



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE DI SPECIE SPONTANEE E COLTIVATE DI BRASSICA

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF WILD AND CULTIVATED SPECIES OF BRASSICA

TIPO TESI: sperimentale

Studente:
Ludovica Beltramba

Relatore:
PROF.SSA PATRICIA CARLONI

Correlatore:
PROF.SSA SILVIA ZITTI

ANNO ACCADEMICO 2018-2019

Alla mia famiglia.

SOMMARIO

SOMMARIO.....	3
ELENCO DELLE TABELLE	6
ELENCO DELLE FIGURE	7
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI	9
INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI	10
CAPITOLO 1 GENERE BRASSICA.....	12
1.1 <i>Brassica</i> : specie spontanee e coltivate	12
1.2 Specie spontanee del genere <i>Brassica</i> : <i>Brassica montana</i> Pourret.....	14
1.2.1 Morfologia	16
1.2.2 Habitat	17
1.3 Specie coltivate	18
1.3.1 <i>Brassica oleracea</i> subsp. <i>capitata</i>	18
1.3.2 <i>Brassica rapa</i> subsp. <i>sylvestris</i>	19
1.4 <i>Brassica</i> nelle tradizioni	20
1.4.1 Alimentazione	20
1.4.2 Fonti nutritive.....	21
1.4.3 Produzione di olio	21
1.5 <i>Brassica</i> come alimento funzionale.....	22
1.5.1 Nutraceutica e composti fitochimici.....	22
1.5.1 Effetti chemiopreventivi	22
1.5.2 Prevenzione malattie cardiovascolari	23
1.5.3 Ulteriori effetti protettivi	24
1.5.4 Attività antiossidante	24
CAPITOLO 2 RADICALI LIBERI E STRESS OSSIDATIVO	26
2.1 Radicali liberi.....	26
2.2 Le reazioni di ossidazione lipidica (LOX).....	26
2.3 Le reazioni di ossidazione delle proteine	27

2.4	Gli antiossidanti	28
2.4.1	Gli antiossidanti preventivi	28
2.4.2	Gli antiossidanti interruttori di catena	29
2.5	Gli antiossidanti nella <i>Brassica</i>	30
2.5.1	Vitamina C (acido ascorbico).....	30
2.5.2	Vitamina E (tocoferolo)	30
2.5.3	Vitamina A (retinolo)	31
2.5.4	Polifenoli.....	32
2.5.5	Glucosinolati e isotiocianati.....	37
CAPITOLO 3 METODI PER LA DETERMINAZIONE DEL POTERE ANTIOSSIDANTE		40
3.1	Metodi diretti	41
3.1.1	Test ORAC	41
3.2	Metodi indiretti	42
3.2.1	Test ABTS	42
3.3	Metodi per la valutazione del contenuto fenolico totale.....	43
3.3.1	Saggio TPC con reagente Folin- Ciocalteu.....	43
CAPITOLO 4 MATERIALI E METODI		44
4.1	Preparazione campioni	44
4.1.1	Essiccazione campioni.....	44
4.1.2	Estrazione campioni	45
4.2	Test ORAC	46
4.2.1	Materiali.....	46
4.2.2	Preparazione reagenti	47
4.2.3	Analisi.....	48
4.2.4	Elaborazione dati.....	49
4.3	Test ABTS	51
4.3.1	Materiali.....	51
4.3.2	Preparazione reagenti	51
4.3.3	Analisi.....	52
4.3.4	Elaborazione dati.....	53
4.3.5	Metodo Folin- Ciocalteu.....	55
4.3.6	Materiali.....	55
4.3.7	Preparazione reagenti	55
4.3.8	Analisi.....	56

4.3.9 Elaborazione dati.....	57
4.4 Statistica	58
CAPITOLO 5 RISULTATI	59
5.1 Risultati ORAC.....	59
5.2 Risultati ABTS.....	60
5.3 Risultati Folin- Ciocalteu.....	61
5.4 Correlazione tra test	61
CONCLUSIONI.....	62
BIBLIOGRAFIA	63

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1-1 Utilizzo di diverse specie di <i>Brassica</i> in diversi paesi.....	20
Tabella 2-1 Effetti di metodi di cottura su clorofille carotenoidi e acido ascorbico contenuti nel cavolo.....	32
Tabella 2-2 Glucosinolati nelle <i>Brassicaceae</i>	38
Tabella 4-1 Preparazione soluzioni diluite di Trolox per test ORAC.....	48
Tabella 4-2 Preparazione soluzioni diluite di Trolox per ABTS	52
Tabella 4-3 Preparazione soluzioni diluite di Acido Gallico per test Folin.....	56
Tabella 5-1 Coefficienti di correlazione di Pearson e significatività	61

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1-1 <i>Brassica oleracea</i>	12
Figura 1-2 Sezioni della <i>Brassica oleracea</i>	13
Figura 1-3 Distribuzione <i>Brassica oleracea</i> in Europa.....	15
Figura 1-4 Distribuzione <i>Brassica montana</i> Pourr. in Italia.....	15
Figura 1-5 Illustrazione <i>Brassica montana</i> Pourr.....	16
Figura 2-1 Fasi dell'ossidazione.....	27
Figura 2-2 Ossidazione dei prodotti derivanti dall'ossidazione proteica.....	28
Figura 2-3 Antiossidanti preventivi.....	29
Figura 2-4 Antiossidanti interruttori di catena.....	29
Figura 2-5 Acido ascorbico.....	30
Figura 2-6 Struttura tocoferolo.....	30
Figura 2-7 Struttura retinolo.....	31
Figura 2-8 Acidi fenolici in <i>Brassicaceae</i>	33
Figura 2-9 Biosintesi flavonoidi.....	34
Figura 2-10 Flavonoidi.....	34
Figura 2-11 Struttura lignani.....	35
Figura 2-12 Principali lignani di <i>Brassicaceae</i>	36
Figura 2-13 Principali flavanoidi nelle <i>Brassicaceae</i>	36
Figura 2-14 Struttura glucosinolato.....	37
Figura 2-15 Prodotti derivati dell'idrolisi dei Glucosinolati.....	39
Figura 4-1 Lavaggio campioni.....	45
Figura 4-2 Macinazione campioni.....	46
Figura 4-3 Vortex e centrifuga campione.....	46
Figura 4-4 Piastra con test ORAC.....	49
Figura 4-5 Retta di taratura test ORAC.....	50
Figura 4-6 Piastra con test ABTS.....	53
Figura 4-7 Retta taratura test ABTS.....	54
Figura 4-8 Piastra con test Folin-Ciocalteu.....	56

Figura 4-9 Retta taratura test Folin-Ciocalteu.	57
Figura 5-1 Risultati test ORAC.	59
Figura 5-2 Risultati test ABTS.	60
Figura 5-3 Risultati test Folin-Ciocalteu	61

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

ITC	Isotiocianati
ROS	Specie reattive dell'ossigeno
GLS	Glucosinolati
AOA	Attività antiossidante
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-acido solfonico) sale di diammonio
TX	Trolox
TPC	Contenuto fenolico totale
AAPH	2,2'-azobis(2-amindinopropano) dicloridrato
GA	Acido Gallico

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi anni, si è assistito ad un crescente interesse da parte dei consumatori nei confronti dell'impatto che può avere una dieta equilibrata sulla salute; numerose sono le ricerche scientifiche a sostegno dell'ipotesi che alcuni alimenti, o componenti alimentari, abbiano effetti benefici su di essa.

Un'alimentazione equilibrata e ricca di frutta e verdura viene associata ad una possibile riduzione di numerose condizioni patologiche come tumori, malattie cardiovascolari e neurologiche. Uno dei fattori utili a prevenire queste patologie è determinato dall'attività antiossidante esplicata dai componenti fenolici, che rappresentano dei preziosi alleati per la nostra salute; buona parte di essi viene introdotta con gli alimenti soprattutto di origine vegetale.

Nella comune dieta negli ultimi anni spesso si è riscoperto il valore di affiancare alle verdure coltivate specie spontanee o selvatiche. Questo sia perché queste ultime hanno in genere un gusto più accentuato, sia in quanto noto dalla tradizione come alcune di esse venissero in passato utilizzate a scopo medicinale.

Le piante spontanee o selvatiche differiscono dagli ortaggi coltivati per quanto riguarda la composizione chimica e il valore nutrizionale (Leonti 2006). Durante la selezione delle piante coltivate che viene fatta per avere più alte rese di coltivazione, si tiene conto anche delle caratteristiche gustative e si scelgono specie con un gusto più gradevole e "più dolce", e contenenti meno fibre (Leonti 2006). In questo modo spesso vengono persi composti fitochimici salutari: le verdure selvatiche sono infatti più fibrose e contengono concentrazioni più elevate e a maggiore diversità di composti secondari.

Questi composti secondari sono sostanze chimiche con una vasta gamma di potenziali fisiologici e interazioni farmacologiche tra cui proprietà tossiche, antimicrobiche, antinfiammatorie, antiossidanti, anti-arteriosclerotiche, astringenti, ipoglicemizzanti, diuretiche, lassative, afrodisiache ed altro ancora.

Le piante selvatiche possono quindi non solo essere una fonte di cibo di emergenza in tempi di carestia (come fonte di carboidrati aggiuntivi, proteine, vitamine, PUFA e minerali), ma

compensano anche la mancanza di sostanze farmacologicamente attive, che le specie coltivate hanno perso durante l'addomesticamento.

Le persone che tradizionalmente raccolgono verdure selvatiche conoscono le loro proprietà benefiche per la salute. Pertanto, loro possono deliberatamente scegliere tra le specie coltivate e quelle non coltivate a loro disposizione e cercare il desiderato effetto farmacologico consumando piatti tradizionali tra cui le piante selvatiche raccolte.

Date queste premesse, in questo lavoro, sono state studiate alcune specie di vegetali appartenenti alla famiglia delle *Brassicaceae* valutando in particolar modo la loro attività antiossidante con lo scopo di confrontare la quantità di componenti bioattivi tra specie spontanee e specie coltivate.

Le specie prese in esame sono state tre di cui due coltivate e una spontanea:

Brassica oleracea subsp. *capitata* (cavolo cappuccio) e *Brassica rapa* subsp. *sylvestris* var. *esculenta* (cima di rapa) entrambe specie coltivate e *Brassica montana* Pourret la quale è invece una specie spontanea.

La prima parte della tesi presenta la raccolta di informazioni bibliografiche sul genere *Brassica* relative alle fonti nutritive e proprietà nutraceutiche, fornendo inoltre informazioni sull'habitat e sulla morfologia delle specie prese in studio.

Nella seconda parte, mediante l'utilizzo di tre metodi spettrofotometrici ORAC, ABTS e Folin–Ciocalteu, è stato valutato il potere antiossidante delle piante, per verificare se vi siano delle differenze tra le specie coltivate e quella selvatica.

Capitolo 1

GENERE BRASSICA



Figura 1-1 *Brassica oleracea*.

1.1 *Brassica*: specie spontanee e coltivate

Il genere *Brassica* (fig.1-1) comprende piante erbacee appartenenti alla famiglia delle *Brassicaceae* (o *Cruciferae*), distribuite in tutti i continenti. Il nome della famiglia *Brassicaceae* è stato proposto dal botanico italiano Teodoro Caruel traendolo dalla parola celtica “cavolo”.

La famiglia delle *Brassicaceae* comprende 321 generi e 3660 specie; le specie della famiglia sono caratterizzate da (fig.1-2) (Al-Shehbaz 2012):

- foglie di solito alterne solo in alcuni casi opposte, spesso in rosetta basale, con lamina spesso incisa o pinnata e prive di stipole;

- fiore composto da 4 petali separati (corolla dialipetala) disposti a croce e 4 sepali; gli stami sono 6, di cui 4 lunghi e 2 corti; l'ovario è supero e bicarpellare, mentre l'impollinazione è entomogama.
- frutto è secco e deiscente ed è chiamato siliqua; esso si apre in due valve che lasciano scoperto un setto centrale detto "replum", a cui sono attaccati i semi in numero variabile.

Secondo l'enciclopedia Flora Europaea (Heywood,2012) il genere *Brassica* è descritto come: *erbe o piccoli arbusti con foglie pennate e sepali eretti. L'interno è più largo rispetto l'esterno. Petali gialli o bianchi, artigliati. I nettari laterali sono di forma prismatica e di un verde intenso. Ovario o a volte con un breve giroforo. Il frutto è di forma siliqua con becco lungo o corto; valve convesse, con una vena mediana prominente. I semi sono disposti in 1-2 file in ciascun loculo, ed hanno forma globosa o raramente ovoidale.*



Figura 1-2 Sezioni della *Brassica oleracea*.

Il genere *Brassica* comprende numerose specie spontanee, di cui 29 entità presenti sul territorio italiano (<http://dryades.units.it/floritaly>). Le numerose cultivar coltivate, chiamati genericamente “cavoli” (cavolo, cavolo-rapa, cavolfiore, broccoli, cime di rapa, ecc), derivano da un gruppo di specie spontanee tra cui *Brassica macrocarpa*, *Brassica oleracea* e *Brassica cretica* (quest’ultima non presente in Italia). (fig.1-3).

La coltivazione dei “cavoli” si è sviluppata indipendentemente in diverse parti del Mediterraneo, nel periodo classico; i Greci non usavano il cavolo come alimento, i Romani solo il cavolo nero (Pignatti 1982). Un centro importante come origine per la coltura è la

Gallia, il nome *Brassica* ha infatti origini celtiche. La coltura è consistita nel fissare alcuni caratteri interpretabili come malformazioni ereditabili, come ingrossamento del fusto, foglie aricciate o bollose o riunite in teste sferiche, infiorescenze abbreviate con fiori rudimentali, riduzione del ciclo vitale a piante bienni o annuali.

Le forme coltivate che ne derivano sono molteplici e spesso di valore puramente locale. Le forme coltivate, distinte in numerose cultivar, hanno subito un'evoluzione accelerata, grazie all'azione dell'uomo e spesso risulta difficile o impossibile risalire alle specie spontanee da cui sono derivate.

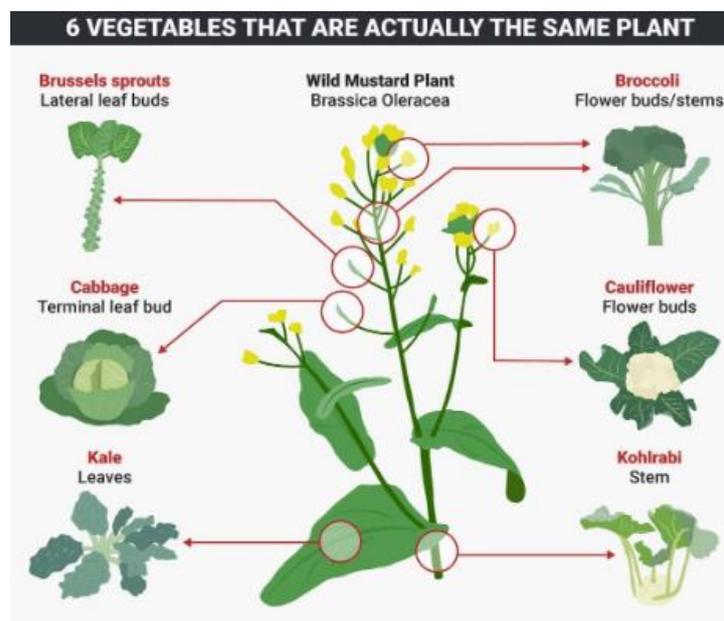


Figura 1-3 Illustrazione di diverse cultivar appartenenti tutte al genere *Brassica oleracea*

1.2 Specie spontanee del genere *Brassica*: *Brassica montana* Pourret

Come riportato dal Portale della Flora d'Italia (<http://dryades.units.it/flor.italy>) sono riconosciute per l'Italia 29 entità appartenenti al genere *Brassica*; nell'ambito di questo lavoro di tesi ci siamo occupati della *Brassica montana* Pourret, precedentemente nota come *Brassica oleracea* subsp. *robertiana* (i due termini sono posti in sinonimia). Questa è distribuita lungo le coste settentrionali del Mediterraneo dalla Spagna nord-orientale fino a nord-ovest Italia. (fig. 1-3) Nella nostra penisola ha un areale frammentato di carattere relittuale e risulta presente, con distribuzione localizzata, principalmente nel versante tirrenico, in Liguria (tra Loano e Savona), Toscana (Alpi Apuane), Lazio, Campania, Basilicata e Calabria;

nel versante adriatico è presente unicamente nelle Marche (Monte Conero) e, secondo documentazioni storiche in Emilia Romagna, dove, però, non è più stata ritrovata in tempi recenti (Conti 2005) (fig.1-4). La presenza sulle rupi del Monte Conero ed in altre località del comune di Ancona, come il Passetto ed il Parco del Cardeto, ha, quindi, un elevato valore dal punto di vista floristico, essendo queste le uniche stazioni della specie nel versante adriatico della nostra penisola.

