differenze significative.

Anche considerando la vitamina C come componente di riferimento, gli indici di digeribilità e bioaccessibilità dei diversi tipi di peperone sono apparsi significativamente diversi (Figura 5.2).

Come evidenziato in Figura 2A il CORN R E1 ha mostrato l'indice di digeribilità più elevato, tuttavia è il CORN R 3T che presenta il più elevato indice di bioaccessibilità (Figura 5.2 B).

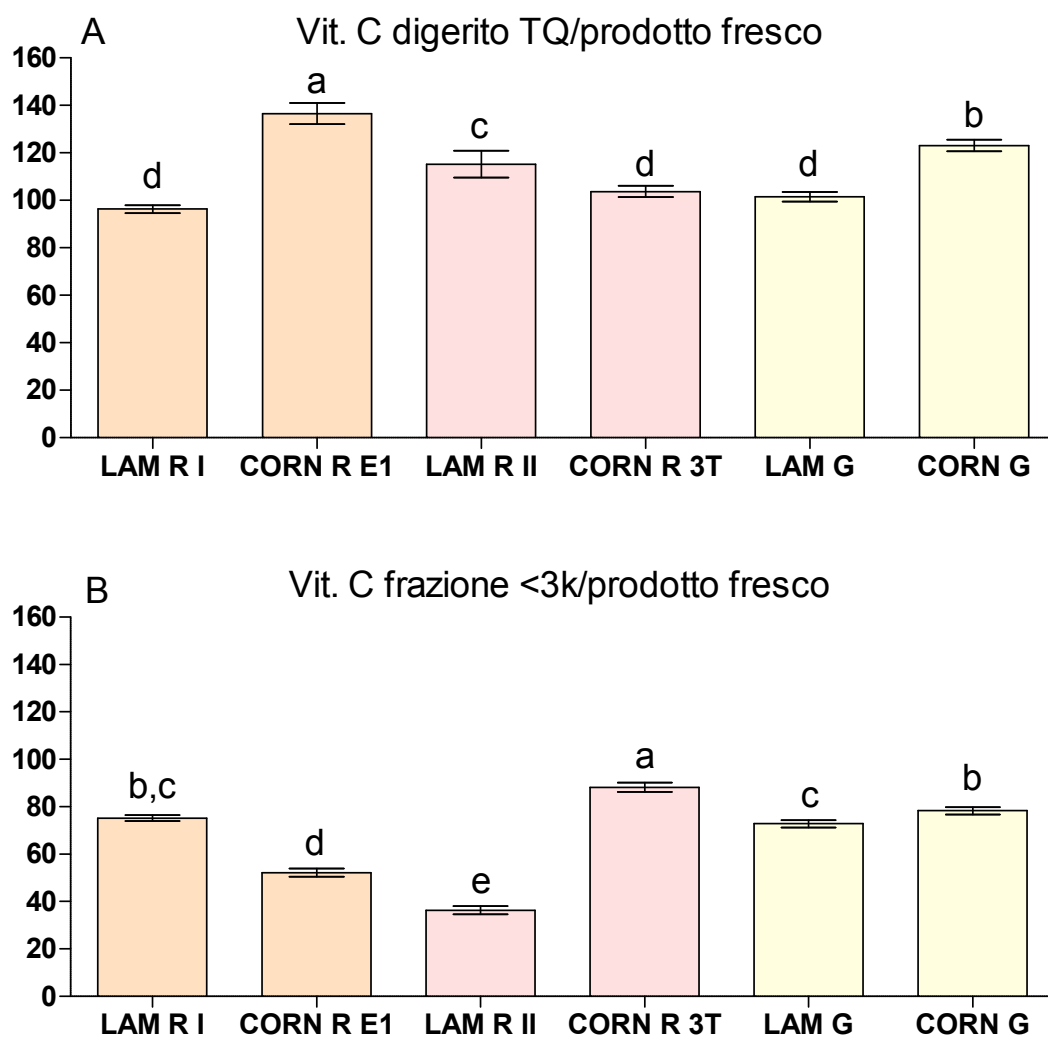


Figura 5.2 Digeribilità (A) e Bioaccessibilità (B) della Vitamina C.

