



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in
Biologia Molecolare e Applicata

**STUDIO DI BIODISPONIBILITA' DI ISOTIOCIANATI ED ALTRI COMPOSTI
BIOATTIVI PRESENTI NELLA *Brassica oleracea var. italica*.
ALIMENTO FUNZIONALE O INTEGRATORE ALIMENTARE?**

**BIOAVAILABILITY STUDY OF ISOTHIOCYANATES AND OTHER BIOACTIVE
COMPOUNDS IN *Brassica oleracea var. italica*.
FUNCTIONAL FOOD OR DIETARY SUPPLEMENT?**

Tesi di Laurea Magistrale
di: Lucia Ramaccini

Relatore:
Chiar.mo Prof. Rosamaria Fiorini

Correlatore:
Patrick Orlando

Sessione autunnale (Ottobre 2020)

Anno Accademico 2019/2020

Sommario

1.INTRODUZIONE	4
1.1 Gli alimenti funzionali.....	4
1.2 I fitochimici	8
1.3 Brassica oleracea var. italica.....	10
1.3.1 Glucosinolati e isotiocianati nel broccolo: il sulforafano.....	12
1.3.2 Biodisponibilità, digestione, metabolismo e assorbimento dei glucosinolati e isotiocianati.....	16
1.3.3 Vitamina K ₁ nel broccolo	20
1.3.4 Biodisponibilità, digestione, metabolismo e assorbimento della vitamina K.....	24
1.3.5 Carotenoidi nel broccolo	27
1.3.6 Biodisponibilità, digestione, metabolismo e assorbimento dei carotenoidi	33
1.4 Gli integratori alimentari.....	37
1.4.1 Alimenti funzionali o integratori alimentari?	39
2. SCOPO DELLA TESI	44
3.MATERIALI E METODI	45
3.1 Disegno sperimentale.....	45
3.1.1 Protocollo sperimentale.....	45
3.1.2 Partecipanti.....	47
3.1.3 Caratteristiche dell'integratore BroccoMax®.....	47
3.1.4 Campionamento del mini broccolo briot.....	48
3.1.5 Trattamenti termici	50

3.1.6	<i>Modalità di somministrazione dell'integratore e dei broccoli.....</i>	51
3.1.7	<i>Preparazione e stoccaggio dei campioni plasmatici.....</i>	52
3.2	<i>Determinazioni analitiche.....</i>	53
3.2.1	<i>Analisi cromatografica</i>	53
3.2.2	<i>Quantificazione degli isotiocianati.....</i>	54
3.2.3	<i>Quantificazione della Vitamina K₁.....</i>	57
3.2.4	<i>Quantificazione dei carotenoidi.....</i>	58
3.3	<i>Reagenti.....</i>	60
3.3.1	<i>Standard K₁.....</i>	60
3.3.2	<i>Standard isotiocianati.....</i>	60
3.3.3	<i>Analisi statistica.....</i>	61
4	RISULTATI	62
4.1	<i>Livelli di ITCs, luteina, β-carotene e vitamina K₁ nel mini broccolo briot.....</i>	62
4.1.1	<i>Valutazione dell'attività enzimatica in seguito ai trattamenti del mini broccolo briot.....</i>	62
4.1.2	<i>Livello degli isotiocianati nel mini broccolo briot</i>	64
4.1.3	<i>Livello di vitamina K₁ nel mini broccolo briot</i>	66
4.1.4	<i>Livello dei carotenoidi nel mini broccolo briot.....</i>	67
4.2	<i>Biodisponibilità plasmatica di ITCs, luteina, beta-carotene e vitamina K₁.....</i>	68
4.2.1	<i>Biodisponibilità plasmatica di isotiocianati.....</i>	68
4.2.2	<i>Biodisponibilità plasmatica di vit. K₁.....</i>	70
4.2.3	<i>Biodisponibilità plasmatica di β-carotene e luteina.....</i>	71
5	DISCUSSIONE.....	74
6	CONCLUSIONI.....	85