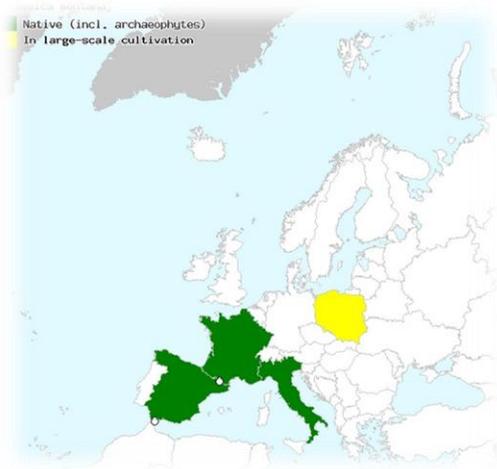


Figura 1-3 Distribuzione *Brassica oleracea* in Europa.



Figura 1-4 Distribuzione *Brassica montana* Pourr in Italia.

1.2.1 Morfologia

B. montana Pourret è una pianta vistosa, strettamente imparentata con il comune cavolo (*Brassica oleracea* L.), coltivato da millenni nei nostri orti, ma che se ne distingue per una serie di caratteri ben fissati e per la particolare ecologia.

A differenza della maggioranza della specie coltivata, la *Brassica montana* Pourret è una specie perenne con portamento caespitico e suffruticoso, la parte inferiore del fusto è lignificata o completamente legnosa, con una corteccia grigia, fessurata, che spesso presenta cicatrici anulari delle foglie cadute; la parte mediana del fusto è erbacea, cava e un po' succulenta, il fusto è in genere elevato (di altezza compresa tra i 30 ed i 140 cm), le foglie basali sono lirato-pennatosette e crenate, di colore verde, un po' glauche nella pagina inferiore, lisce e coriacee, in genere sono molto grandi (anche 30 cm di lunghezza), le foglie cauline hanno lamina lanceolata con margine intero, le loro basi sono semiamplessicauli.

I fiori sono portati da racemi terminali. Il fiore è quello tipico delle *Brassicaceae*, ermafrodito, tetramero ed attinomorfo, ed i suoi petali sono grandi (15-22 mm) di colore giallo carico.

Il frutto è una siliqua lunga tra i 4 ed i 7 cm e larga 1-2 mm, terminante in un becco di 10/13 mm. (fig.1-5)



Figura 1-5 Illustrazione *Brassica montana* Pourr.

1.2.2 Habitat

Questa specie cresce preferibilmente nelle fessure di rocce, di solito la si trova su scogliere lungo la costa; sia a livello del mare che in alta quota.

La dimensione della popolazione può variare da pochi individui fino a dimensioni molto grandi; in genere si sviluppa su aree contenute ed isolate. (Draper Munt 2011)

Questa specie spontanea rimane allo stato vegetativo per diversi anni e richiede vernalizzazione.

I campioni presi in studio per questo progetto sono stati raccolti nell'area del Monte Conero e del belvedere del Passetto in provincia di Ancona. (fig.1-6).

Queste zone sono situate sulla costa del mare Adriatico, nelle Marche. Il promontorio si estende sui seguenti comuni: Ancona, Sirolo, Camerano, Numana. Presenta una vasta ricchezza floristica, grazie alla grande diversità dell'habitat. E' considerato il punto di transizione tra il clima temperato e quello mediterraneo.

Per quanto riguarda la presenza di *Brassica montana* in queste aree si è osservato che colonizza la costa a partire dal Monte dei Corvi verso sud fino alla spiaggia dei Sassi Neri. (Biondi 2012)



Figure 1-6 Specie *Brassica montana*, il Passetto (AN).

1.3 Specie coltivate



Le numerose specie di cavoli coltivati derivano da diverse specie spontanee del genere *Brassica*, tra cui la più nota è la *Brassica oleracea*. Questa specie viene descritta per la prima volta in *Specie Plantarum* (Linneo, 1753), che assegnò anche dieci nomi varietali alle diverse forme coltivate di *Brassica oleracea*, compresi i cavoli, cavolfiori, varie foglie di cavolo e cavolo rapa.

Successivamente a Linneo molti scienziati, tra cui Gladis e Hammer (2001,2003) effettuarono diversi tentativi di sistematizzazione riguardanti la grande varietà di forme di *B. oleracea*, generando confusione nella nomenclatura.

Uno dei trattamenti di sistematizzazione effettuato da questi ultimi fu, il raggruppamento, di specie sia coltivate che selvatiche aventi lo stesso C-genoma, sotto la specie *B. oleracea*. Questo raggruppamento secondo genoma permette la conoscenza della relazione tra una coltura e la sua parentela e, di conseguenza consente una migliore comprensione della sua origine ed evoluzione.

1.3.1 *Brassica oleracea* subsp. *capitata*



Figura 1-7 *Brassica oleracea* subsp. *capitata*

Brassica oleracea subsp. *capitata* (fig.1-7) nota anche come “cavolo cappuccio” è una specie erbacea biennale appartenente alla famiglia *Brassicaceae*.

Il cavolo cappuccio è una pianta che, se lasciata sviluppare, cresce fino a 1,5 metri di altezza, formando degli abbondanti ramificazioni con rametti fioriferi. Le foglie esterne sono lisce, concave e serrate, che racchiudono le foglie più giovani in modo da formare una palla compatta detta testa o cappuccio. I fiori sono di colore giallo, che dopo la fecondazione, danno luogo alla formazione di una siliqua portante numerosi semi rotondi, di colore nero bluastrò.

Il cavolo cappuccio è una varietà di cavolo che si adatta bene a tutti i tipi di terreno, purchè questi siano profondi, ben aerati e freschi, ben dotati di sostanza organica e con un pH intorno alla neutralità.

1.3.2 *Brassica rapa subsp. sylvestris*



Figura 1-8 *Brassica rapa subsp. sylvestris*

Nome comune “cima di rapa” appartiene alla famiglia delle *Brassicaceae*, conosciuta anche come broccoletto di rapa. (fig.1-8) Questa specie è legata fortemente ad usanze alimentari dell’Italia centro meridionale (Lazio, Puglia, Campania) ove in quest’ultime viene soprattutto coltivata. La parte tenera del fusto insieme alle foglie vengono utilizzate come verdura cotta. In alcune regioni questa specie viene impiegata anche per l'alimentazione del bestiame. La *B. rapa subsp. sylvestris* è una specie coltivata ed inselvatichita (Pignatti, 1982).

1.3.2.1 Morfologia

Il fusto è molto corto e su di esso è inserita una rosetta di foglie. La pianta può raggiungere fino ai 40 cm nelle varietà precoci ed il metro nelle tardive.

I fiori presentano il tipico colore giallo, riuniti in infiorescenze corimbo.

L’impollinazione è allogama (ad opera del polline prodotto sia da fiori della stessa pianta sia da fiori di altri individui appartenenti alla stessa specie), tuttavia può avvenire anche per autogamia.

1.4 *Brassica* nelle tradizioni

1.4.1 Alimentazione

Negli ultimi 25 anni la raccolta ed il consumo di piante non coltivate è aumentato ed è stato oggetto di diversi studi. (Hadjichambis 2008) Tutti questi studi hanno dimostrato chiaramente che queste piante stanno assumendo sempre più rilevanza nella nostra dieta mediterranea. In particolar modo nell'Europa centrale la raccolta di specie spontanee sta acquistando una rilevante crescita.

Il cibo è il riflesso della persona, ed è uno degli indicatori che ci permette di distinguere le varie culture, etnie. Tuttavia la globalizzazione ha comportato una crescente disponibilità di alimenti simili in culture differenti. Alcune specie di *Brassica* si sono infatti diffuse nella cultura culinaria di diversi paesi, quali: Cipro, Grecia, Spagna ed Italia con utilizzi differenti; nella tabella seguente (tab. 1-1) sono riassunti i vari utilizzi di alcune specie di Brassicacee spontanee nei paesi citati precedentemente.

Tabella 1-1 Utilizzo di diverse specie di *Brassica* in diversi paesi.

Nome comune	Pianta alimentare	Cipro	Grecia	Spagna	Italia
Senape bianca	<i>Sinapis alba</i> L.	cruda o bollita			
Senape selvatica	<i>Sinapis arvensis</i> L.	cruda o bollita			Bollita
Ravanello selvatico	<i>Raphanus raphanistrum</i> L.		Bollito		Bollito
Crescione d'acqua	<i>Nasturtium officinale</i>	Crudo		Crudo	Crudo o bollito
Rucola sativa	<i>Eruca sativa</i>	Crudo	Crudo	Fritto	
Borsapastore comune	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	Cruda			In zuppe

Senape nera	<i>Brassica nigra</i>	Semi usati come profumo, preparazione mostarda e sottaceti			Foglie bollite o usato come colorante per impasti
-------------	-----------------------	--	--	--	---

Le specie spontanee di *Brassica*, come molte altre specie appartenenti ad altre famiglie, sono tradizionalmente utilizzate come alimento nella nostra cultura, soprattutto delle popolazioni contadine. Queste specie si sviluppano, come commensali dei campi coltivati (infestanti), ma soprattutto nelle aree di margine, al limite dei campi coltivati, delle stradine di campagna, dei fossi e dei piccoli nuclei forestali. La loro presenza nell'ambiente è, comunque, legata alla presenza antropica, che modificando il paesaggio tende a ridurre gli spazi in cui queste specie possono proliferare. Anche per quel che riguarda le *Brassicaceae* coltivate, l'utilizzo nella dieta risale a tempi antichissimi (Leonti 2006), la loro evoluzione è andata di pari passo alle coltivazioni delle altre colture.

La raccolta delle erbe spontanee fu di notevole importanza durante le carestie del dopo-guerra, in particolar modo durante la seconda guerra mondiale (Leonti 2006) per far fronte alle carenze alimentari causate da povertà finanziarie; attualmente si sta riscoprendo un rinnovato interesse verso le piante selvatiche che con le loro proprietà possono rappresentare una importante integrazione alla dieta umana.

1.4.2 Fonti nutritive

Le *Brassicaceae* forniscono nutrienti preziosi, vitamine, acidi grassi omega-3, fitochimici, antiossidanti e fibre. (Leonti 2006).

Il loro utilizzo è parallelo ad una crescita costante di nuovi stimoli alimentari per la popolazione, sempre più spinte verso esperienze culinarie più salutari.

1.4.3 Produzione di olio

La famiglia di piante *Brassicaceae* (o *Crucifereae*) include alcune delle specie più importanti al mondo dal punto di vista culturale ed economico. In particolare i generi di *Brassica* L. (cole, senape, colza, rape ecc.), *Raphanus* L.(ravanello), *A Armoracia* (rafano), *Lepidium* Fabr. (crescione), *Eutrema* R. Br. (wasabi), *Eruca* Mill (rucola). Queste specie offrono una grande

varietà di ortaggi a foglia, radici e semi oleosi utilizzate per condimenti. Le colture di semi oleosi di Brassicacee forniscono il 14% dell'olio vegetale commestibile del mondo che rappresenta la terza fonte più importante dopo soia e palma. (OECD, 2012)

1.5 Brassica come alimento funzionale

1.5.1 Nutraceutica e composti fitochimici

Gli alimenti nutraceutici, comunemente definiti funzionali, sono alimenti o parti di essi, dotati, indipendentemente dal loro valore nutrizionale, di proprietà benefiche sulla salute, in grado di migliorare una specifica funzione fisiologica o di ridurre il rischio di malattia. In realtà, il termine "nutraceutico" si riferirebbe al singolo composto con proprietà benefiche, mentre il termine "alimento funzionale" alluderebbe piuttosto agli effetti dell'intero alimento. I nutraceutici possono essere rappresentati da un alimento intero contenente molecole dotate di attività biologica, da alimenti arricchiti di molecole "salutari", oppure essere assunti sotto forma di integratori alimentari in diverse formulazioni. Negli ultimi anni molta attenzione è stata dedicata soprattutto ai composti fitochimici che sono sostanze, non nutrienti, che si trovano nella matrice degli alimenti di origine vegetale, come frutta e verdura, dotati di attività biologica. Sono sostanze organiche generalmente a basso peso molecolare che sono responsabili del colore e delle caratteristiche organolettiche del vegetale, hanno azione protettiva sulla salute umana, dovuta per esempio all'attività antiossidante, o alla capacità di influenzare il metabolismo, il sistema immunitario ed il sistema ormonale.

1.5.1 Effetti chemiopreventivi

I prodotti di origine vegetale contengono una vasta gamma di sostanze fitochimiche, inclusi gli antiossidanti, presenti in elevate concentrazioni che si ritiene abbiano un ruolo protettivo nei confronti del rischio di malattie ossidative legate allo stress come il cancro e le malattie cardiovascolari. Pertanto, una dieta ricca di frutta e verdura e di composti bioattivi (ovvero sostanze in grado di influenzare positivamente la salute, contribuendo alla prevenzione di differenti malattie) tra cui antiossidanti naturali, carotenoidi, polifenoli e glucosinolati è stata associata ad un ridotto rischio di malattie cardiache e cancro.

Gli agenti chemiopreventivi vengono suddivisi in base al loro meccanismo di azione in inibitori della formazione del cancro; agenti bloccanti; agenti soppressori. Tra gli agenti bloccanti, i modulatori degli enzimi del metabolismo degli xenobiotici e antiossidanti, sono considerati inibitori della fase di iniziazione. In questo contesto, diversi composti di origine

vegetale hanno mostrato interessanti attività antitumorali. Tra i più efficaci vanno ricordati gli effetti antitumorali, e in generale salutari, degli isotiocianati ITC derivati dalle *Brassicaceae*, riportati in numerosi studi.

La presenza di sulforafano (fig.1-10) (composto del gruppo degli isotiocianati appartenente alla famiglia dei composti solforati), nella famiglia delle crucifere, ha rivelato la sua efficacia contro le cellule tumorali ed è stato anche dimostrato che questo il composto è in grado di prevenire e inibire il tumore gastrico. (Avato 2015).

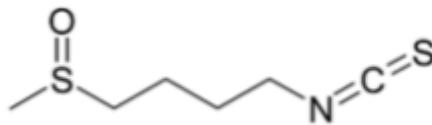


Figura 1-10 Sulforafano.

Inoltre, anche gli agenti antiossidanti, in grado di reagire direttamente con le forme attive dei cancerogeni e i radicali liberi, come le specie reattive dell'ossigeno (ROS) capaci di effetti mutageni e cancerogeni, esercitano attività fondamentali dal punto di vista chemio-preventivo. Molti composti fitochimici, assunti con la dieta tramite alimenti vegetali, sono validi *scavenger* di molecole potenzialmente dannose, ed inoltre sono in grado di aumentare le difese antiossidanti e detossificanti tramite l'induzione enzimatica degli enzimi deputati a queste funzioni cellulari. (Anwar 2012) Nel capitolo successivo, le difese antiossidanti e il ruolo dello stress ossidativo nella patogenesi di alcune malattie, verrà trattato in modo più approfondito.

1.5.2 Prevenzione malattie cardiovascolari

Le malattie cardiovascolari rappresentano attualmente la prima causa di morte al mondo. L'ipertensione, una dieta ricca di lipidi, il fumo e l'obesità, rappresentano i fattori di rischio principalmente identificati. Poiché lo stress ossidativo è associato con tutti questi fattori, ed è inoltre coinvolto nel processo di formazione di placche aterosclerotiche, la prevenzione dei disordini cardiovascolari potrebbe essere potenzialmente raggiunta contrastando la formazione di ROS. La presenza di antiossidanti nei composti naturali è spesso il loro valore aggiunto nella protezione del corpo contro le malattie cardiache (Anwar 2012).