I dati sono stati riportati come medie \pm DS. L'analisi statistica è stata effettuata mediante ANOVA a una via (A e B: $p < 0,001$) utilizzando il test di Tukey come post test. Lettere diverse indicano differenze significative.

I dati di TAC dell'estratto del prodotto fresco e del digerito non sono stati utilizzati per ricavare gli indici di digeribilità e bioaccessibilità dal momento che al valore ottenuto nel digerito contribuisce anche la presenza di sostanze ad azione antiossidante presenti nei tamponi di digestione, quali ad esempio i sali biliari.

Capitolo 6

Discussione

Studi epidemiologici mostrano quanto le abitudini alimentari incidano sulla comparsa di numerose patologie degenerative.

Si è evidenziata una correlazione inversa fra assunzione di frutta e verdura e mortalità per malattie dismetaboliche, aterosclerosi, malattie cardiovascolari e neoplasie, e la WHO ha stimato che l'assunzione insufficiente di frutta e verdura causi circa il 14% di morti per tumori gastroenterici, circa l'11% di morti per malattie cardiache ischemiche e circa il 9% di morti per infarto nel mondo (WHO, 2009).

Un discreto numero di molecole biologicamente attive contenute nei cibi vegetali esercitano un ruolo preventivo e favorevole su molteplici funzioni dell'organismo, con meccanismi d'azione spesso legati alla modulazione diretta e indiretta dello stress ossidativo. Acido ascorbico, tocoferoli, carotenoidi, polifenoli, ecc. posseggono notevole attività antiossidante e giocano un ruolo positivo ed essenziale nella conservazione dello stato di salute (De Lorenzo A. e Di Renzo L., 2006).

Da queste consapevolezza è nata la raccomandazione alla popolazione di consumare frutta e verdura almeno 5 volte al giorno per un valore in peso pari a 400 g/ die (www.eufic.org). Tuttavia in Italia la quota di persone che aderisce al *five a day* non è aumentata nel tempo, anzi si è osservata una lieve ma significativa riduzione a livello nazionale e ad oggi solo uno adulto su dieci ne consuma la quantità raccomandata (www.epicentro.iss.it).

La dimostrazione degli effetti positivi dei composti bioattivi, i suggerimenti delle linee guida per una corretta alimentazione, e nel contempo il decremento dell'assunzione di frutta e verdura hanno fortemente attratto l'attenzione del settore agronomico e dell'industria alimentare che hanno valutato ipotesi di lavoro per aumentare il contenuto di composti funzionali in alimenti vegetali. E' noto che questo è possibile tramite tecniche agronomiche e di produzione; ad esempio, incrementando la fertilizzazione in campo con NO_3^- e Ca^{2+} , aumenta il contenuto di β -carotene e luteina nei peperoni (Flores P. et al., 2004). Il contenuto di bioattivi è anche influenzato dal

periodo di raccolta e dalle tecnologie post-raccolta (Novillo P. et al., 2015), ma una strategia importante è la selezione delle cultivar a più alta valenza nutrizionale.

È infatti noto che la concentrazione di composti bioattivi può essere molto diversa anche tra cultivar della stessa specie di vegetale (Guil-Guerrero J.L. et al., 2006; Danesi et al., 2008).

Quindi l'esplorazione delle varietà esistenti per specifici componenti o il recupero e la valorizzazione di colture locali, spesso fonti importanti di bioattivi, possono contribuire a creare mercati specializzati in ortaggi funzionali. Purtroppo molto spesso la selezione di una cultivar rispetto ad un'altra si basa su requisiti diversi da questi, quali ad esempio la produttività, e ciò ha portato alla perdita di prodotti tradizionali o "antichi" e quindi al loro contributo in vista di una nutrizione ottimale.

Sono così nati molti studi volti ad evidenziare il contenuto quali-quantitativo delle diverse molecole bioattive nei prodotti vegetali.