7 BIBLIOGRAFIA.....	87
7 SITOGRAFIA.....	105

1.INTRODUZIONE

1.1 Gli alimenti funzionali

La relazione esistente tra una sana alimentazione ed il benessere dell'uomo è nota fin dai tempi antichi, al punto che veniva considerata una cura più potente della chirurgia: civiltà quali egizi e greci attribuivano infatti agli alimenti virtù quasi medicamentose. Diversi testi risalenti ai secoli Avanti Cristo testimoniano già all'epoca l'importanza della nutrizione e le proprietà salutistiche di alcuni cibi: dal papiro di Ebers (regno di Amenhotep I, 1536 a.c), a documentare l'utilizzo di erbe come rimedio per i disturbi più vari (anice, zafferano, cannella, cassia), al trattato "Antica Medicina" di Ippocrate, nel quale fu introdotto il principio "Il cibo sia la tua medicina, che la medicina sia il tuo cibo"(1-3). Nonostante ciò, solamente negli ultimi decenni è emerso il ruolo cruciale che una dieta equilibrata e variegata svolge non solo nel mantenimento di un buono stato di salute ma soprattutto nella prevenzione di patologie più o meno gravi, comprese quelle di natura cronico-degenerativa. Infatti è noto come il tasso di incidenza di alcune malattie vari in maniera significativa nelle diverse aree geografiche in funzione delle abitudini alimentari seguite dalla specifica popolazione. A questo proposito numerosi

studi hanno evidenziato una ridotta incidenza di ictus e patologie cardiovascolari nelle popolazioni che si affacciano sul bacino del mediterraneo, motivo per il quale la cosiddetta “dieta mediterranea” è stata riconosciuta nel 2010 un patrimonio immateriale dell’UNESCO (a). Tra gli alimenti distintivi di cui essa si compone, la frutta, la verdura e le fibre si sono rivelate tra i più importanti in quanto un loro consumo quotidiano è in grado di prevenire e diminuire la comparsa di malattie cardiovascolari (CVDs), dell’obesità e del diabete (4).

A sottolineare l’importanza che alcuni alimenti ricoprono nell’ambito della salute umana, nel 1984 in Giappone venne introdotto il termine “*Functional food*” (o *alimenti funzionali*) il quale include tutti gli alimenti che possiedono proprietà fisiologiche e nutrizionali, definiti in seguito FOSHU (*Foods For Specified Health Use*) e regolamentati dal Ministero della Salute e dal Welfare giapponese (5). Oggigiorno, infatti, il concetto di alimento non è più limitato alla sua funzione primaria volta a sopperire le richieste dell’organismo di energia chimica e di materiale plastico, ma si espande anche alla sua capacità di generare una sensazione di benessere e di promuovere la salute dell’individuo, come nel caso degli alimenti funzionali (6). Malgrado non esista una loro definizione universalmente condivisa, il Functional Food Center, con sede a Dallas, ne propone una riassuntiva, modificata in seguito

alla conferenza internazionale del 2014 organizzata dall' USDA(U.S. Department of Agriculture) e dall'ARS (Agricultural Research Service): “alimenti naturali o trasformati che contengono composti biologicamente attivi noti o sconosciuti, che in quantità definite ed efficaci, non tossiche, forniscono un beneficio clinicamente provato e documentato alla salute per la prevenzione, la gestione o il trattamento delle malattie croniche”. Appare evidente che un functional food debba essere un costituente convenzionale della dieta abituale, sia esso un prodotto naturale o trasformato; vengono quindi escluse pillole e capsule che rientrano invece nella categoria degli “integratori”(3).I composti bioattivi, presenti nei functional food in concentrazioni sufficienti e non tossiche, sono quelli per cui è stato scientificamente dimostrato da studi *in vivo* la loro capacità di promuovere la salute o di ridurre il rischio di malattie nell'uomo come ad esempio minerali, vitamine, antiossidanti, probiotici e prebiotici, ecc.. Frutta e verdura costituiscono i classici esempi di alimenti funzionali, che contengono naturalmente una o più molecole bioattive: ad esempio l' α e il β -carotene ed il licopene in carote e pomodori fungono da quenchers per l'ossigeno singoletto e prevengono la formazione dei radicali liberi; i polifenoli del tè verde e del vino rosso sono in grado di chelare i metalli, presentano attività antitumorale e modulano la perdita di peso (7). Componenti fisiologicamente attive

provengono anche da fonti o derivati animali: si pensi al calcio o ai probiotici dei latticini o agli acidi grassi polinsaturi PUFA del pesce (4). Alla vasta categoria dei functional food appartengono anche prodotti che durante le fasi di lavorazione subiscono l'aggiunta di una molecola bioattiva non presente originariamente o prodotti in cui ne viene incrementata la quantità perché presente in tracce. Grazie all'ingegneria genetica, al breeding o processi come la fortificazione è possibile ottenere ad esempio yoghurt con livelli più elevati di prebiotici, uova fortificate con acidi grassi omega-3, succo all'arancia con l'aggiunta di calcio. Al momento in Europa, contrariamente ad altre nazioni, non è presente una legislazione specifica, anche se sono stati individuati due claims (ossia proprietà nutrizionali e/o salutistiche) da poter apporre al prodotto, proposti dalla FUFOS (European Commission Concerted Action on Functional Food Science in Europe):

A) claim nutrizionale o di tipo A: alimenti che sono in grado di migliorare una specifica funzione fisiologica, biologica o psicologica senza nessun riferimento ad attività verso malattie.