Nei tessuti delle *Brassicaceae* possiamo riscontrare l'elevata presenza di composti fitochimici che hanno mostrato queste proprietà preventive come i glucosinolati ed anche i loro prodotti di decomposizione come i fenolici (principalmente i flavonoidi). Si è osservato a seguito di diversi studi che questi composti mostrano effetti benefici in relazione con l'apparato cardiovascolare. (Avato 2015).

Le verdure crocifere sono note per le loro proprietà antiossidanti e gli effetti anti-cancerogeni. In ratti alimentati con germogli di broccoli è stata per esempio osservata una diminuzione dello stress ossidativo del tessuto cardiovascolare e una diminuzione della pressione arteriosa. (Akhlaghi 2010).

Se da una parte, una dieta sbilanciata, soprattutto ricca di grassi, sembra avere un ruolo deleterio nell'influenzare negativamente tutti i fattori coinvolti nella patogenesi delle malattie cardiovascolari, dall'altra un'alimentazione controllata e bilanciata, rappresenta una delle strategie più efficaci per contrastare la loro insorgenza. Ad esempio in uno studio, l'assunzione di un estratto di germogli di broccoli ricco di glucosinolati, si è dimostrato efficace nel ridurre i livelli di colesterolo. (Avato 2015).

1.5.3 *Ulteriori effetti protettivi*

Differenti studi hanno evidenziato inoltre le capacità preventiva degli ITC nei confronti di altre condizioni come il diabete, le malattie osteo-articolari, le malattie neurologiche, l'asma e il diabete e molte altre patologie con una forte componente di stress ossidativo (Avato 2015).

Inoltre, si è osservato a seguito di diversi studi che le *Brassicaceae* svolgono attività antimicrobica, in particolare la *Brassica campestris* si è visto che ha azione inibitoria su *Micrococcus luteus* e *Salmonella thiphy*; il primo è un batterio Gram + di forma sferica, appartenente alla famiglia delle Micrococcaceae. il quale può indurre allo sviluppo di polmonite batterica; *S.thiphy* invece è un Gram -, di forma bastoncellare, il quale a contatto con l'organismo umano provoca febbre tifoide. (Khan 2017)

1.5.4 *Attività antiossidante*

I normali processi metabolici o l'esposizione a raggi ionizzanti o xenobiotici inducono alla produzione di radicali liberi, i quali hanno un effetto tossico sul metabolismo; la loro gravità dipende dal tipo di macromolecole con cui interagiscono. Esistono, infatti, strutture più "sensibili" rispetto ad altre, come per esempio la frazione lipidica delle membrane, le proteine e gli acidi nucleici. L'esposizione alle specie radicaliche può indurre nei fosfolipidi delle membrane biologiche, un processo di perossidazione lipidica. Si tratta di una serie di reazioni a cascata che portano alla completa distruzione della membrana cellulare. Queste alterazioni, a carico dei lipidi, si traducono in una riduzione della fluidità di membrana e di un aumento della permeabilità, e quindi della funzionalità dell'intera cellula. A seguito di un danno alla membrana cellulare, possono infatti derivare una serie di eventi avversi quali, un'alterazione della funzione delle proteine di membrana e delle funzioni mitocondriali, che di conseguenza vanno a danneggiare tutto il metabolismo energetico. Inoltre, durante la perossidazione

lipidica si formano perossi-radicali reattivi in grado di raggiungere il flusso sanguigno e, quindi di iniziare un nuovo processo in altre sedi dell'organismo.

La misura dell'attività antiossidante del genere *Brassica* è diventata ormai oggetto di studio; è emerso che questa attività è correlata a diversi composti presenti nella pianta come ad esempio flavanoli. Le verdure di *Brassica* (broccoli, cavolfiore, cavolo, cavoletti di Bruxelles) sono state identificate come un'ottima fonte di antiossidanti, non solo per gli alti livelli presenti ma anche perché sono verdure che vengono regolarmente incluse nella dieta, consumata in quantità relativamente grandi e sono disponibili in tutto il mondo. Molta ricerca si è concentrata sull'attività antiossidante delle verdure di *Brassica*, in particolare broccoli e cavolfiori. (Anwar 2012)

Capitolo 2

RADICALI LIBERI E STRESS OSSIDATIVO

2.1 Radicali liberi

I radicali liberi sono specie chimiche contenenti un elettrone spaiato nell'orbitale più esterno. Sono altamente instabili e reattivi, e tendono a reagire con altre molecole per accoppiare il loro elettrone spaiato al fine di raggiungere una maggior stabilità, innescando così un meccanismo radicalico a catena. I radicali liberi possono essere generati dalla normale attività metabolica cellulare, e a concentrazione fisiologica, svolgono importantissime funzioni a livello cellulare e sistemico. Esiste una grande varietà di specie radicaliche, le quali vengono classificate in base all'atomo su cui è centrato il radicale (ad esempio sull'ossigeno, sullo zolfo, sul carbonio, sull'azoto), o alla localizzazione dell'elettrone.

I radicali si formano in seguito ad accettazione o perdita di un elettrone, o in seguito alla scissione omolitica di un legame covalente: i due elettroni si separano simmetricamente formando due intermedi reattivi ciascuno dei quali possiede un elettrone spaiato.

Nel nostro organismo vengono prodotti durante i processi che trasformano il cibo che ingeriamo in energia, ma la loro concentrazione è influenzata anche da fattori esogeni come l'inquinamento, il fumo, l'alcol, l'eccessiva esposizione solare ed una cattiva alimentazione.

2.2 Le reazioni di ossidazione lipidica (LOX)

L'ossidazione è una reazione radicalica a catena e costituisce un processo complesso e irreversibile che si verifica in tutte le matrici alimentari. Le reazioni di ossidazione di una matrice possono essere suddivise in tre fasi distinte in funzione della velocità di reazione e delle specie coinvolte: iniziazione, propagazione e terminazione (fig.2-1)

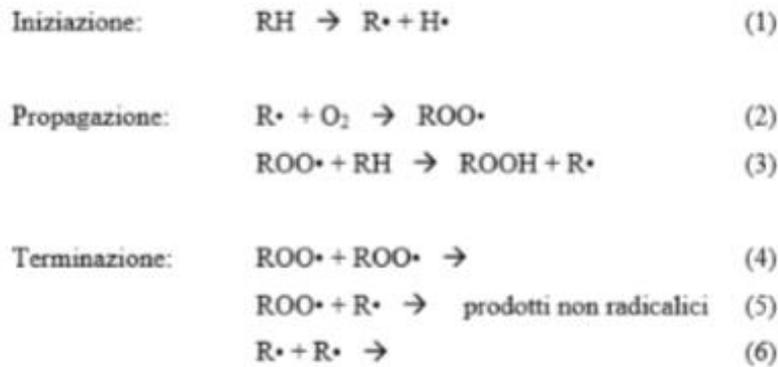


Figura 2-1 Fasi dell'ossidazione.

Durante la fase iniziale, nota come fase di iniziazione, si forma un radicale $R\cdot$ (Reazione 1) ma non vi è in letteratura una spiegazione univoca riguardo al meccanismo con il quale questo avviene. Si può avere la rottura omolitica di un legame covalente debole per via termica o fotochimica, l'estrazione di un atomo di idrogeno da un iniziatore radicalico e l'ossidazione o la riduzione per mezzo di un catalizzatore metallico. Una volta formatosi, il radicale $R\cdot$ reagisce rapidamente con l'ossigeno (che possiede due elettroni spaiati ed è quindi un diradicale in stato di tripletto), per formare il radicale perossido $ROO\cdot$ (Reazione 2) che a sua volta può strappare un atomo di idrogeno da un trigliceride o da un acido grasso libero producendo una molecola di idroperossido $ROOH$ e un nuovo radicale libero $R\cdot$ che immediatamente può rilanciare il processo di propagazione (Reazione 3); tale passaggio è quello che determina la velocità del processo di ossidazione. Le reazioni terminano quando due specie radicaliche reagiscono tra loro per formare specie stabili (Reazioni 4, 5 e 6). Il processo di terminazione può avvenire anche quando le specie radicaliche reagiscono con sostanze antiossidanti eventualmente presenti, come tocoferoli, selenio e polifenoli. Nella prima fase l'ossidazione del lipide avviene lentamente ed uniformemente secondo questo schema, ma segue poi una fase secondaria nella quale si ha la formazione di residui carbonilici e un gran numero di aldeidi, responsabili della formazione di off-flavours nel prodotto.

2.3 Le reazioni di ossidazione delle proteine

L'ossidazione proteica procede attraverso una reazione a catena radicalica libera simile a quella appena descritta. Nelle proteine, durante la seconda fase, come mostrato nella figura 2-2, l'ossidazione quindi provoca il cross-linking proteico e la formazione di vari prodotti di

ossidazione derivanti da diverse reazioni quali l'idrossilazione aromatica, l'ossidazione tiolica e la formazione di gruppi carbonilici nelle catene laterali amminoacidiche. (fig.2-2)

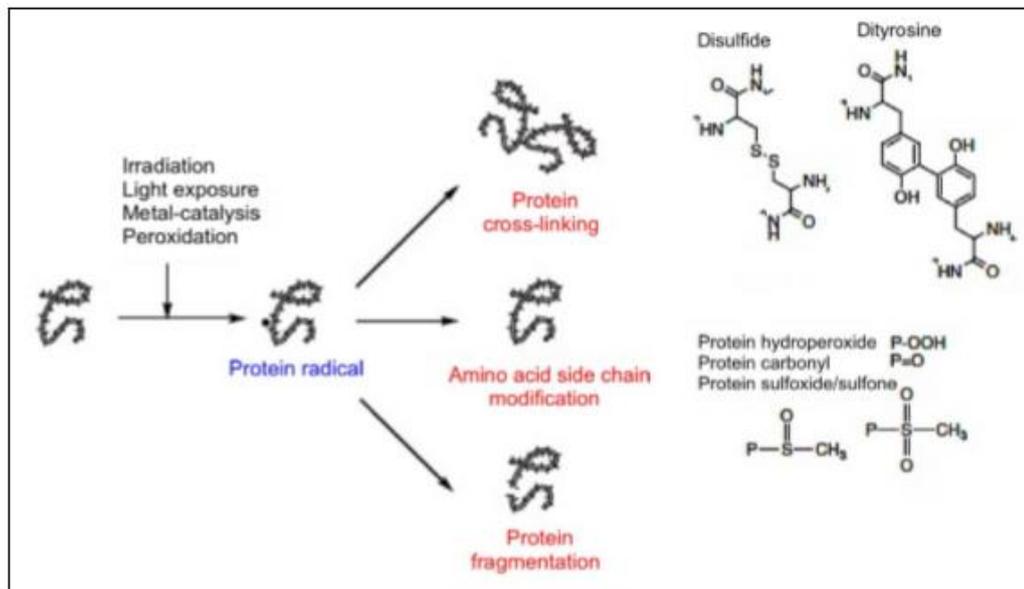


Figura 2-2 Ossidazione dei prodotti derivanti dall'ossidazione proteica.

2.4 Gli antiossidanti

L'organismo ha sviluppato numerosi meccanismi per proteggersi dagli effetti dannosi dei radicali liberi come alcuni enzimi in grado di decomporre e sequestrare gli agenti ossidanti. Tra questi antiossidanti endogeni ricordiamo la superossidodismutasi, la catalasi e l'antiossidante più efficace, il glutathione, che ha la capacità di incorporare il selenio, un antiossidante esogeno che sembra diminuire il rischio di cancro.

Alcune sostanze presenti negli alimenti ed in alcuni integratori alimentari sono inoltre in grado di intervenire favorevolmente nei processi di detossificazione, attivando sistemi biologici di riparo. Essi vengono classificati quindi come antiossidanti.

2.4.1 Gli antiossidanti preventivi

Gli antiossidanti in grado di proteggere dall'attacco dei radicali liberi vengono detti preventivi; la loro azione può essere riassunta come quanto segue (fig.2-3):

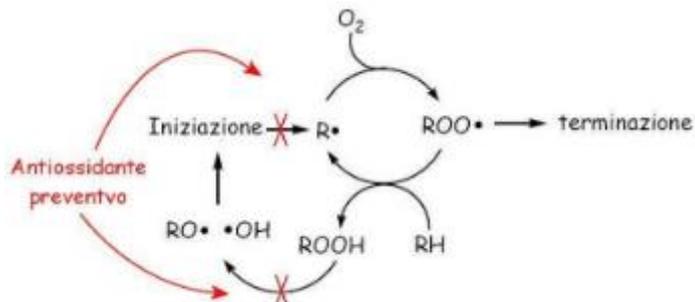


Figura 2-3 Antiossidanti preventivi.

Essi possono interagire con i composti che provocano la formazione dei radicali che innescano la reazione a catena o prevengono la degradazione degli idroperossidi evitando la formazione di nuove specie radicaliche reattive.

I principali antiossidanti preventivi sono

- EDTA e polifenoli con azione chelante nei confronti di metalli di transizione
- solfuri, enzimi (catalasi, superossido-dismutasi, perossidasi) che hanno la capacità di degradare i ROS e gli idroperossidi.

2.4.2 Gli antiossidanti interruttori di catena

Alcuni antiossidanti hanno la capacità di inibire la reazione di autoossidazione propagata dai radicali perossili, e vengono detti appunto *antiossidanti interruttori*. (fig.2-4)

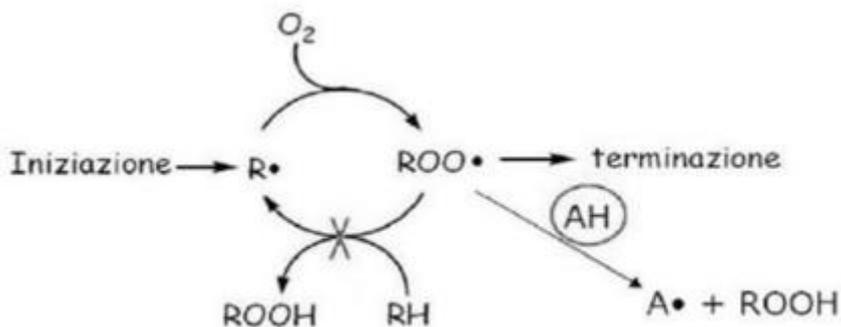


Figura 2-4 Antiossidanti interruttori di catena.

Questi antiossidanti possono donare un atomo di idrogeno ai radicali perossilici trasformandosi a loro volta in radicale; quest'ultimo però ha la capacità di riuscire a non innescare nuove reazioni radicaliche.

2.5 Gli antiossidanti nella *Brassica*

Nelle *Brassicaceae* è stata trovata una notevole varietà e quantità di sostanze che possono esplicare azione antiossidante.

2.5.1 Vitamina C (acido ascorbico)

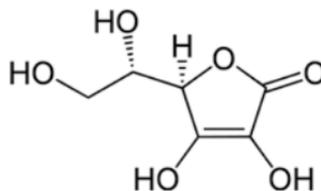


Figura 2-5 Acido ascorbico.

L'acido ascorbico, definito come vitamina C (fig.2-5), appartiene al gruppo delle vitamine cosiddette idrosolubili, quelle cioè che non possono essere accumulate nell'organismo, ma devono essere regolarmente assunte attraverso l'alimentazione.

La sua azione è volta a limitare o curare lo scorbuto, malattia molto antica e che per molti secoli ha causato la morte di molti equipaggi di navi. Oltre a sciogliersi nell'acqua, la vitamina C è sensibile alle alte temperature, per cui si perde del tutto in caso di cottura in acqua.

Recenti studi sulla specie *Brassica oleracea* var. *acephala* hanno dimostrato che la cottura a vapore è la migliore perché va a degradare al minimo questo composto. (Akdaş Zelal Zuhail 2016)

2.5.2 Vitamina E (tocoferolo)

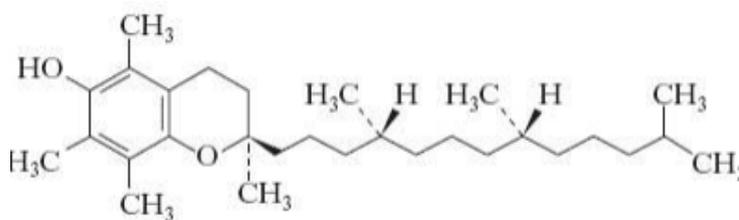


Figura 2-6 Struttura tocoferolo.