Tuttavia questi studi sono spesso basati su metodi che non tengono conto della biodisponibilità dei diversi componenti antiossidanti e funzionali. La biodisponibilità è la percentuale del contenuto totale di un nutriente o "non nutriente" che viene assorbita e successivamente utilizzata dall'organismo per le sue specifiche funzioni, eventualmente dopo essere stata convertita in un'altra forma; è quindi la misura della quantità di forma attiva di un componente nel plasma sanguigno, dopo passaggio intestinale. La biodisponibilità dipende dalla bioaccessibilità, cioè dalla quantità di un nutriente o "non nutriente" di un alimento che è stata digerita e rilasciata dalla matrice alimentare nel tratto gastro-intestinale, rendendosi quindi potenzialmente disponibile all'assorbimento.

I risultati ottenuti mostrano chiaramente che nell'estratto di peperone fresco il contenuto di vitamina C, composti fenolici e capacità antiossidante è diverso nelle varie cultivar, in accordo con altri studi in letteratura (Nadeem M et al., 2011).

In particolare per quanto riguarda il contenuto fenolico non sono state rilevate differenze significative tra i peperoni rossi, mentre tra i peperoni gialli la varietà Corno di Toro ha mostrato un contenuto più alto rispetto alla varietà Lamuyo. Per quanto concerne la Vitamina C invece i più elevati valori sono stati visti in tre dei quattro peperoni rossi analizzati, in accordo a quanto riportato in letteratura (Zhang D. et al. 2003).

Tuttavia è interessante notare che i campioni con i più elevati valori di Vit. C e TPC prima della digestione non necessariamente sono quelli che presentano i contenuti maggiori dei bioattivi dopo la digestione (digeriti TQ) e dopo l'ultrafiltrazione (frazioni <3K).

Per questo si è proceduto a calcolare

i) la digeribilità delle diverse tipologie di peperone, intesa come rapporto tra la concentrazione di fenoli totali e di vitamina C nel digerito TQ e nella stessa quantità di prodotto fresco, non digerito;

ii) la bioaccessibilità delle diverse tipologie di peperone, intesa come rapporto tra la concentrazione di fenoli totali e di vitamina C nella frazione digerita < 3K e nella stessa quantità di prodotto fresco, non digerito.

Quest'ultimo indice appare più importante dal punto di vista nutrizionale poiché ci da una stima potenziale delle molecole che effettivamente potrebbero esprimere la loro attività biologica positiva nell'organismo. Occorre però considerare che non tiene conto né della possibile attività degli enzimi presenti nella mucosa intestinale né dell'azione degradativa della flora microbica intestinale, che contribuisce significativamente a rendere bioaccessibili le molecole bioattive.

Per quanto riguarda l'indice di bioaccessibilità nei peperoni rossi sono state evidenziate differenze significative sia utilizzando i composti fenolici che la vitamina C come riferimento. Tali differenze sono apparse essere presenti non solo tra le due varietà, ma anche all'interno di ogni varietà. In particolare, tra i peperoni rossi il CORN R3T è apparso avere il maggiore indice di bioaccessibilità, mentre la varietà LAM RII è apparsa quella con gli indici più bassi.

Le differenze tra le due cultivar sono apparse minori confrontando i peperoni gialli.

Ulteriori analisi al momento in corso valuteranno anche il contenuto di carotenoidi totali, sia nei prodotti freschi che nei digeriti. Infatti la concentrazione di queste molecole nei peperoni dipende dalla genetica, dalle caratteristiche fisiologiche e morfologiche intrinseche alla cultivar e dai fattori pedo-climatici (Loizzo M.R. et al., 2013) e in letteratura è stato già messo in evidenza un differente contenuto di β -carotene tra varie cultivar di peperone (Deepa et al., 2006). È quindi opportuno anche in questo studio determinare i carotenoidi nelle diverse tipologie di peperone e valutarne la loro digeribilità e biodisponibilità come fatto per le altre principali

molecole bioattive caratteristiche dei peperoni.