B) claim salutistico o di tipo B: destinato ad alimenti con capacità di prevenzione, gestione o cura nei confronti di una specifica patologia.

Inoltre è stato istituito da parte dell'Unione Europea un nuovo programma che mira a risolvere i problemi in corso di convalida del prodotto e a stabilire i

criteri comuni per valutare la fondatezza scientifica delle indicazioni sulla salute: il “Process for the Assessment of Scientific Support for Claims of Foods” (PASSCLAIM) (b). Il crescente interesse del consumatore, che presta sempre più attenzione all’etichetta di ciò che porta in tavola e la presa di coscienza dell’importanza della nutrizione, hanno causato un vero e proprio “boom” del mercato dei functional food che non sembra destinato ad arrestarsi (7).

1.2 I fitochimici

Alcune molecole biologicamente attive, che rendono un functional food tale, sono i fitochimici, sostanze ingerite giornalmente dall’uomo, anche in quantitativi importanti (g), perché contenute nella frutta, nella verdura e nel grano (dal greco *phyto*, chimica delle piante) (8,9). Nonostante siano dei bioattivi non nutrienti, i fitochimici sono in grado di mantenere lo stato di salute dell’organismo: la prevenzione del cancro, delle CVDs, la riduzione dell’incidenza di tumori e del colesterolo sono solo alcune delle funzioni che si ipotizza possano avere(4). Circa 5000 fitochimici sono stati isolati e raggruppati nelle seguenti categorie: fenoli, alcaloidi, composti contenenti azoto, organosolfuri, fitosteroli e carotenoidi (**Figura 1**). Tra gli organosolfuri vi sono isotiocianati (ITCs) e gli indoli i cui precursori, i glucosinolati

(GLS), caratterizzano la famiglia delle *Brassicaceae*. Appare evidente che una stessa matrice alimentare possa contenere uno o più fitochimici appartenenti o meno alla stessa categoria, quindi queste sostanze lavorano in sinergia, rendendo la matrice multifunzionale (10).