La vitamina E, o tocoferolo (fig.2-6), è una vitamina liposolubile, che viene accumulata nel fegato e non è dunque necessario assumerla con regolarità, attraverso i cibi. Attraverso l'idrolisi dei suoi esteri la vitamina E viene assorbita a livello intestinale grazie alla presenza della bile e del succo pancreatico. I tocoferoli passano prima nella circolazione linfatica e poi

in quella sistemica dove vengono veicolati dalle lipoproteine. La lipoproteina che trasporta una grande quantità della vitamina è la LDL. Quindi la vitamina E inclusa nelle lipoproteine è trasportata

a diversi organi come muscoli, tessuto adiposo, cuore e polmoni.

La vitamina E è sensibile al calore e alla luce, quindi tende a degradarsi in presenza di alte temperature. Il tocoferolo ha proprietà antiossidanti, combatte i radicali liberi e favorisce il rinnovo cellulare. Le sue caratteristiche lo rendono un importante strumento di prevenzione al cancro, tra l'altro protegge l'organismo dai danni dell'inquinamento e del fumo di sigaretta oltre che di assimilazione delle proteine. Un'indagine chimica di *Brassicaceae* ha rivelato effettivamente un'elevata presenza di tocoferoli, di cui α -tocoferolo è il più abbondante.

Questi studi sono stati effettuati sulle specie *B. oleracea* var. *italica* e *B. oleracea* var. *acephala*, i quali estratti, hanno dimostrato di averne in elevate concentrazioni; rispettivamente di 16,2 e 19,2 lg / g. (Avato 2015)

2.5.3 Vitamina A (retinolo)

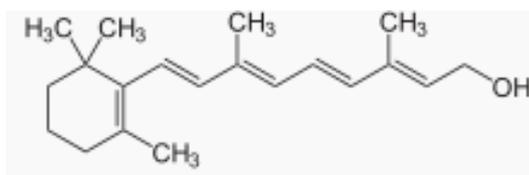


Figura 2-7 Struttura retinolo

La vitamina A o retinolo (fig.2-7), è una vitamina liposolubile, in natura si trova in diverse forme. Con il termine di vitamina A vengono indicati sia il retinolo che i suoi analoghi, detti retinoidi. La carenza di vitamina A determina inibizione della crescita, deformazione e fragilità delle ossa e serie modifiche delle strutture epiteliali e degli organi riproduttivi. La vitamina A infatti regola la differenziazione degli epitelii mucosi. La sua carenza può indurre anche secchezza della pelle e delle mucose respiratorie, digerenti e urinarie. Un'altra importante alterazione riguarda la funzione visiva poiché fa parte dei componenti della rodopsina, la sostanza presente sulla retina che dà all'occhio la sensibilità alla luce.

Considerati precursori della vitamina A sono i carotenoidi, una classe di pigmenti organici che possono essere rinvenuti nelle piante, la loro concentrazione è notevole in vegetali a foglia verde nonché anche in alcune specie di *Brassicaceae*; questi composti sono sensibili al calore, perciò la cottura può andare a determinarne una diminuzione. Sono stati effettuati degli studi proprio per valutare gli effetti della cottura su specie *Brassica oleracea* var. *acephala* che ha portato ai seguenti risultati riportati nella tabella 2-1. (Akdaş Zelal Zuhail 2016)

Tabella 2-1 Effetti di metodi di cottura su clorofille carotenoidi e acido ascorbico contenuti nel cavolo.

	Total chlorophylls (mg/kg dw)	Total carotenoids (mg β -car eq/kg dw)	Ascorbic acid (mg/kg dw)
Fresh	8890.1 \pm 534.8 ^a	560.1 \pm 24.9 ^a	4917.8 \pm 559.7 ^a
Steaming	7227.6 \pm 760.7 ^a	555.6 \pm 12.1 ^a	4777.8 \pm 0.3 ^a
Boiling	6977.3 \pm 242.5 ^a	567.6 \pm 22.2 ^a	2306.2 \pm 71.3 ^b
Microwaving	3975.9 \pm 137.4 ^b	559.0 \pm 42.0 ^a	4395.5 \pm 6.6 ^a
Stir-frying	2580.2 \pm 277.6 ^b	402.0 \pm 45.5 ^b	2218.2 \pm 443.5 ^b

2.5.4 Polifenoli

I polifenoli costituiscono una famiglia di molecole organiche largamente presenti nel regno vegetale. Sono caratterizzati, come indica il nome, dalla presenza di molteplici gruppi fenolici associati in strutture più o meno complesse generalmente di alto peso molecolare.

I composti fenolici si accumulano nelle cellule vegetali durante l'intero ciclo vitale della pianta, ma sono soggetti ad un processo di degradazione. Ciò implica che vari composti fenolici presenti nei semi scompaiono del tutto al termine del processo di germinazione e che fasi di rapida crescita si accompagnano a sostanziali variazioni qualitative e quantitative della composizione della frazione fenolica. Essi rappresentano i più importanti antiossidanti interruttori di catena in quanto l'ossidrile fenolico è un idrogeno donatore e di conseguenza può cedere facilmente un atomo di idrogeno per bloccare la catena radicalica, a causa della forza debole del legame O-H. Il radicale fenossile che si forma da tale processo è stabilizzato per risonanza e non reagisce né con l'ossigeno né con il substrato ossidabile.

I polifenoli possono essere classificati in diverse sottocategorie (flavonoidi, tannini, lignine, antrachinoni e melanine) ognuna con le proprie funzioni ed effetti benefici. Ai polifenoli possono comunque essere attribuite in via generale diverse proprietà benefiche come capacità antiossidanti e antinfiammatorie; essi sarebbero inoltre in grado di proteggere le cellule dallo stress ossidativo e tenere sotto controllo i livelli di colesterolo; sono state inoltre a loro attribuite capacità antibatteriche, antipruriginose, antiparassitarie e citotossiche.

I polifenoli vengono quindi suddivisi in quattro classi:

- acidi fenolici
- flavonoidi
- stilbenoidi
- lignani

2.5.4.1 Acidi fenolici

Gli acidi fenolici sono composti contenenti un gruppo ossidrilico fenolico e un gruppo carbossilico; gli acidi fenolici presenti in natura sono ulteriormente suddivisi in acidi idrossibenzoici e acidi idrossicinnamici che sono idrossi derivati dell'acido cinnamico $C_6H_5CH=CHCOOH$ (fig.2-8).

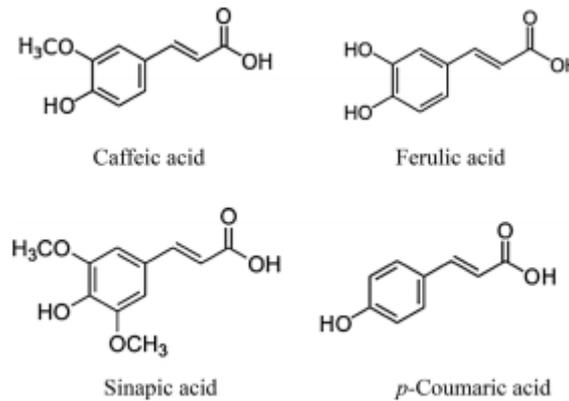


Figura 2-8 Acidi fenolici nelle Brassicaceae

2.5.4.2 Flavonoidi

I flavonoidi sono strutture fenoliche appartenenti alla classe dei polifenoli, rappresentano un gruppo molto numeroso di composti fenolici, presenti in molti prodotti vegetali, quali cipolle, vino rosso, tè verde e nero.

Essi svolgono un importante ruolo fisiologico nelle piante e conferiscono sapore e colorazioni che vanno dal bianco al giallo, ad alimenti e bevande.

Sono considerati i più abbondanti nella dieta e presentano nella loro struttura due anelli aromatici legati tra loro da tre atomi di carbonio che formano un eterociclo ossigenato.

Tutti i flavonoidi, normalmente, posseggono uno scheletro base $C_6C_3C_6$ composto da una unità C (anello A) e a da una unità C_6-C_3 (anello B ed atomi di carbonio 2, 3 e 4). Gli atomi di carbonio all'interno dello scheletro base vengono originati da due distinti pathways. L'anello B, con gli atomi di carbonio 2, 3, e 4, viene fornito da un derivato dell'acido cinnamico, mentre l'anello A è il risultato della condensazione testa-coda di 3 unità acetato. (fig.2-9)

L'enzima chiave nella biosintesi dei flavonoidi è la calcone sintasi (CHS). Questo enzima catalizza la condensazione in più stadi di tre unità acetato, derivanti da malonil-CoA, con un opportuno derivato attivato dell'acido cinnamico, normalmente il p-cumaroil-CoA, con conseguente formazione di un calcone, dal quale si originano tutte le strutture dei flavonoidi (fig. 2-9)

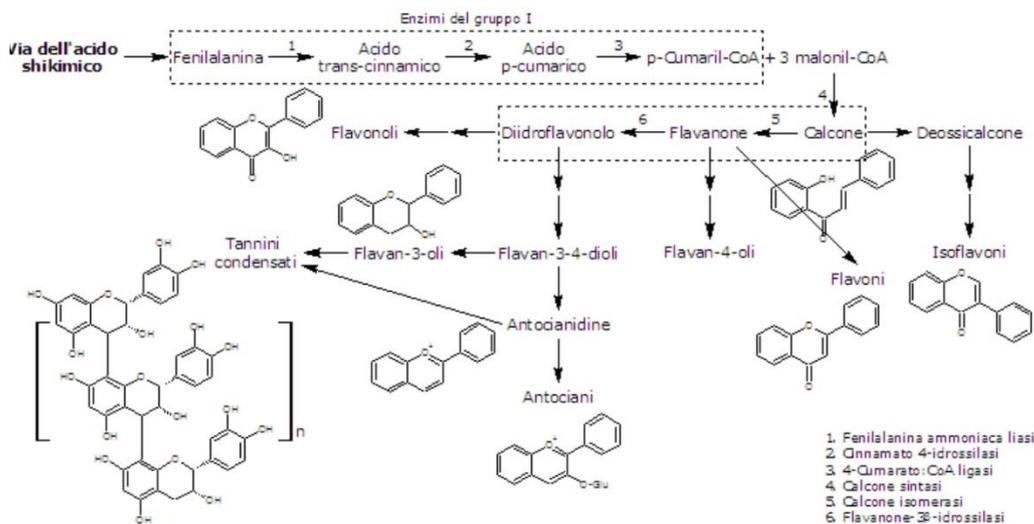


Figura 2-9 Biosintesi flavonoidi.

I vari sottogruppi di flavonoidi vengono classificati in base allo stato di ossidazione dell'anello eterociclico ed alla posizione dell'anello B (fig.2-10). Molti di questi hanno l'anello B in posizione 2 sull'anello eterociclico (flavanoni, flavoni, flavonoli ed antocianine), invece negli isoflavonoidi l'anello B è in posizione 3 mentre nelle 4-fenilcumarine (neoflavonoidi) l'anello B è in posizione 4.

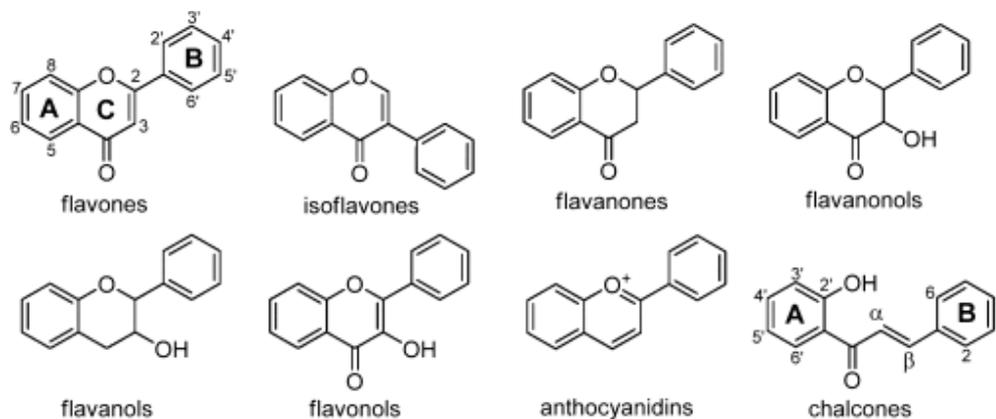


Figura 2-10 Flavonoidi.

Questi composti sono particolarmente interessanti per quanto riguarda i loro effetti sulla salute umana per le loro proprietà antiossidanti poiché possono agire come scavenger di radicali (Avato 2015)

2.5.4.3 Lignani

I lignani (fig.2-11) sono un folto gruppo di polifenoli presenti nelle piante, con effetti protettivi sull'apparato cardiovascolare e sul sistema immunitario. Sono dei composti fenolici formati dall'unione di molecole di fenilpropano legate attraverso un legame carbonio-carbonio che si stabilisce principalmente tra gli atomi centrali delle rispettive catene laterali. Sulla base dello scheletro carbonioso, del pattern di ciclizzazione e del modo in cui l'ossigeno è incorporato nello scheletro della molecola, possono essere suddivisi in 8 sottogruppi: furani, furofurani, dibenzilbutani, dibenzilbutirrolattoni, dibenzocicloottadieni, dibenzilbutirrolattoli, ariltetraline e arilnafatleni.

Essi sono contenuti nei tessuti legnosi delle piante, soprattutto nei vegetali come broccoli, cavoli, cavolfiore, la fonte più ricca però è rappresentata dai semi di lino.

Tramite i lignani le piante si difendono dall'aggressione dei microrganismi; anche il corpo umano può tuttavia beneficiare delle loro proprietà antibatteriche.

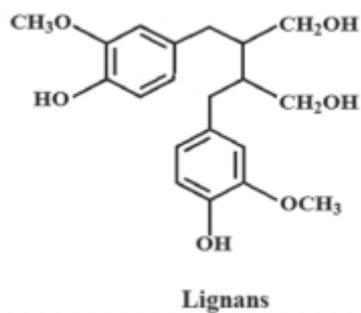


Figura 2-11 Struttura lignani

2.5.4.3 Polifenoli nelle *Brassicaceae*

Le specie della famiglia delle *Brassicaceae* sono ricche di elementi fenolici, tra cui acidi fenolici semplici, flavonoidi, antociani e lignani, per quanto riguarda questi ultimi sono stati identificati il lariciresinolo e il pinoresinolo. (fig.2-12)

Il contenuto di fenolici nelle piante di *Brassicaceae* dipende da fattori genetici e ambientali ed è stato dimostrato che esistono differenze significative tra varietà all'interno della stessa specie in relazione alla parte vegetale. Generalmente, le foglie contengono quantità più elevate di costituenti fenolici rispetto agli steli e alle infiorescenze.

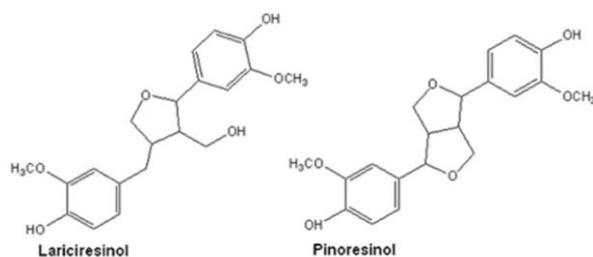


Figura 2-12 Principali lignani delle Brassicaceae

Gli acidi idrossicinnamici come gli acidi caffeico, ferulico, sinapico e p-cumarico (fig.2-8) sono tra i fenolici più diffusi in queste piante; sono stati infatti identificati in alcune varietà come la *B. juncea*, la *B. rapa* e la *B. campestris*, mentre questi composti non sono stati trovati nella *B. oleracea*.

I flavonoidi comunemente isolati dalle foglie di *Brassica* sono costituiti da quercetina, caenferolo e isoramnetina (fig.2-13). Questi sono principalmente O-glicosilati nelle posizioni 3 e 7 dell'anello C dell'aglicone, con glucosio, soforosio o sototriosio e spesso acilati con diversi acidi idrossicinnamici.