Inoltre, le possibili differenze tra i campioni digeriti verranno valutati tramite NMR dal gruppo di ricerca di Chimica (Prof. Francesco Capozzi) del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari. Ciò permetterà di stimare in maniera semi-quantitativa le sostanze rilasciate durante la digestione, fornendo una visione globale del processo. Questa tecnica è estremamente all'avanguardia, e sempre più considerata uno strumento fondamentale per valutare un alimento ed il suo significato nutrizionale. Sebbene il processo di digestione in vitro sia una simulazione parziale ed incompleta di quanto accade in vivo, la valutazione di un alimento dopo averlo sottoposto a tale processo rappresenta un importante passo avanti nello studio delle proprietà e del valore nutrizionale degli alimenti, dal momento che tale valutazione è a tutt'oggi basata su analisi chimico-analitiche che non tengono conto delle differenze di bioaccessibilità dei diversi componenti.

Riferimenti bibliografici

Alexandropoulou I., Komaitis M., Kapsokefalou M. *Effects of iron, ascorbate, meat and casein on the antioxidant capacity of green tea under conditions of in vitro digestion.* Food Chemistry, 2006, 94:359-365.

Alía M., Ramos S., Mateos R., Granado-Serrano A.B., Bravo L., Goya L. *Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide.* Toxicology and Applied Pharmacology, 2006, 212:110-118.

Alves-Rodrigues A., Shao A. *The science behind lutein.* Toxicology Letters, 2004,150:57-83.

Armand M. *Lipases and lipolysis in the human digestive tract: where do we stand?* Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care, 2007, 10:156-164.

Aschoff J.K., Kaufmann S., Kalkan O., Neidhart S., Carle R., Schweiggert R.M. *In vitro Bioaccessibility of Carotenoids, flavonoids, and vitamin C from differently processed oranges and orange juices [Citrus sinensis (L.) Osbeck].* Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2015, 63: 578-587.

Bakala N'Goma J.C., Amara S., Dridi K., Janin V., Carriere F. *Understanding the lipid-digestion processes in the GI tract before desiging lipid-based drug-delivery systems.* Therapeutic delivery, 2012, 3:105-124.

Berne R.B., Levy M.N., Koeppen B.M., Stanton B.A. *Fisiologia.* Quarta Edizione, Casa Editrice Ambrosiana, 2000.

Bosland P.W., Votava E.J. *Peppers:vegetable and spice capsicums.* CABI Publishing, 2000.

Bourlieu C., Michalski M.C. *Structure-function relationship of milk fat globule*. Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care, 2015, 18:118-127.

Bourlieu C., Ménard O., De La Chevasnerie A., Sams L., Rousseau F., Madec M., Robert B., Deglaire A., Pezennec S., Bouhallab S., Carrière F., Dupont C. *The structure of infant formulas impacts their lypolysis, proteolysis and disintegration during in vitro digestion*. Food Chemistry, 2015, 182:224-235.

Carratu B., Sanzini E. *Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale*. Annuario istituto superiore della sanità, 2005, 41:7-16.

Carrière F., Grandval P., Renou C., Palomba A., Prieri F., Giallo J., Henniges F., Sander-Struckmeier S., Laugier R. *Quantitative study of digestive enzyme secretion and gastrointestinal lipolysis in chronic pancreatitis*. Clinical Gastroenterology and Hepatology, 2005, 3:28-38.

Costantini A.M., Cannella C., Tomassi G. *Alimentazione e nutrizione umana*. Il pensiero scientifico editore, 2006.

Danesi F., Elementi S., Neri R., Maranesi M., D'Antuono L.F., Bordoni A. *Effect of cultivar on the protection of cardiomyocytes from oxidative stress by essential oils and aqueous extracts of basil (*Ocimum basilicum L.*)*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2008, 56:9911-9917.

De Lorenzo A., Di Renzo L. *Nutrire per prevenire, quali nuovi indicatori di rischio nutrizionale?* Università degli Studi di Roma "Tor Vergata", Scuola di specializzazione in Scienze dell'Alimentazione, 2006.

De Marino S., Borbone N., Gala F., Zollo F., Fico G., Pagiotti R., Iorizzi M. *New constituents of sweet *Capsicum annum L.* fruits and evaluation of their biological activity*, Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2006, 54:7508-7516.