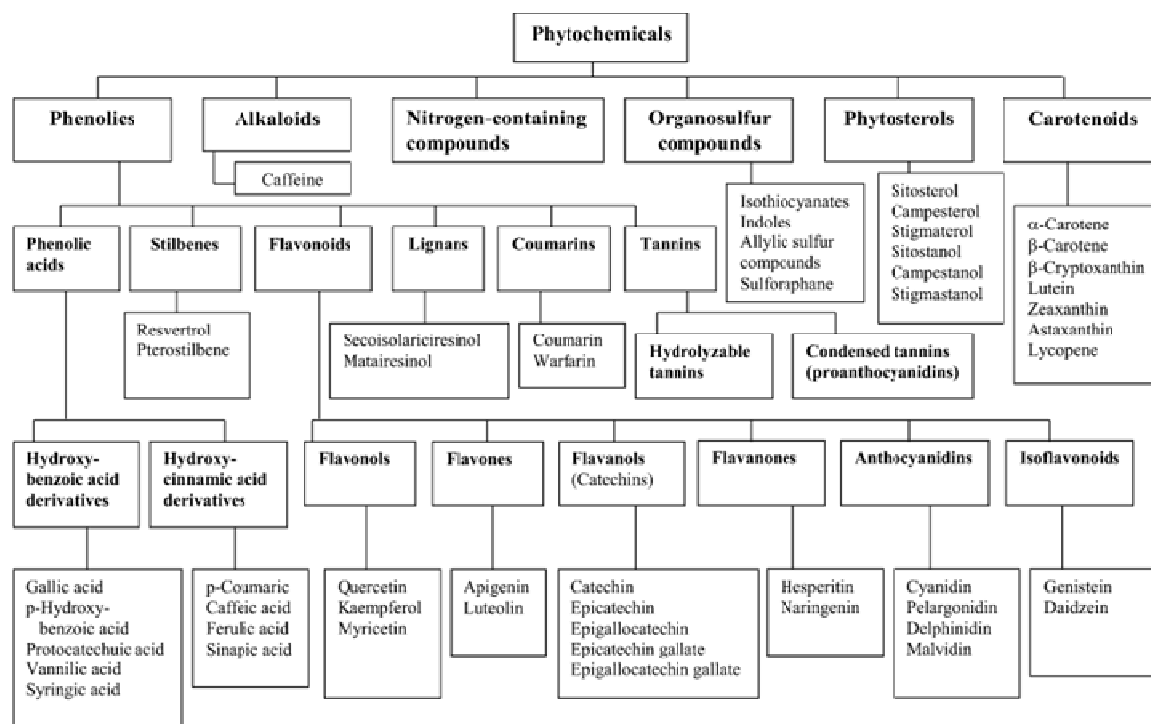


Figura 1 Classificazione dei fitochimici alimentari (10).

1.3 Brassica oleracea var. italica

I broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *Italica*) appartengono alla famiglia delle *Brassicaceae* o *Cruciferae*, comprendente piante erbacee tra le più impiegate già in tempi molto antichi, viste le tracce di coltivazione risalenti ad almeno diecimila anni fa. La loro crescita caratterizza gran parte del pianeta e varie zone climatiche: l'optimum di temperatura rientra tra i 14°C e i 21°C mentre la minima e la massima temperatura sopportate sono rispettivamente di 4°C e 30°C, in base alla specie; di conseguenza le colture di *Brassicaceae* sono realizzate nelle regioni temperate, anche nella stagione fredda, nei tropici o sub-tropici, ad elevate altitudini e perfino ai poli. I 300 generi in cui è suddivisa la famiglia comprendono circa 4000 specie. Una così elevata differenziazione sia nel numero di specie, ottenute in parte tramite incroci, sia nelle regioni di produzioni si spiega grazie alla varietà d'uso: dal biofuel, agli oli edibili e biofumiganti, passando chiaramente per l'alimentazione animale ed umana (11). In riferimento a quest'ultima le *Cruciferae* hanno mostrato una significativa attività biologica: oltre ai macronutrienti quali lipidi e proteine, sono ricche di micronutrienti e costituiscono un'ottima fonte di fitochimici. La crescente attenzione, suscitata soprattutto dal genere *Brassica oleracea*, è dovuta però ai glucosinolati (GLS) e ai loro prodotti di idrolisi,

che li rendono indiscutibilmente tra gli alimenti funzionali più studiati (Figura2) (12).



Figura 2 Varianti della specie *Brassica oleracea*. Da sinistra: variante Italica, variante Botrytis, variante Capitata.

I broccoli sono originari del Bacino del Mediterraneo e durante il Medioevo furono introdotti in Europa. Oggigiorno vengono consumati in gran parte del mondo non solo per il loro sapore peculiare ma, a maggior ragione, per la quantità e qualità dei composti che presentano. Ricchi in carotenoidi, vitamine ed elementi essenziali possiedono una potente attività anticancerogena e antiossidante dovuta principalmente a metaboliti secondari quali composti fenolici, glucosinolati e loro prodotti di idrolisi, soprattutto isotiocianati. Il β -carotene, la luteina e l' α -tocoferolo sono tra i carotenoidi i più abbondanti; il selenio, la vitamina K₁ e la vitamina C (acido ascorbico) spiccano invece tra gli elementi essenziali e le vitamine, rispettivamente. I flavonoidi quercitina e campferolo contribuiscono in larga parte alla frazione dei polifenoli, alla

quale si aggiungono lignani (lariciesinolo e pinoresinolo), antociani ed acidi fenolici (caffeico e gallico), distribuiti ampiamente nelle *Brassicaceae* (11).

1.3.1 Glucosinolati e isotiocianati nel broccolo: il sulforafano

I glucosinolati (GLS) sono i fitochimici caratterizzanti la famiglia delle *Cruciferae* e i responsabili dell'odore e sapore peculiare che possiedono. Chimicamente sono formati da β -D-tioglucosio legato ad un ossima sulfonata (legame tioglucosidico) e da una catena laterale R di natura aminoacidica (**Figura3**). La struttura della catena R è molto variabile e può presentare gruppi alifatici, aromatici o indolici che non solo classificano i GLS nei tre rispettivi gruppi ma sono responsabili delle proprietà chimico-fisiche e biologiche dei loro prodotti di idrolisi tra cui isotiocianati, tiocianati e nitrili.