All'interno dei componenti fenolici, le *Brassicaceae* sintetizzano anche antocianine, che sono particolarmente abbondanti nelle colture di *Brassica* pigmentate come la *B. oleracea* var. *capitata* f. *rubra* (cavolo rosso), i derivati colorati di *B. oleracea* var. *botrytis* (ad esempio il cavolfiore viola), nella *B. oleracea* var. *italica* (broccoli), nella *B. juncea* (senape) o nel *Raphanus sativus* (ravanella viola). Gli antociani principali che si accumulano in queste brassiche sono i glucosidi acilati della cianidina, con alcune variazioni qualitative e quantitative.

L'antocianina identificata più comune nelle colture di brassica è rappresentata dal cianidin-3-soforoside-5-glucoside. L'acilazione che si verifica con gli acidi p-cumarico, ferulico e sinapico, è quella più diffusa nella *B. oleracea* var. *capitata* f. *rubra*.

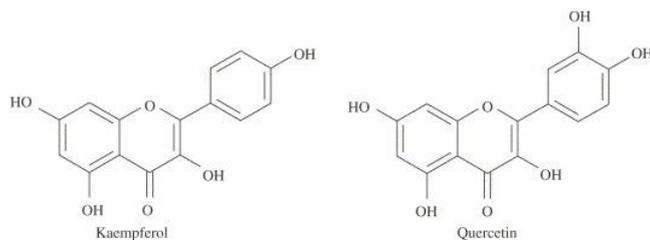


Figura 2-13 Principali flavanoidi nelle Brassicaceae

2.5.5 Glucosinolati e isotiocianati

I glucosinolati (GLS) sono composti glucosidici contenenti zolfo che producono il tipico odore pungente delle specie di *Brassica* come il cavolo, il broccolo e il cavolfiore. Da un punto di vista chimico i GLS sono costituiti da β -D-tioglucoosio, una unità glucidica unita tramite legame tioglucoosidico ad un'ossima sulfonata, contenente una catena laterale (R) variabile di natura amminoacidica (fig.2-14) che può presentare gruppi alifatici (derivati da alanina, leucina, isoleucina, metionina o valina), aromatici (dalla fenilalanina o tirosina), o eterociclici (dal triptofano).

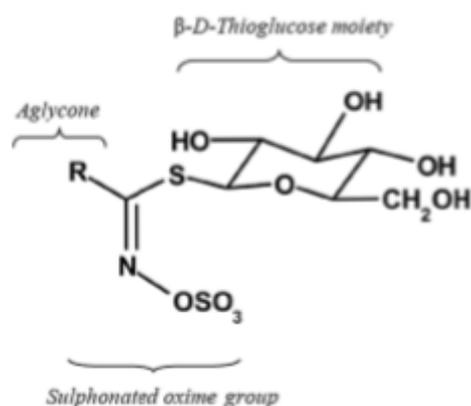


Figura 2-14 Struttura glucosinolato.

I GLS sono generalmente presenti in tutte le parti della pianta, ma con differenze sia qualitative che quantitative. Per esempio, nei semi e nei germogli la quantità totale può essere fino a dieci volte superiore a quella rilevata negli altri tessuti, costituendo anche il 10% del totale.

Tra i principali glucosinolati (riportati in tabella 2-2) presenti nelle *Brassicaceae* ritroviamo la sinigrina, la progoitrina e la glucobrassicina, nella *B. oleracea* var. *capitata* e nella var. *botrytis*, mentre nelle specie di *Brassica rapa* osserviamo principalmente la progoitrina e la glucobrassicina.

È stato inoltre effettuato uno studio sul profilo GLS di una varietà di *B. oleracea*, tradizionalmente coltivata in una zona limitata dell'Italia meridionale e localmente conosciuta come "mugnolo", che ha permesso di acquisire alcune informazioni rilevanti per la sua allocazione sistematica. Il "Mugnolo" era inizialmente classificato come *B. oleracea* var. *botrytis* (cavolfiore), ma con l'osservazione che in esso erano presenti principalmente glucorafanina e glucoiberina, e solo quantità molto piccole di sinigrina, è stato possibile differenziarlo dalla variante *botrytis* alla quale inizialmente era associato.

Tabella 2-2 Glucosinolati nelle Brassicaceae

Structure	R-group name	Trivial name
GLS*—CH ₃	Methyl	Glucocapparin
GLS*—(CH ₂) ₃ —S—CH ₃	3-(Methylthio)propyl	Glucolbervirin
GLS*—(CH ₂) ₄ —S—CH ₃	4-(Methylthio)butyl	Glucoerucin
GLS*—(CH ₂) ₃ —S(=O)—CH ₃	3-(Methylsulfinyl)propyl	Glucolberrin
GLS*—(CH ₂) ₄ —S(=O)—CH ₃	4-(Methylsulfinyl)butyl	Glucoraphanin
GLS*—(CH ₂) ₃ —S(=O) ₂ —CH ₃	3-(Methylsulfonyl)propyl	Glucocheitrolin
GLS*—(CH ₂) ₄ —S(=O) ₂ —CH ₃	4-(Methylsulfonyl)butyl	Glucocerysolin
GLS*—(CH ₂) ₂ —CH=CH ₂	Allyl (2-propenyl)	Sinigrin
GLS*—(CH ₂) ₃ —CH=CH ₂	3-Butenyl	Glucosinapin
GLS*—(CH ₂) ₂ —CH(OH)—CH=CH ₂	2-Hydroxy-3-butenyl (<i>R</i>)	Progoitrin
GLS*—(CH ₂) ₄ —CH=CH ₂	4-Pentenyl	Glucobrassicinap
GLS*—(CH ₂) ₃ —CH=CH—S(=O)—CH ₃	4-(Methylsulfinyl)-3-butenyl	Glucoraphenin
GLS*—CH ₂ —C ₆ H ₅	Benzyl	Glucotropaeolin
GLS*—CH ₂ —C ₆ H ₄ (OH)	2-Hydroxybenzyl	
GLS*—CH ₂ —CH ₂ —C ₆ H ₅	2-Phenylethyl	Glucosinasturtin

L'idrolisi dei GLS implica la rottura enzimatica del legame tioglucoside con il rilascio di glucosio e di un aglicone instabile che origina una serie di prodotti di riarrangiamento come isotiocianati sostituiti, nitrili, tiocianati, epitionitrili e ossazolidine (Figura 2-15). Tra questi prodotti di degradazione gli isotiocianati (ITC) sono quelli ai quali sono state attribuite proprietà salutari. Il processo di degradazione avviene anche durante la masticazione e ingestione da parte dell'uomo a causa delle bioglucosidasi bioattive della microflora intestinale che converte i glucosinolati ingeriti negli isotiocianati correlati. Gli ITC formati, vengono quindi assorbiti e metabolizzati facilmente producendo i sopracitati effetti sulla salute umana. Nell'isotiocianato il gruppo funzionale è $-N=C=S$, formato tramite la sostituzione dell'ossigeno nel gruppo isocianato con lo zolfo. Il sulforafano (SFN) (fig.1-10) è sicuramente l'ITC che ha attirato maggiormente l'attenzione del mondo scientifico per le sue proprietà terapeutiche. Il SFN deriva da uno dei GLS più abbondanti nelle *Brassicaceae*. (Avato 2015)

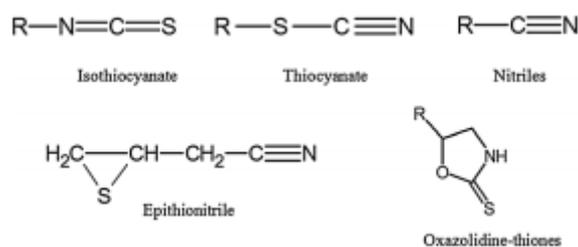


Figura 2-15 Prodotti derivati dell'idrolisi dei Glucosinolati.

Generalmente, nella pianta i prodotti di decomposizione dei GLS agiscono come metaboliti della difesa contro gli agenti patogeni e gli insetti. Inoltre, hanno la capacità specifica di proteggere le cellule dagli agenti cancerogeni e dai radicali reattivi dell'ossigeno. (Melega 2013)

Capitolo 3

METODI PER LA DETERMINAZIONE DEL POTERE ANTIOSSIDANTE.

Gli antiossidanti svolgono un ruolo importante nella conservazione degli alimenti inibendo i processi di ossidazione; inoltre contribuiscono alla promozione della salute inibendo lo stress ossidativo causato dalla formazione *in vivo* delle specie reattive all'ossigeno (ROS) e all'azoto (RNS) che si producono durante l'insorgenza di molte malattie. Negli ultimi anni c'è stato un forte aumento della richiesta di antiossidanti naturali da utilizzare come conservanti alimentari, nutraceutici e prodotti farmaceutici. La ricerca di fonti di antiossidanti presenti in natura e la progettazione di nuovi alimenti con attività antiossidante richiedono metodi affidabili di valutazione dell'attività antiossidante (AOA). Per questo sono stati sviluppati numerosi test chimici e biologici per misurare a livello molecolare o cellulare la capacità di assorbimento di radicali, nonché l'inibizione dell'ossidazione complessiva in sistemi alimentari e biologici più complessi. Questi metodi variano in termini di meccanismo antiossidante, tipo di substrato, iniziatore dell'ossidazione, espressione dei risultati e facilità d'uso. Una corretta selezione del metodo o combinazione di metodi è importante per una valida valutazione dell'attività antiossidante e del potenziale dell'antiossidante come conservante alimentare o come agente per la promozione della salute. (Shahidi F. 2015).

I diversi saggi funzionano con meccanismi diversi e la misura dell'AOA può essere effettuata attraverso metodi diretti o indiretti: nel primo caso si studia l'effetto del substrato da analizzare sulla degradazione ossidativa di un dato sistema; nel secondo caso si studia la sua reattività nei confronti di radicali o di specie ossidanti o riducenti e quindi si studiano processi che non riproducono esattamente la vera degradazione ossidativa. Chiaramente i metodi diretti danno una misura più realistica della capacità antiossidante di un sistema anche se spesso sono difficilmente ripetibili e di difficile interpretazione. Comprendere i principali meccanismi, vantaggi e limiti dei test di misurazione è importante per la corretta selezione dei metodi per una valida valutazione del potenziale antiossidante nel substrato desiderato.

Tra i diversi metodi disponibili per misurare l'attività antiossidante, in questo lavoro abbiamo scelto tre metodi che funzionano in maniera diversa in modo da avere un quadro

completo ed il più possibile realistico della capacità dei substrati studiati di contribuire alla prevenzione e all'interruzione dello stress ossidativo in vivo.

3.1 Metodi diretti

3.1.1 Test ORAC

Nell'approccio diretto si promuove la degradazione ossidativa di un dato sistema e si studia l'effetto dell'antiossidante su di essa.

Il metodo diretto che è stato utilizzato per determinare la capacità antiossidante totale, è il saggio ORAC il quale misura la capacità del substrato analizzato di interrompere la catena di perossidazione radicalica di una matrice biologica.

Si tratta di un metodo molto sensibile che può utilizzare la beta-ficoeritrina (o un'altra matrice fluorescente), una proteina, come matrice; la fluorescenza della beta-ficoeritrina è altamente sensibile alla conformazione e all'integrità chimica della proteina stessa. Nelle condizioni appropriate la perdita della fluorescenza in presenza di radicali perossilici è un indice del danno ossidativo generato dalle specie reattive.

Per innescare il processo di perossidazione viene utilizzato il 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dicloridrato (AAPH), che è un azocomposto solubile in acqua che si decompone termicamente, portando alla formazione, a velocità costante, di radicali perossilici.

In un dato campione l'inibizione della degradazione della beta-ficoeritrina (che si riflette nella conservazione della sua fluorescenza), dovuta all'azione protettiva degli antiossidanti presenti, è una misura della capacità antiossidante del campione nei confronti delle specie reattive (ROS e RNS). Finché gli antiossidanti sono in grado di catturare i radicali, essi proteggono il marker di fluorescenza dal decadimento; terminato l'effetto degli antiossidanti, i radicali reagiscono con la beta-ficoeritrina che perde fluorescenza. Il tempo di decadimento della fluorescenza è proporzionale alla quantità ed alla attività degli antiossidanti presenti nel campione. (Campus 2007). La generazione di radicali perossilici è sensibile alla temperatura ed è stato segnalato come uno dei principali fattori che contribuiscono a interferire con i risultati e l'incoerenza del dosaggio; è quindi molto importante controllare e monitorare la temperatura durante il dosaggio. Tuttavia, questo problema è stato ben mitigato dallo sviluppo di lettori di piastre per fluorescenza altamente automatizzati dotati di incubatrice (Shahidi F. 2015). I risultati finali sono calcolati usando la differenza delle AUC (aree al di sotto della curva) di decadimento della beta-ficoeritrina (fluorescenza relativa vs tempo) tra il campione in esame ed il bianco (senza antiossidanti aggiunti). L'area al di sotto della curva (AUC) è

proporzionale alla concentrazione di tutti gli antiossidanti presenti nel campione ed i risultati vengono riferiti ad una retta di taratura costruita con uno standard come il Trolox.

3.2 Metodi indiretti

3.2.1 Test ABTS

L'ABTS è un metodo indiretto per lo screening dell'attività antiossidante. Si tratta di un test di decolorazione applicabile ad antiossidanti sia lipofili che idrofili, tra cui flavonoidi, idrossicinnamati, carotenoidi e antiossidanti plasmatici. Il catione radicale del 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-acido solfonico) sale di diammonio (ABTS) è il reagente che può essere utilizzato per la valutazione dell'attività antiossidante di soluzioni di sostanze pure, di miscele acquose e estratti di alimenti o bevande (Re 1999) mediante una lettura spettrofotometrica del suo assorbimento nel visibile.

Il metodo prevede la formazione in situ del radicale catione dell'ABTS mediante ossidazione con potassio persolfato. Tale radicale catione ha una colorazione blu-verde intenso e mostra un picco massimo di assorbimento a 734 nm; esso, a contatto con il campione in esame reagisce con gli antiossidanti presenti e perde la sua colorazione in maniera proporzionale al loro contenuto. La capacità antiossidante verrà determinata calcolando la percentuale di inibizione. Poiché l'esatta composizione degli antiossidanti presenti nei sistemi complessi, quali gli alimenti, non può essere conosciuta, l'attività antiossidante del sistema in esame viene riferita ad un antiossidante di sintesi, il Trolox, che è un analogo idrosolubile della vitamina E, e viene calcolata considerando che sia l'unico antiossidante presente nel sistema; il sistema viene quindi paragonato ad una soluzione contenente una determinata quantità di tale antiossidante. Viene quindi costruita una curva di taratura dose-risposta di Trolox rispetto alla quale viene misurata la capacità antiossidante degli estratti analizzati. Il Trolox viene usato come antiossidante di riferimento in quanto è solubile sia in fase acquosa che in fase organica. I risultati espressi in Trolox mM esprimono quindi la concentrazione di Trolox che sarebbe contenuta nel campione analizzato se esso fosse l'unico antiossidante presente. È necessario tenere in considerazione che il Trolox ha un coefficiente di reattività nei confronti dell'ABTS di 2 come la maggior parte dei polifenoli e come l'acido ascorbico, mentre per il licopene ed i carotenoidi in generale tale coefficiente di reattività è uguale a 5. (Pellegrini 1999)

3.3 Metodi per la valutazione del contenuto fenolico totale

3.3.1 Saggio TPC con reagente Folin- Ciocalteu

Il contenuto fenolico totale (TPC), è un altro parametro importante ed ampiamente utilizzato per la valutazione della capacità di substrati, come ad esempio estratti di erbe, spezie, frutta, cereali e legumi, di bloccare il processo di ossidazione. Il metodo generalmente utilizzato per tale determinazione è il saggio di Folin- Ciocalteu che si basa sulla riduzione del reagente Folin-Ciocalteu da parte di composti fenolici in condizioni alcaline. L'esatta natura chimica del reagente Folin-Ciocalteu non è chiaramente definita, ma si ritiene che contenga complessi di acido fosfomolibdico/fosfotungstenico che sono ridotti per produrre un cromoforo di colore blu con il massimo assorbimento a 765 nm (Shahidi F. 2015).