- Deepa N.**, Charanjit K., Singh B., Kapoor H.C. *Antioxidant activity in some red bell pepper cultivars*. Journal of Food and Composition and Analysis, 2006, 19: 572–578.
- Del Rio D.**, Rodriguez-Mateos A., Spencer J.P., Tognolini M., Borges G., Crozier A. *Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases*. Antioxidants & redox signaling, 2013, 18:1818-1892.
- Dicko M.H.**, Hilhorst R., Gruppen H., Traore A.S., Laane C., Van Berkel W.J.H., Voeagen A.G.J. *Comparison of content of phenolic compounds, polyphenol oxidase, and peroxidase in grains of fifty sorghum varieties from Burkina Faso*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2002, 50:3780-3788.
- Dragsted O.D.** *Antioxidant Actions of Polyphenols in Humans*. International Journal for Vitamin and Nutrition Research, 2003, 73:112–119.
- Durak A.**, Gawlik-Dziki U., Kowlska I. *Coffee with ginger -Interactions of biologically active phytochemicals in the model system*. Food Chemistry, 2015, 166:261-269.
- Flores P.**, Navarro J. M., Garrido C., Rubio J. S., Martínez V. *Influence of Ca²⁺, K⁺ and NO₃⁻ fertilisation on nutritional quality of pepper*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2004, 84:569-574.
- Garcia-Alloza M.**, Borrelli L. A., Rozkalne A., Hyman B. T., Bacskai, B. J. *Curcumin labels amyloid pathology in vivo, disrupts existing plaques, and partially restores distorted neurites in an Alzheimer mouse model*. Journal of neurochemistry, 2007, 102:1095-1104.
- Gaviao M.B.D.**, Engelen L., Van Der Bilt A. *Chewing behaviour and salivary secretion*. European Journal of Oral Science. 2004, 112: 19-24.

Guil-Guerrero J.L., Martinez-Guirado C., Del Mar Reboloso-Fuentes M., Carrique-Perez A. *Nutrient composition and antioxidant activity of 10 pepper (*Capsicum annuum*) varieties*. European Food Research and Technology, 2006, 224:1-9.

Han X., Shen T., Lou H. *Dietary polyphenols and their biological significance*. International Journal of Molecular Sciences, 2007, 8:950-988.

Hamzaliou A., Gokmen V. *Investigation of the reaction of acrylamide during in vitro multistep enzymatic digestion of thermally processed food*. Food Function, 2015, 6:109-114.

Hoebler C., Karinthe A., Devaux M., Guillon F., Gallant D., Bouchet B., Melegari C., Barry J. *Physical and chemical transformations of cereal food during oral digestion in human subjects*. British Journal of Nutrition, 1998, 80:429-436.

Hornero-Méndez D., Gómez-Ladrón de Guevara R., Minguez-Mosquera, M. I. *Carotenoid biosynthesis changes in five red pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars during ripening. Cultivar selection for breeding*. Journal of agricultural and food chemistry, 2000, 48:3857-3864.

Humphrey S.P., Williamson R.T. *A review of saliva: normal composition, flow, and function*. The Journal of Prosthetic. Dentistry. 2001, 85, 162-169.

Hur S.J., Lim B.O., Decker E.A., McClements D.J. *In vitro human digestion models for food application*. Food Chemistry, 2011, 125:1-12.

Kunnumakkara A.B., Guha S., Krishnan S., Diagaradjane P., Gelovani J., Aggarwal B.B. *Curcumin potentiates antitumor activity of gemcitabine in an orthotopic model of pancreatic cancer through suppression of proliferation, angiogenesis, and inhibition of nuclear factor-kappaB-regulated gene products*. Cancer Research, 2007, 67:3853-3861.

Lengsfeld H., Beaumier-Gallon G., Chahinian H., De Caro A., Verger R., Laugier R. *Lipases and phospholipases in drug development*. Wiley-VCHG. G. Muller & S. Petry Eds., 2004.

Loizzo M.R., Pugliese A., Bonesi M., De Luca D., O'Brien N., Menichini F., Tundis R. *Influence of drying and cooking process on the phytochemical content, antioxidant and hypoglycaemic properties of two bell Capsicum annum L. cultivars*. Food and Chemical Toxicology, 2013, 53:392-401.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. *Polyphenols: food sources and bioavailability*. American Journal of Clinical Nutrition, 2004, 79:727-747.