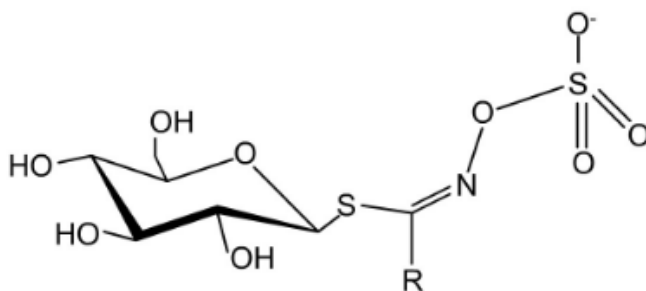
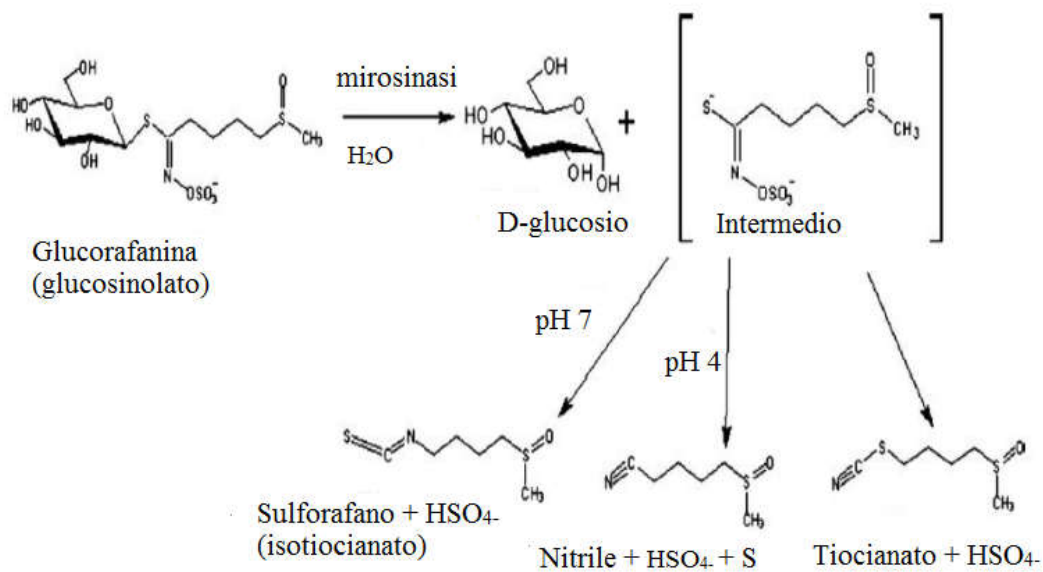


Figura 3 Struttura chimica di un generico glucosinolato.

I GLS, accumulati all'interno dei vacuoli come metaboliti secondari inattivi, fungono da meccanismo di difesa e definiti pertanto "bomba all'olio di senape"; infatti i prodotti della loro idrolisi, catalizzata dall'enzima mirosinasi (MIR), sono sostanze bioattive e tossiche per gli insetti erbivori. In condizioni normali l'enzima e i GLS sono fisicamente separati: se il tessuto vegetale viene danneggiato da parassiti, insetti o per azione meccanica la MIR è liberata dalle cellule specializzate in cui si trova, entra in contatto coi GLS e scinde il legame tioglucosidico. Il composto instabile rilasciato si stabilizza spontaneamente in un isotiocianato, o enzimaticamente in nitrile o tiocianato. Da uno stesso GLS di partenza si possono originare prodotti di idrolisi diversi, in correlazione alle condizioni di reazione e al grado di attività dell'enzima: infatti, nel caso della glucorafanina, un pH neutro promuove la sintesi di sulforafano, mentre uno acido, come quello dello stomaco, la presenza di Fe^{2+} ed il cofattore ESP (proteina epitiospecifica) favoriscono la formazione di nitrili (**Figura 4A**). Mentre il cofattore si inattiva ad una temperatura di $60^{\circ}C$, l'enzima è piuttosto stabile, ma la cottura al microonde lo degrada: in tal caso l'idrolisi è affidata alla tioglucosidasi prodotta dai batteri della microflora intestinale umana. Nel broccolo i glucosinolati più abbondanti sono quattro: due alifatici (glucorafanina e glucoiberina) e due indolici, (glucobrassicina e neoglucobrassicina) (**Figura 4B**) (13).