L'intensità di colorazione della soluzione risultante è proporzionale alla quantità di polifenoli presenti nel campione e, indirettamente, all'attività antiossidante. La reazione tra i fenoli e il reattivo Folin-Ciocalteu è piuttosto complessa e non è nota con esattezza ma si ritiene che il reattivo fosfomolibdico ossidi i fenoli formando eteropolifosfatungstatimolibdati responsabili della colorazione blu che si osserva. Il reattivo, però, non è specifico per i fenoli, ma può essere ridotto anche da altri composti, come l'acido ascorbico, e per minimizzare tale interferenza solitamente si aggiunge carbonato di sodio che, creando un ambiente alcalino (pH ~10), favorisce la dissociazione ionica dei fenoli e la loro reazione con il reattivo Folin-Ciocalteu. Il contenuto di polifenoli nel campione in esame viene riferito ad un composto di riferimento, l'acido gallico, e viene misurato come se l'unico fenolo presente nel sistema fosse quello di riferimento, costruendo una curva di taratura. (Singleton 1999). Questo saggio presenta numerosi vantaggi, tra cui la sua semplicità, riproducibilità e robustezza, ma presenta alcuni inconvenienti. In secondo luogo, la sovrastima della TPC è una delle principali interferenze per il test di Folin-Ciocalteu, a causa del contributo degli agenti riducenti non fenolici presenti nel sistema che contribuiscono alla riduzione del reagente. Esempi di composti con tali proprietà sono gli zuccheri riducenti e alcuni amminoacidi. Pertanto, i risultati che si ottengono per la determinazione del TPC possono essere sopravvalutati di un ordine di grandezza rispetto a quelli ottenuti con altri metodi.

Capitolo 4

MATERIALI E METODI

4.1 Preparazione campioni

I campioni che sono stati presi in esame sono 4 e sono i seguenti:

- *Brassica montana* Pourr (cavolo selvatico), raccolta al Belvedere Passetto
- *Brassica montana* Pourr., raccolta sul Monte Conero
- *Brassica rapa* subsp. *sylvestris* var. *esculenta* (cima di rapa)
- *Brassica oleracea* var. *capitata* (cavolo cappuccio)

Ogni campione di pianta è stato trattato con lo stesso metodo e con la stessa serie di operazioni; sono state accuratamente scelte piante non deteriorate ed in buono stato, in modo tale da garantire l'omogeneità delle analisi.

4.1.1 Essiccazione campioni

I campioni sono stati accuratamente puliti eliminando le radici, gli steli, i baccelli, e i fiori e successivamente pesati utilizzando una bilancia tecnica. Successivamente sono stati lavati con acqua corrente e sciacquati più volte, per fare in modo che qualunque residuo di terra, polvere o altro contaminante non rimanesse attaccato (fig.4-1). Le foglie sono state poi posate su delle vaschette di alluminio cercando di non sovrapporle (in modo tale da non ostacolare l'evaporazione dell'acqua durante l'essiccazione) e infine messe in stufa a 40° fino a peso costante. I tempi di essiccazione in stufa per i vari campioni sono riportati nella tabella seguente:

CAMPIONE	GIORNI a 40°
<i>Brassica montana</i> P. (Conero)	6 gg
<i>Brassica montana</i> P. (Passetto)	3 gg
<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>sylvestris</i> var. <i>esculenta</i>	4 gg
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	7 gg



Figura 4-1 Lavaggio campioni.

4.1.2 Estrazione campioni

10 g di ogni campione, sufficiente per tutte le estrazioni che si debbono fare, sono stati macinati accuratamente con un macinino a mano e poi con mortaio e pestello fino ad ottenere una polvere fina (fig.4-2).

È stata preparata quindi una soluzione di metanolo all'80% miscelando in una beuta, 80 ml di metanolo e 20 ml di acqua ultra pura.

Ogni campione è stato estratto tre volte nel seguente modo.

In una falcon da 50 ml sono stati pesati 2 g di campione e ad essi sono stati aggiunti 10 ml di metanolo all'80%. La falcon è stata quindi chiusa, vortexata e messa ad agitare nell'agitatore rotante in movimento continuo per 10 minuti. La dispersione ottenuta è stata quindi centrifugata per 10 minuti a 8000 giri (bilanciando la centrifuga) e quindi 5 ml di surnatante (volume prima estrazione) è stato trasferito in una falcon vuota (fig.4-3).

Al residuo rimasto nella falcon sono stati aggiunti altri 10 ml metanolo (80%) e tutte le operazioni descritte sono state ripetute; quindi sono stati prelevati altri 10 ml di surnatante che sono stati uniti al primo estratto. Gli estratti uniti sono stati quindi porzionati (500 μ l) in eppendorf da 1.5 ml.

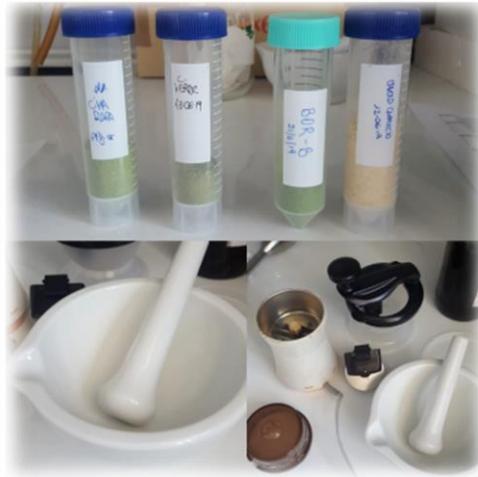


Figura 4-2 Macinazione campioni.



Figura 4-3 Vortex e centrifuga campione.

4.2 Test ORAC

Per la determinazione del potere antiossidante con un test diretto è stato utilizzato il metodo ORAC utilizzando come matrice ossidabile la fluoresceina.

4.2.1 Materiali

- Estratti di *Brassica* congelati
- Soluzione Tampone fosfato 75 mM (pH 7.4)
- Soluzione Sodio Fluoresceina 0.008 μ M in Tampone Fosfato

- 2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH) (MW = 271.20 g/mol)
- Soluzione Trolox 18 mM (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)
- Acqua ultra pura
- Falcon da 50 ml
- Eppendorf da 1.5 ml
- Piastre 96 pozzetti NERE
- Pipette
- Pipetta Multicanale
- Vortex
- Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader Biotek (Multiplates)
- Piaccametro

4.2.2 Preparazione reagenti

4.2.2.1 Tampone fosfato 75 mM a pH 7.4

Per la preparazione della soluzione di tampone fosfato (PB) 75 mM a pH 7.4 si pesano 20.41 g di fosfato biacido di potassio in un beacker da 1000 ml. A questi si aggiungono 925 ml di acqua deionizzata e 75 ml di NaOH 1M. Il pH viene aggiustato a 7.4 mediante lettura con un piaccametro. La soluzione ottenuta viene conservata in frigo.

4.2.2.2 Fluoresceina 0.008 μ M in PB

Viene preparata una soluzione 0.4 mM di fluoresceina pesando accuratamente circa 0.0015 g di sodio fluoresceina in 10 ml di tampone fosfato, e riaggiustando il volume in base alla pesata. La soluzione viene porzionata e congelata.

Viene quindi preparata giornalmente una soluzione di fluoresceina 4 μ M (diluizione 100x) prelevando 150 μ l di soluzione 0.4 mM e aggiungendo 15 ml di PB. Tale soluzione viene quindi diluita ulteriormente 500 volte prelevando 80 μ l di soluzione 4 μ M e aggiungendo 40 ml di PB in falcon da 50 ml per ottenere la soluzione di fluoresceina 0.008 μ M.

4.2.2.3 AAPH 25 mM in PB

Preparare giornalmente la soluzione 25 mM di AAPH (usare soluzione fresca), pesando accuratamente circa 0.08136 g di AAPH ed aggiungendo 12 ml di PB in falcon da 15 ml, riaggiustando il volume in base alla pesata.

4.2.3 Analisi

Per l'analisi i campioni di *Brassica* vengono prima diluiti 15 volte aggiungendo ad una eppendorf contenente 1400 μl di acqua 100 μl di estratto e quindi diluiti ulteriormente altre 60 volte aggiungendo a 1475 μl di tampone fosfato 25 μl di estratto diluito 15 x, al fine di ottenere una diluizione 900x. L'operazione è stata ripetuta per ogni estrazione di ogni campione di *Brassica* ottenendo 12 soluzioni da testare.

Sono state quindi preparate delle soluzioni diluite di Trolox a partire da una soluzione di Trolox 0.44 mM preparata diluendo la soluzione stock 18 mM (30 μl) in tampone fosfato (1.2 ml) seguendo lo schema riportato nella tabella 4-1 seguente:

Tabella 4-1 Preparazione soluzioni diluite di Trolox per test ORAC.

	TX 0.44 mM (μl)	PB (μl)	[TX] dil (mM)	[TX] dil (μl)	Pozzetto (μl)	[TX]_{Pozzetto} (μM)
S1	20	1200	0.0072	25	250	0.72
S2	40	1200	0.0142	25	250	1.42
S3	60	1200	0.0209	25	250	2.09
S4	120	1200	0.0399	25	250	3.99
S5	200	1200	0.0627	25	250	6.27
S6	300	1200	0.0878	25	250	8.78

Lo strumento è stato quindi portato alla temperatura di 37° C e è stata preparata la piastra di lettura. L'analisi è stata eseguita con una piastra nera a 96 pozzetti dove sono stati introdotti 25 μl degli estratti di *Brassica* diluiti 900x, delle soluzioni diluite di Trolox (standard) e di PB (controllo), tutto in quadruplica. Nei pozzetti della piastra sono stati quindi aggiunti 150 μl di soluzione di fluoresceina 0.008 μM ; in un pozzetto sono stati introdotti 250 μl di tampone fosfato (bianco) (fig.4-4). La piastra è stata incubata per 20 minuti a 37°C e quindi in ogni pozzetto sono stati aggiunti (tranne il bianco) 75 μl di soluzione di AAPH 25 mM per innescare la perossidazione. Successivamente dopo agitazione la piastra è stata sottoposta ad eccitazione a 485 nm (20 nm bandpass) ed è stata letta l'emissione a 528 nm (20 nm bandpass) con gain fisso a 100 ad intervalli di 2 minuti, per 180 minuti (cinetica).



Figura 4-4 Piastra con test ORAC.

4.2.4 Elaborazione dati

I valori ORAC di attività antiossidante sono stati determinati dall'area sottesa alla curva AUC che viene calcolata attraverso la seguente formula:

$$\text{AUC} = \left(\frac{R_1}{R_1} \right) + \left(\frac{R_2}{R_1} \right) + \left(\frac{R_3}{R_1} \right) + \dots + \left(\frac{R_n}{R_1} \right)$$

dove R_1 è la lettura della fluorescenza all'inizio della reazione e R_n è la lettura n-esima.

Sottraendo all'AUC del campione in esame l'AUC del controllo (fluoresceina senza antiossidante) si ottiene la Net-AUC:

$$\text{Net AUC} = \text{AUC}_{\text{campione}} - \text{AUC}_{\text{controllo}}$$

I risultati vengono poi espressi in Trolox Equivalenti utilizzando il coefficiente angolare della retta di regressione lineare ottenuto dalla curva di calibrazione del Trolox (0 - 10 μM). Per la costruzione della retta di taratura sono stati messi in grafico in ascissa i valori di Net-AUC ed in ordinata i valori della concentrazione di Trolox Equivalenti (uMTXEq) nei pozzetti (fig.4-5).

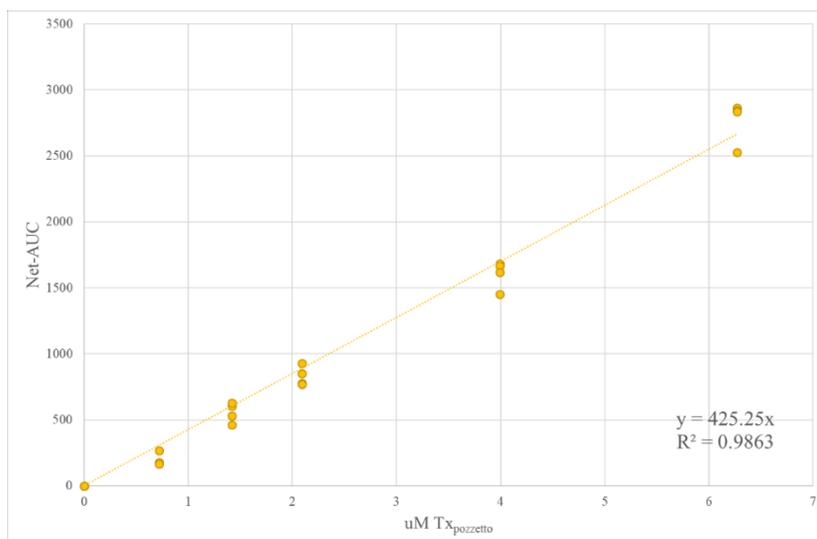


Figura 4-5 Retta di taratura test ORAC

Dalla pendenza della retta che meglio interpola i punti (STAT) è possibile ricavare la concentrazione TXEq nei pozzetti in cui sono stati introdotti i campioni diluiti di *Brassica* da analizzare con la seguente equazione:

$$\mu\text{M TXEq pozzetto} = \text{STAT} * \text{Net AUC}$$

Quindi, utilizzando la formula:

$$C_i * V_i = C_f * V_f$$

dove:

C_i è la concentrazione $\mu\text{M TXEq}$ del campione diluito di *Brassica* analizzato

V_i è il volume del campione diluito di *Brassica* analizzato aggiunto nel pozzetto (25 μl);

C_f è la concentrazione $\mu\text{M TXEq}$ nel pozzetto

V_f è il volume di soluzione contenuta nel pozzetto (250 μl),

possiamo risalire alla concentrazione $\mu\text{M TXEq}$ del campione diluito di *Brassica* analizzato:

$$C_i = \mu\text{M TXEq campione diluito} = \mu\text{M TXEq nel pozzetto} * 250 \mu\text{l} / 25 \mu\text{l}$$

Utilizzando il fattore di diluizione (900 per l'estratto di *Brassica*) si può risalire alla concentrazione di $\mu\text{M TXEq}$ del campione di estratto tal quale dalla seguente formula:

$$\mu\text{M TXEq campione} = \mu\text{M TXEq campione diluito} * \text{fattore diluizione}$$

Nel caso in cui l'unità di misura della concentrazione non sia appropriata si provvede a modificarla tramite equivalenza:

$$\text{mM TXEq campione} = \mu\text{M TXEq campione} / 1000$$

Il contenuto in TXEq è stato quindi riferito ai g di foglie secche di *Brassica* tenendo conto della quantità di foglie estratte (2.0 g) e del solvente utilizzato per l'estrazione (20 ml).

$$\text{mmol TXEq/g } Brassica = \text{mM TXEq} * 20 \text{ ml} / (2 \text{ g} * 1000 \text{ ml/l})$$

Il contenuto in TXEq è stato quindi riferito al peso secco della pianta tenendo conto della quantità pianta estratta (2.0 g) e del solvente utilizzato per l'estrazione (20 ml).

$$\text{mmol TXEq/ g DW} = \text{mM TXEq} * 0.020 \text{ l} / 2.0 \text{ g}$$

Il test è stato ripetuto tre volte in quadruplica su tre estrazioni dello stesso campione (n = 9). I dati sono stati elaborati e dopo aver scartato i dati anomali, sono state calcolate le medie e le deviazioni standard riferite ad ogni campione.

4.3 Test ABTS

Per la determinazione del potere antiossidante con un metodo indiretto è stato effettuato il test ABTS che sfrutta la capacità degli antiossidanti di decolorare una soluzione del radicale catione ABTS•+

4.3.1 Materiali

- Estratti di *Brassica* congelati
- ABTS (MW = 548.68 g/mol)
- Persolfato di potassio K₂S₂O₈
- Boccetto da 5 ml
- Beute
- Pipette
- Eppendorf
- Soluzione Trolox 18 mM (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)
- Piastra 96 pozzetti trasparente
- Vortex
- Pipetta multicanale
- Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader Biotek (Multiplates)

4.3.2 Preparazione reagenti

4.3.2.1 K₂S₂O₈ 24.5 mM

Per la preparazione della soluzione K₂S₂O₈ 24,5 mM, si pesano accuratamente 0.00662 g di K₂S₂O₈ per 1 ml di acqua deionizzata in eppendorf da 1.5 ml, aggiustando il volume in base alla pesata, successivamente vortexare.