Minekus M., Alming M., Alvito P., balance S., Bohn T., Bourlieu C., Carriere F., Boutrou R., Corredig M., Dupont D., Dufour C., Egger L., Golding M.,Karakaya S., Kirkhus B., Le Feunteun S., Lesmes U., Macierzanka A., Mackie A., Marze S., McClements D.J., Menard O., Recio I., Santos C.N., Singh R.P., Vegarud G.E., Wickham M.S.J., Weitschies W., Brodkorb A. *A standardised static in vitro digestion method suitable for food- an international consensus*, Food and Function, 2014, 5: 1113-1124.

Mokhtar M., Soukup J., Donato P., Cacciola F., Dugo P., Riazi A., Mondello, L. *Determination of the polyphenolic content of a Capsicum annum L. extract by liquid chromatography coupled to photodiode array and mass spectrometry detection and evaluation of its biological activity*. Journal of Separation Science, 2015, 38:171-178.

Nadeem M., Anjum F.M., Khan M.R., Saeed M., Riaz A. *Antioxidant potential of Bell Pepper (Capsicum annum L.)*. Pakistan Journal of Food Science, 2011, 21:45-51.

Oliveira A., Pintado M. *Stability of polyphenols and carotenoids in strawberry and peach yoghurt throughout in vitro gastrointestinal digestion*. Food and Function, 2015, 6:1611-1619.

Oomen A.G., Rompelberg C.J.M., Bruil M.A., Dobbe C.J.G., Pereboom D.P.K.H., Sips, A.J.A.M. *Development of an in vitro digestion model estimating the bioaccessibility of soil contaminants*. *Achieves of Environmental Contamination and Toxicology*, 2003, 44:281-287.

Osuna-Garcia J.A. *Red color retention during paprika (Capsicum Annuum L.) storage as affected by natural antioxidants and moisture content*. PhD dissertation, New Mexico State University, 1996.

Pedersen A., Bardow A., Jensen S.B., Nauntofte B. *Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion*. *Oral Disease*, 2002, 8: 117-129.

Piper D.W., Fenton B.H. *pH stability and activity curves of pepsin with special reference to their clinical importance*. *Gut*, 1965, 5:506-8.

Pugliese A., O'Callaghan Y., Tundis R., Galvin K., Menichini F., O'Brien N., Loizzo M.R. *In vitro Assessment of the Bioaccessibility of Carotenoids from Sun-Dried Chilli Peppers*. *Plants Food for Human Nutrition*, 2014, 1:8-17.

Rababah T. M., Banat F., Rababah A., Ereifej K., Yang W. *Optimization of extraction conditions of total phenolics, antioxidant activities, and anthocyanin of oregano, thyme, terebinth, and pomegranate*. *Journal of food science*, 2010, 75:626-C632

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, 26:1231-1237.

Reboul E., Richelle M., Perrot E., Desmoulins-Malezet C., Pirisi, V., Borel, P. *Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary sources*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006 54:8749-8755.

Rodriguez-Amaya D.B. *Nature and distribution of carotenoids in foods.* Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1993, p. 547.

Ross K., *Concepts important in understanding the health benefits of phenolics in fruits and vegetables: extractables and non-extractables phenolics and the influence of cells wall polysaccharides on bioaccessibility and bioavailability.* Research in Health and Nutrition, 2014, 2:29-43.

Rubio L., Macia A., Castell-Auvi A., Pinent M., Blay M.T., Ardèvol A., Romero M.P., Motilva J. *Effect of the co-occurring olive oil and thyme extracts on the phenolic bioaccessibility and bioavailability assessed by in vitro digestion and cell models.* Food Chemistry , 2014,149:277-84.

Sagun K.C., Cárcamo J. M., Golde D. W. *Vitamin C enters mitochondria via facilitative glucose transporter 1 (Glut1) and confers mitochondrial protection against oxidative injury.* The FASEB Journal, 2005, 19:1657-1667.

Sansavini S., Ranalli P., *Manuale di ortofrutticoltura*, Edagricole, 2012.

Singleton V.L., Rossi J.A. *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents.* American Journal of Enology and Viticulture, 1965, 16:144-158.