4.3.2.2 ABTS⁺⁺

Il giorno precedente all'analisi bisogna preparare una soluzione di ABTS 7 mM, sciogliendo 0.0096 g di ABTS in 2.5 ml di acqua deionizzata in boccetto da 5 ml riaggiustando il volume in base alla pesata e successivamente vortexare.

Si aggiunge quindi al boccetto contenente la soluzione di ABTS appena preparata, la quantità opportuna di soluzione di K₂S₂O₈ 24.5 mM considerando il rapporto 0.9:0.1 e vortexare. Infine si lascia al buio a temperatura ambiente per una notte affinché si produca il radicale catione (RCStock).

Il giorno dell'analisi si prepara la soluzione di ABTS⁺⁺ diluita (RCDil) aggiungendo a 0.5 ml di soluzione concentrata (RCStock), 30 ml di acqua distillata in una beuta da 50 ml verificando che la soluzione abbia un'assorbanza a 734 nm contro il bianco circa uguale a 0.8.

4.3.3 Analisi

Per l'analisi i campioni vengono diluiti 15 volte aggiungendo ad una eppendorf contenente 1400 µl di acqua, 100 µl di ogni estratto. L'operazione è stata ripetuta per ogni estrazione di ogni campione di *Brassica*.

Sono state quindi preparate delle soluzioni diluite di Trolox partendo da una soluzione di Trolox 1.8 mM preparata diluendo la soluzione stock 18 mM (100ul) in acqua deionizzata (900 ul), seguendo lo schema riportato nella tabella 4-2 seguente:

Tabella 4-2 Preparazione soluzioni diluite di Trolox per ABTS

	[TX]1.8 mM (ul)	H ₂ O (ul)	[TX] dil (mM)	[TX] dil (µl)	Pozzetto (ul)	[TX] _{Pozzetto} (µM)
S1	10	1500	0.01	30	300	1.19
S2	20	1500	0.02	30	300	2.37
S3	50	1500	0.06	30	300	5.81
S4	70	1000	0.12	30	300	11.78
S5	130	1000	0.21	30	300	20.71
S6	200	1000	0.30	30	300	30.00

Per l'analisi è stata utilizzata una piastra a 96 pozzetti trasparente. Per la preparazione della piastra di lettura vengono introdotti, uno in ogni pozzetto, 30 ul degli estratti di *Brassica* diluiti 15x, delle soluzioni diluite di Trolox e di acqua deionizzata (controllo), tutto in quadruplica. Nei pozzetti della piastra sono stati quindi aggiunti 270 ul di soluzione di ABTS⁺⁺ diluita;

infine in un pozzetto sono stati introdotti solamente 300 ul di acqua distillata (bianco). La piastra è stata lasciata 2h ore al buio e successivamente dopo agitazione, si esegue la lettura a 734 nm contro il bianco (fig.4-6)



Figura 4-6 Piastra con test ABTS.

4.3.4 Elaborazione dati

In questo saggio si osserva una decolorazione della soluzione campione in modo proporzionale alla capacità antiossidante che viene quindi espressa come percentuale di inibizione a 734 nm.

La percentuale d'inibizione è calcolata con la seguente formula:

$$\% \text{ Inibizione } A_{734} = (1 - A_C / A_0) \times 100$$

dove A_C è l'assorbanza del campione a 734 nm e A_0 è l'assorbanza della soluzione controllo (acqua al posto del campione) sempre a 734 nm.

Con i valori di % inibizione a 734 nm ottenuti per le soluzioni contenenti le diverse concentrazioni di Standard è stata costruita una retta di taratura la cui pendenza ci ha permesso di attribuire ad ognuno dei campioni analizzati una concentrazione in Trolox Equivalente (TXEq). Per la costruzione di tale retta sono stati messi in grafico in ascissa i valori di % d'inibizione ($x = \% \text{ In } A_{734}$) ed in ordinata i valori della concentrazione di Trolox nei pozzetti ($y = \mu\text{M TXEq}$) (fig.4-7).

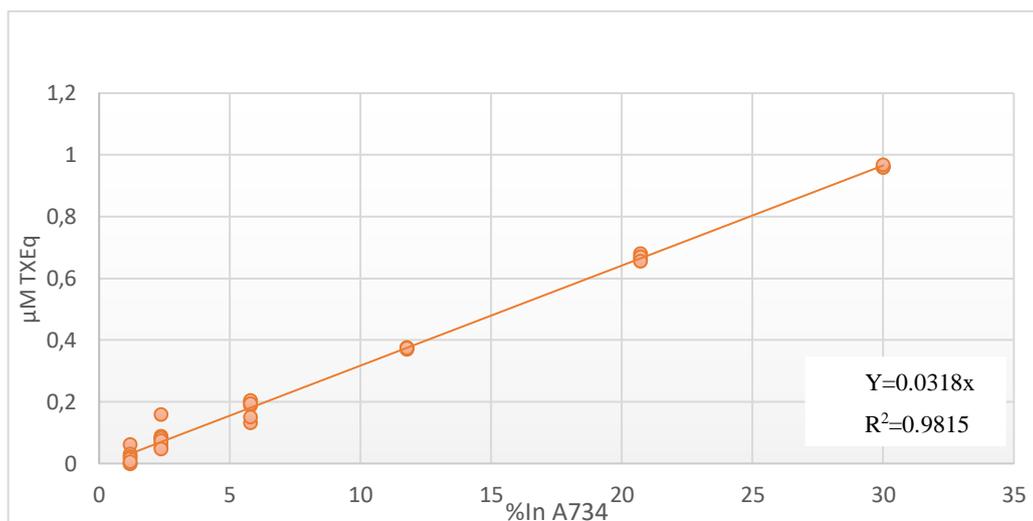


Figura 4-7 Retta taratura test ABTS.

A questo punto, trovata la pendenza della retta che meglio interpola i punti (STAT) è possibile ricavare la concentrazione di TXEq nei pozzetti in cui sono stati introdotti i campioni diluiti di *Brassica* da analizzare con la seguente equazione:

$$\mu\text{M TXEq pozzetto} = \text{STAT} * \% \ln A_{734}$$

Quindi, utilizzando la formula:

$$C_i * V_i = C_f * V_f$$

dove:

C_i è la concentrazione $\mu\text{M TXEq}$ del campione diluito di *Brassica* analizzato;

V_i è il volume del campione diluito di *Brassica* analizzato aggiunto nel pozzetto (30 μl);

C_f è la concentrazione $\mu\text{M TXEq}$ nel pozzetto;

V_f è il volume di soluzione contenuta nel pozzetto (300 μl),

possiamo quindi risalire alla concentrazione $\mu\text{M TXEq}$ del campione diluito di *Brassica* analizzato:

$$C_i = \mu\text{M TXEq campione diluito} = \mu\text{M TXEq nel pozzetto} * 300 \mu\text{l} / 30 \mu\text{l}$$

Utilizzando il fattore di diluizione (15 per l'estratto di *Brassica*) si può risalire alla concentrazione di $\mu\text{M TXEq}$ del campione di *Brassica* tal quale dalla seguente formula:

$$\mu\text{M TXEq campione} = \mu\text{M TXEq campione diluito} * \text{fattore diluizione}$$

Nel caso in cui l'unità di misura della concentrazione non sia appropriata si provvede a modificarla tramite equivalenza: $\text{mM TXEq campione} = \mu\text{M TXEq campione} / 1000$

Il contenuto in TXEq è stato quindi riferito ai g di foglie secche di *Brassica* tenendo conto della quantità di foglie estratte (2.0 g) e del solvente utilizzato per l'estrazione (20 ml).

$$\text{mmol TXEq/g } Brassica = \text{mM TXEq} * 20 \text{ ml} / (2 \text{ g} * 1000 \text{ ml/l})$$

Il contenuto in TXEq è stato quindi riferito al peso secco della pianta tenendo conto della quantità pianta estratta (2.0 g) e del solvente utilizzato per l'estrazione (20 ml).

$$\text{mmol TXEq/ g DW} = \text{mM TXEq} * 0.020 \text{ l} / 2.0 \text{ g}$$

Il test è stato ripetuto tre volte in quadruplica su tre estrazioni dello stesso campione (n=9). I dati sono stati rielaborati e dopo aver scartato i dati anomali; sono state calcolate le medie e le deviazioni standard riferite ad ogni campione.

4.3.5 Metodo Folin- Ciocalteu

Per la determinazione del contenuto totale in polifenoli nei campioni di *Brassica* viene utilizzato il reagente Folin- Ciocalteu

4.3.6 Materiali

- Estratti di cavolo congelati
- Acido Gallico 60 mM in etanolo
- Reattivo di Folin (FCR)
- Carbonato di sodio al 10% P/P
- Acqua ultrapura
- Eppendorf 1.5 ml e 2.0 ml
- Piastra 96 pozzetti
- Pipette
- Pipetta multicanale
- Vortex
- Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader Biotek (Multiplates)

4.3.7 Preparazione reagenti

4.3.7.1 Acido Gallico 60 mM in etanolo

Per preparare la soluzione di Acido Gallico 60 mM, si pesano accuratamente circa 0.112878 g di Acido Gallico per 10 ml di etanolo e riaggiustando il volume in base alla pesata. La soluzione viene porzionata e congelata.

4.3.7.2 Na₂CO₃ al 10% P/P

Per preparare il Carbonato di sodio al 10% P/P si pesano 20 g di Na₂CO₃ e si aggiungono 180 ml di acqua deionizzata agitando. La soluzione viene conservata a temperatura ambiente.

4.3.8 Analisi

Per l'analisi i campioni vengono diluiti 15 volte aggiungendo alle eppendorf contenente 1400 μ l di acqua 100 μ l di ogni estratto. L'operazione è stata ripetuta per ogni estrazione di ogni campione di *Brassica*.

Vengono quindi preparate le soluzioni diluite di Acido Gallico partendo da una soluzione Acido Gallico 6 mM preparata diluendo una soluzione stock 60 mM (100 μ l) in acqua ultrapura (900 μ l) e proseguendo con le diluizioni secondo la seguente tabella 4-3:

Tabella 4-3 Preparazione soluzioni diluite di Acido Gallico per test Folin.

	GA 6Mm (μ l)	H ₂ O (μ l)	[GA] dil (mM)	[GA] dil (μ l)	Pozzetto (μ l)	[GA _{Pozzetto}] (μ M)
S1	10	1500	0.04	50	300	6.62
S2	25	1500	0.10	50	300	16.39
S3	45	1500	0.17	50	300	29.13
S4	650	1000	0.37	50	300	61.03
S5	90	1000	0.50	50	300	82.57
S6	120	1000	0.64	50	300	107.14

È stata quindi preparata la soluzione diluita di Folin aggiungendo 2.0 ml di Reattivo a 18.0 ml di acqua distillata (riproporzionando in base alle necessità).

Per l'analisi è stata utilizzata una piastra a 96 pozzetti trasparente; per la preparazione della piastra di lettura vengono introdotti 50 μ l degli estratti di *Brassica* diluiti 15x, delle soluzioni diluite di Acido Gallico e di acqua ultrapura (bianco) tutto in quadruplica. Nei pozzetti della piastra sono stati quindi aggiunti 150 μ l di reattivo di Folin diluito. La piastra è stata agitata con il Biotek e lasciata 10 minuti al buio. Quindi ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 μ l di Na₂CO₃ 10% e la piastra è stata lasciata 2 h al buio; successivamente dopo agitazione, è stata eseguita la lettura a 760 nm contro il bianco (fig.4-8).

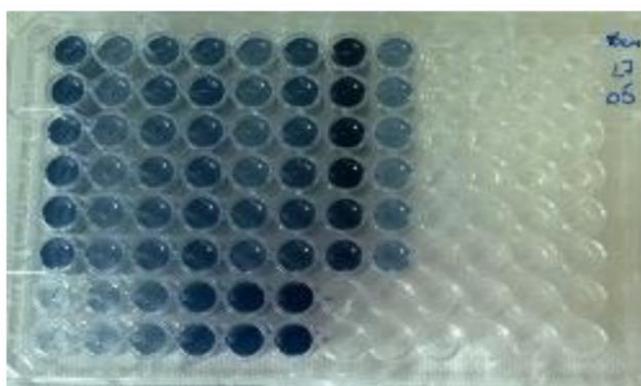


Figura 4-8 Piastra con test Folin- Ciocalteu

4.3.9 Elaborazione dati

Con i valori di assorbanza ottenuti attraverso la lettura spettrofotometrica a 760 nm, delle soluzioni contenenti le diverse concentrazioni di Standard è stata costruita una retta di taratura la cui pendenza (STAT) ci ha permesso di attribuire ad ognuno dei campioni analizzati una concentrazione in Acido Gallico Equivalente (GAEq). Per la costruzione di tale retta sono stati messi in grafico in ascissa i valori di assorbanza ($x=A_{760}$) ed in ordinata i valori della concentrazione di acido gallico nei pozzetti ($y=\mu\text{M GAEq}$) (fig.4-9).

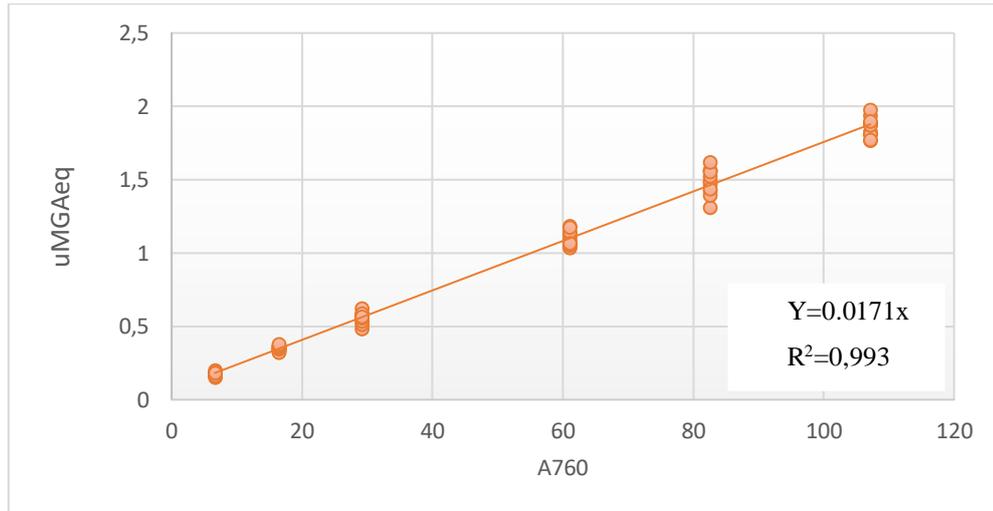


Figura 4-9 Retta taratura test Folin- Ciocalteu

A questo punto, trovata la pendenza della retta che meglio interpola i punti (STAT) è possibile ricavare la concentrazione di GAEq nei pozzetti in cui sono stati introdotti i campioni diluiti di estratto da analizzare, i valori ottenuti sono riportati nella tabella seguente:

È stato possibile calcolare la seguente equazione:

$$\mu\text{M GAEq pozzetto} = \text{STAT} * A_{760}$$

Quindi, utilizzando la formula:

$$C_i * V_i = C_f * V_f$$

dove:

C_i è la concentrazione $\mu\text{M GAEq}$ del campione diluito di succo analizzato

V_i è il volume del campione diluito di succo analizzato aggiunto nel pozzetto (50 μl)

C_f è la concentrazione $\mu\text{M GAEq}$ nel pozzetto

V_f è il volume di soluzione contenuta nel pozzetto (300 μl),

Possiamo risalire alla concentrazione $\mu\text{M GAEq}$ del campione diluito di succo analizzato:

$$C_i = \mu\text{M GAEq campione diluito} = \mu\text{M GAEq nel pozzetto} * 300 \mu\text{l} / 50 \mu\text{l}$$

Utilizzando il fattore di diluizione degli estratti (15 per l'estratto di *Brassica*) si può risalire alla concentrazione di $\mu\text{M GAEq}$ del campione di succo tal quale dalla seguente formula:

$$\mu\text{M GAEq campione} = \mu\text{M GAEq campione diluito} * \text{fattore diluizione}$$

nel caso in cui l'unità di misura della concentrazione non sia appropriata si provvede a modificarla tramite equivalenza:

$$\text{mM GAEq campione} = \mu\text{M GAEq campione} / 1000$$

Il contenuto in TXEq è stato quindi riferito ai g di foglie secche di *Brassica* tenendo conto della quantità di foglie estratte (2.0 g) e del solvente utilizzato per l'estrazione (20 ml).

$$\text{mmol TXEq/ g } Brassica = \text{mM TXEq} * 20 \text{ ml} / (2 \text{ g} * 1000 \text{ ml/l})$$

Il contenuto in TXEq è stato quindi riferito al peso secco della pianta tenendo conto della quantità pianta estratta (2.0 g) e del solvente utilizzato per l'estrazione (20 ml).

$$\text{mmol TXEq/ g DW} = \text{mM TXEq} * 0.020 \text{ l} / 2.0 \text{ g}$$

Il test è stato ripetuto tre volte in quadruplica su tre estrazioni dello stesso campione (n=9). I dati sono stati rielaborati e dopo aver scartato i dati anomali; sono state calcolate le medie e le deviazioni standard riferite ad ogni campione.