Seiquer I., Rueda A., Olalla M., Cabrera-Vique C. *Assessing the bioavailability of polyphenols and antioxidant properties of extra virgin argan oil by simulated digestion and Caco-2 cell assays. Comparative study with extra virgin olive oil.* Food Chemistry, 2015, 188:496-503.

Shixian Q., Dai Y., Kakuda Y., Shi J., Mittal G., Yeung D., Jiang, Y. *Synergistic anti-oxidative effects of lycopene with other bioactive compounds.* Food Reviews International, 2005, 21:295-311.

Schweiggert U., Schieber A., Carle R. Effects of blanching and storage on *capsaicinoid stability and peroxidase activity of hot chili peppers (Capsicum frutescens L.)*. *Innovation of Food Science and Emerging Technologies*, 2006, 7: 217–224.

Somos A. *The Paprika*, 1984, Akadémiai Kiadó editore.

Stahl W., Sies H. Carotenoids: occurrence, biochemical activities, and bioavailability. In: *Antioxidant Food Supplements in Human Health*. Packer L., Hiramatsu M., Yoshikawa T., Academic Press, 1999.

Sun T., Xu Z., Wu C.T., Janes M., Prinyawiwatkul W., No H.K. *Antioxidant Activities of Different Colored Sweet Bell Peppers (Capsicum annuum L.)*. *Journal of Food Science*, 2007, 72:98-102.

Tadese A., Subramanian P.A., Woldu A., Pal R. *Electrochemical determination and comparison of ascorbic acid in freshly prepared and bottled fruit juices: A cyclic voltammetric study*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2014, 6:880-888.

Torabi H. *Identification of novel capsaicinoids*. MS Thesis, New Mexico State University, 1997.

Van Het Hof K. H., West C. E., Weststrate J. A., Hautvast J. G. *Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids*. *The Journal of nutrition*, 2000, 130:503-506.

Wiczowski W., Szawara-Nowak D., Romaszko J. *The impact of red cabbage fermentation on bioavailability of anthocyanins and antioxidant capacity of human plasma*. *Food Chemistry*, 2016, 190:730-740.

World Health Organization (2009). Global Health Risks Summary Tables. WHO: Geneva, Switzerland.

Zhang D., Hamauzu Y. *Phenolic compounds, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant properties of green, red and yellow bell peppers*. Food, Agriculture & Environment, 2003, 1:22-27.

www.eufic.org

www.epicentro.iss.it

Dedico la mia tesi di laurea a mio padre, presente in questa celebre giornata, come in ogni altro momento della mia vita. A lui devo tutta la mia forza.

Colgo inoltre l'occasione per ringraziare tutti coloro che in vari modi hanno contribuito alla realizzazione di questo elaborato.

In primo luogo, un ringraziamento particolare è rivolto alla Prof.ssa Alessandra Bordoni, relatrice di questa tesi di Laurea per la passione e l'interesse trasmessi durante le sue lezioni e per il supporto e l'attenzione dedicati al mio lavoro.

Ringrazio anche la Dott.ssa Veronica Valli, il Dott. Mattia di Nunzio e la Dott.ssa Annalisa Taccari per l'aiuto, la disponibilità e i preziosi consigli dedicati a sostegno di questa tesi.

Porgo un ringraziamento anche all'azienda finanziatrice del progetto, Enza Zaden Italia S.r.l. che, tramite il suo contributo, mi ha permesso di realizzare questa esperienza e di lavorare su questo progetto.

Un pensiero va alla mia famiglia, mia madre e i miei nonni, che hanno reso possibile la realizzazione di questo percorso di studi, dimostrando sempre stima e ammirazione nei miei confronti. Li ringrazio infinitamente per la fiducia, l'appoggio e il sostegno che mi hanno regalato in questi anni.

Ringrazio Anna, Federica, Margherita, Martina e Margherita, compagne di vita, per essermi sempre state vicine col sorriso nel bene e nel male, rendendo questi anni migliori e per avermi sostenuta anche nella realizzazione di questo elaborato.

Un ringraziamento speciale va a Simone, dimostrazione tangibile di come ciò che ci rende più felici derivi dalla determinazione e dal perseguimento dei propri sogni. Lo ringrazio per scegliere ogni giorno di essere al mio fianco.