4.4 Statistica

I dati sono stati analizzati statisticamente effettuando una analisi della varianza (ANOVA) utilizzando i softwares XLSTAT e JMP. Il test di Tukey è stato utilizzato per l'analisi post-hoc di comparazione delle medie ($p < 0.01$). Il coefficiente di correlazione di Pearson è stato calcolato per comparare i risultati dei diversi test.

Capitolo 5 RISULTATI

I dati ottenuti dall'analisi dell'attività antiossidante dei diversi estratti di *Brassica* effettuati mediante i tre diversi test hanno dato dei risultati consistenti sia per quanto riguarda la correlazione tra i diversi test che per quanto riguarda le differenze tra le diverse specie di *Brassica*.

Nei grafici mostrati sotto sono riportati tali risultati dai quali si evince chiaramente come le diverse specie abbiano un diverso contenuto di antiossidanti mentre i due campioni della stessa specie selvatica (Cavolo Selvatico) mostrano risultati simili indipendenti quindi sia dal luogo che dal periodo di raccolta.

Dai grafici si evince inoltre che gli estratti di Cavolo Selvatico possiedono un elevato potere antiossidante comparabile a quello della Cima di Rapa.

Il confronto mostra inoltre che il Cavolo Cappuccio rivela una attività di gran lunga inferiore di quest'ultima.

5.1 Risultati ORAC

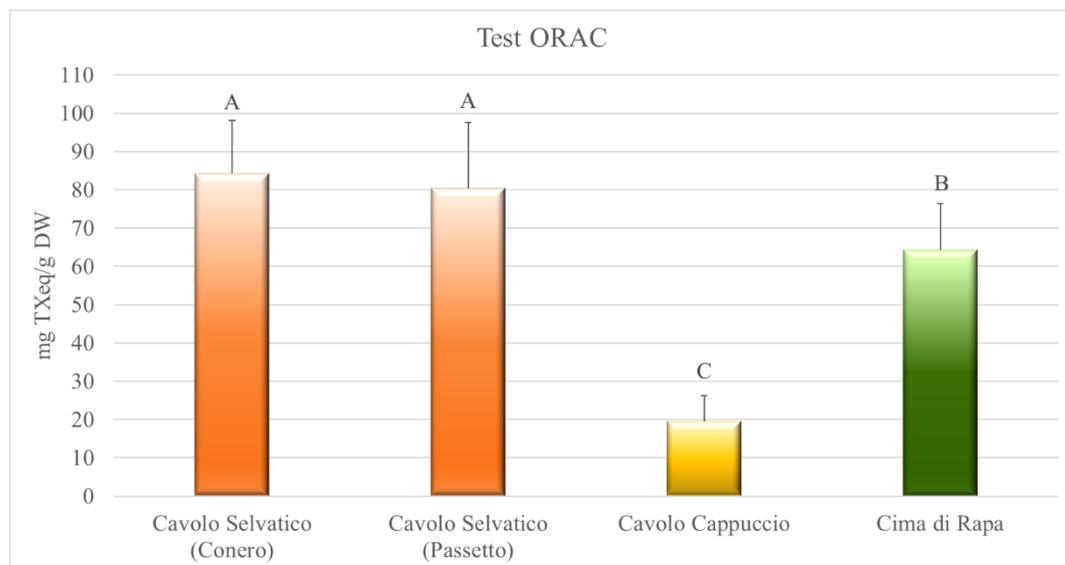


Figura 5-1 Risultati test ORAC.

Andando un po' più in dettaglio ed analizzando separatamente i risultati ottenuti dai diversi test troviamo che i diversi estratti testati con il saggio ORAC (fig.5-1) mostrano differenze significative sia tra il Cavolo Selvatico e il Cavolo Cappuccio ma anche rispetto alla Cima di Rapa.

Non si hanno invece differenze significative tra i due campioni di Cavolo Selvatico.

5.2 Risultati ABTS

Per quanto riguarda i risultati ottenuti nel test ABTS e mostrati nella fig.5-2 possiamo notare che anche qui l'attività antiossidante risulta più elevata negli estratti di Cavolo Selvatico ma le differenze sono minori e non si hanno differenze significative tra il Cavolo Selvatico e la Cima di Rapa.

Anche in questo caso i due campioni di Cavolo Selvatico danno risultati significativamente non differenti.

Un'altra cosa che si può notare dal grafico è che con questo test si ottengono deviazioni standard molto più basse e questo è dovuto al fatto che il test è molto più riproducibile del test ORAC.

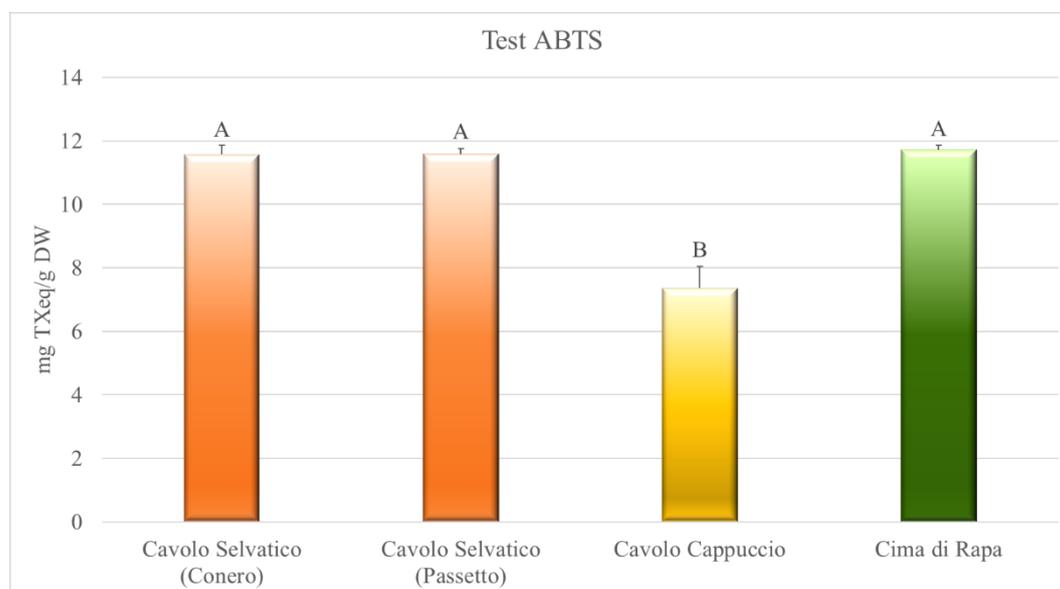


Figura 5-2 Risultati test ABTS.

5.3 Risultati Folin- Ciocalteu

I risultati ottenuti dalla misura del contenuto totale di polifenoli valutato con il Test Folin-Ciocalteu (fig.5-3) sono simili a quelli ottenuti con il test ABTS. Infatti, anche in questo caso i due campioni di Cavolo Selvatico hanno portato a risultati simili tra loro e comparabili a quelli ottenuti dal campione di Cima di Rapa. Anche per quanto riguarda il contenuto totale di polifenoli il campione di Cavolo Cappuccio ha mostrato un contenuto nettamente minore.

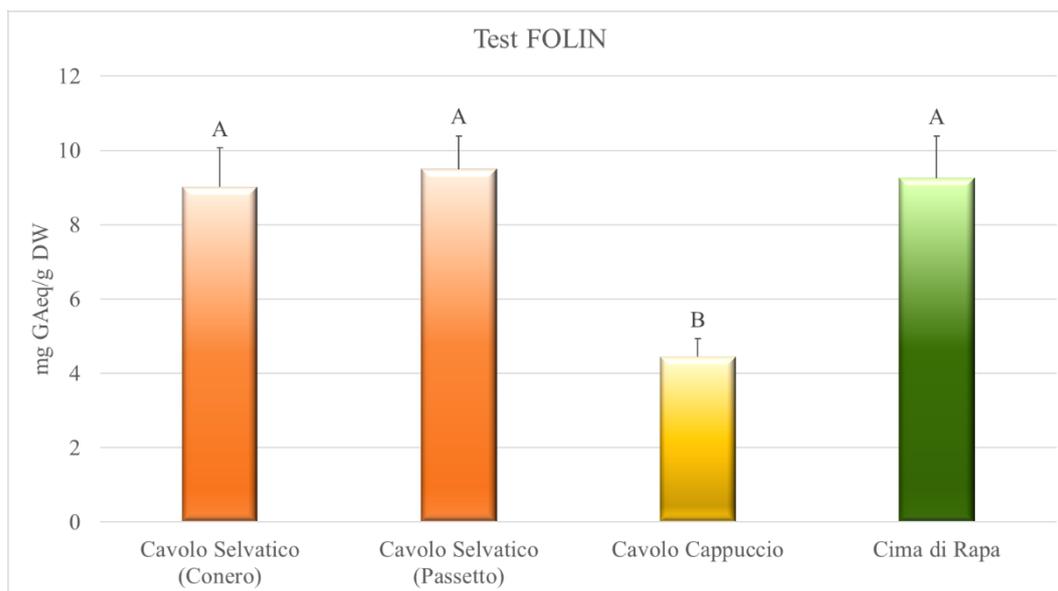


Figura 5-3 Risultati test Folin- Ciocalteu

5.4 Correlazione tra test

La correlazione tra i diversi test è stata saggiata calcolando l'indice di Pearson (tabella 5-1); il risultato ottenuto mostra come la correlazione sia buona tra tutti i test ma sia significativa solamente tra i test FOLIN e ABTS.

Tabella 5-1 Coefficienti di correlazione di Pearson e significatività

Variabile	Coefficiente di correlazione			p-values		
	FOLIN	ORAC	ABTS	FOLIN	ORAC	ABTS
FOLIN	1	0.950	0.997	0	0.050	0.003
ORAC	0.950	1	0.948	0.050	0	0.052
ABTS	0.997	0.948	1	0.003	0.052	0

I valori in neretto sono significativi ($p < 0.01$)

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti hanno mostrato una netta differenza per quanto riguarda il contenuto antiossidante a favore del Cavolo Selvatico rispetto al Cavolo Cappuccio mentre è stata trovata una differenza molto piccola ed evidenziata solo da uno dei metodi utilizzati tra il Cavolo Selvatico e la Cima di Rapa, in ogni caso a favore del Cavolo Selvatico.

Tali risultati possono essere considerati solamente preliminari in quanto sono stati analizzati solo un numero limitato di campioni e non è possibile quindi asserire con sicurezza che le piccole differenze osservate tra il Cavolo selvatico e la Cima di Rapa non siano dovute a fattori diversi dalla specie e dal tipo di coltivazione come le differenze geografiche o climatiche.

Per quanto riguarda le grandi differenze riscontrate tra il Cavolo Selvatico e il Cavolo Cappuccio queste potrebbero anche essere attribuibili ai composti colorati che sono prevalenti nel cavolo Selvatico come confermato anche dalle piccole differenze con la Cima di Rapa.

Dai risultati invece si evince chiaramente come i due campioni della stessa specie selvatica (Cavolo Selvatico) mostrano risultati simili indipendenti quindi sia dal luogo che dal periodo di raccolta.

Il lavoro comunque attesta anche se solo in maniera parziale e preliminare come il Cavolo Selvatico contenga una buona quantità di composti antiossidanti, comparabile se non superiore a quella di altre specie coltivate utilizzate quotidianamente per la dieta.

BIBLIOGRAFIA

- Akdaş Zelal Zuhail, Bakkalbaşı Emre. «Influence of different cooking methods on color, bioactive compounds, and antioxidant activity of kale.» *International Journal of Food Properties* 20, n. 4 (2016): 877-887.
- Akhlaghi, M. & Bandy, B. «Dietary Broccoli Sprouts Protect Against Myocardial Oxidative Damage and Cell Death During Ischemia-Reperfusion.» *Plant Foods Hum Nutr* 65 (2010): 193-199.
- Al-Shehbaz, I. A. «A generic and tribal synopsis of the Brassicaceae (Cruciferae).» *Taxon* 61, n. 5 (2012): 931-954.
- Anwar, F., Kalsoom, U., Sultana, B., Mushtaq, M., Mehmood, T. and Arshad, H.A. «Effect of drying method and extraction solvent on the total phenolics and antioxidant activity of cauliflower (*Brassica oleracea* L.) extracts.» *International Food Research Journal* 20, n. 2 (2012): 653-659.
- Avato, P., Argentieri, M.P. «Brassicaceae: a rich source of health improving phytochemicals.» *Phytochem Rev* 14 (2015): 1019-1033.
- Biondi, Edoardo, Luca Gubellini, M. Pinzi and Simona Casavecchia. «The vascular flora of Conero Regional Nature Park (Marche, Centre Italy).» *Fl. Medit.* 22 (2012): 67-167.
- Campus, G., Montevecchi G. «Radicali Liberi e Capacità Antiossidante, ORAC, metodologia e livelli in natura.» *Pubblifit*, 2007.
- Conti, F., Abbate, G., Alessandrini, A. & Blasi, C. (eds). *An annotated checklist of the Italian vascular flora*. Roma: Palombi Editori, 2005.
- Draper Munt, D., Branca, F. & Donnini, D. «*Brassica montana*. The IUCN Red List of Threatened Species 2011.» *IUCN*. 2011. <https://www.iucnredlist.org/species/170107/6716308>.
- Hadjichambis, A. CH, Paraskeva-Hadjichambi, D. et al. «Wild and semi-domesticated food plan consumption in seven circum-Mediterranean areas.» *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 59, n. 5 (2008): 383-414.

- Khan, S., Ur-Rehman, T., Mirza, B. et al. «Antioxidant, Antimicrobial, Cytotoxic and Protein Kinase Inhibition Activities of Fifteen Traditional Medicinal Plants From Pakistan.» *Pharmaceutical Chemistry Journal* 51, n. 5 (2017): 391–398.
- Leonti, M., Nebel, S., Rivera, D. et al. «Wild Gathered Food Plants in the European Mediterranean: a comparative analysis.» *Econ Bot* 60, n. 2 (2006): 130-142.
- Maggioni, Lorenzo. *Domestication of Brassica oleracea L.* Tesi di Dottorato, Alnarp: Swedish University of Agricultural Science, 2015.
- Melega, Simone. «Studio degli effetti funzionali e tossici di derivati di Brassicaceae in modelli sperimentali.» Tesi di Dottorato, Bologna, 2013.
- Naturamediterraneo Il portale della natura.* s.d. www.naturamediterraneo.com.
- Pellegrini, N., Re, R., Yang, M., Rice-Evans, C. «Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid radical cation decolorization assay.» *Methods in Enzymology* 299 (1999): 379-389.
- 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* 26 (1999): 1231-1237.
- Shahidi F., Zhong, Y. «Measurement of antioxidant activity.» *Journal of Functional Foods* 18 (2015): 757-781.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M., Lester. «Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folinciocalteu reagent.» *Methods Enzymol* 299 (1999): 152-178.
- <http://dryades.units.it/floritaly/>.