A



B

Glucosinolato	Struttura	Gruppo laterale R	Prodotto idrolisi
Glucorafanina		4-metilsulfinilbutil	sulforafano
Glucoiberina		3-metilsulfinilpropil	iberina
Glucobrassicina		3-indolilmetil	Indolo-3-carbinolo
Neoglucobrassicina		1-metossi-3-indolilmetil	sconosciuto

Figura 4 Idrolisi della glucorafanina da parte dell'enzima mirosinasi e possibili prodotti di idrolisi (A) e i glucosinolati più abbondanti nel broccolo (B).

Il broccolo contiene una tra le più alte concentrazioni di glucorafanina ed il suo prodotto di idrolisi, il sulforafano (SFN), è tra gli ITCs maggiormente attivo: ciò spiega perché questo ortaggio sia uno dei Functional food recentemente più studiati (14). In particolare, uno dei ruoli maggiormente studiati negli ultimi anni dei glucosinolati è legato alla potente attività anticancerogena da essi espletata tramite vie biochimiche diverse. In studi condotti sia *in vitro* che *in vivo* (nell'uomo, e negli animali), gli isotiocianati alterano il metabolismo di cancerogeni alimentari come le ammine eterocicliche e idrocarburi policiclici aromatici (IPA)(13). Inoltre, i glucosinolati hanno anche un ruolo antiossidante, anti-infiammatorio e antitrombotico, dovuti alla stimolazione di vari target molecolari tra cui il fattore di trascrizione Nrf2 (15). L'attivazione di questa via, lo stimolo degli enzimi coinvolti nelle vie di detossificazione e la capacità del SFN di fungere da "scavengers" dei radicali liberi si traducono in una riduzione dei livelli di specie radicaliche, con diminuzione delle lipoproteine a bassa densità (LDL) ossidate nel sangue (16).

Negli ultimi anni evidenze scientifiche hanno dimostrato un coinvolgimento degli ITCs nel contrastare non solo malattie neurodegenerative quali l'Alzheimer, il Parkinson e l'Huntington ma anche infezioni da *Candida Albicans* ed *Helicobacter pylori*, innescando nel fungo processi di apoptosi ed

inibendo il batterio intracellulare da una linea di cellulare umana(HEp-2)(17-19).

1.3.2 Biodisponibilità, digestione, metabolismo e assorbimento dei glucosinolati e isotiocianati

Il profilo dei GLS espresso inizialmente da una crucifera è peculiare in quanto influenzato da tanti fattori che influiscono in modo diverso tra cui la genetica e le condizioni di coltivazione. Il genotipo del broccolo ha un'influenza notevole nel contenuto di GLS nel fiore,più abbondante nell'intervallo stagionale tra agosto e gennaio, e nell'infiorescenza (testa) rispetto al gambo; il più alto livello di glucosinolati, soprattutto di glucorafanina, è però espressa nei semi e nei germogli: parti differenti della stessa pianta, analizzate in tempi diversi, mostrano profili e concentrazioni differenti (**Figura 5**). *Le Than Ninh et al* (2020) hanno proposto l'inserimento nella dieta dei germogli piuttosto che del broccolo maturo, vista l'abbondanza in GLS e il risparmio di risorse (20).



Figura 5 Semi e germogli di Brassica Oleracea var. Italica.

Le modalità di coltivazione possono altresì modificare i GLS espressi: condizioni ambientali quali $T \leq 12^{\circ}\text{C}$, aumento di radiazioni e di CO_2 atmosferica, fertilizzazione con zolfo aumentano la concentrazione di glucorafanina ed in alcuni casi di glucoiberina. Questo ortaggio risulta facilmente deperibile, di conseguenza il trasporto, la conservazione ed il packaging risultano step critici per mantenere la matrice alimentare il più inalterata possibile, preservando i GLS. Tanto più aumenta il tempo dalla raccolta e la temperatura di conservazione tanto più aumenta la perdita di GLS: trascorsi 5 giorni la glucorafanina scende del 13% se la T è di 4°C , dell'82% se le rosette del broccolo vengono conservate a 20°C . La conservazione in atmosfera controllata ed un packaging con atmosfera modificata (MAP) coadiuvano il mantenimento. Ciò che influisce maggiormente sul quantitativo di GLS e ITC che possiamo assumere con la dieta sono le lavorazioni culinarie e industriali a cui vengono sottoposti i broccoli. Mentre il taglio e la triturazione rilasciano la MIR, i GLS e modulano una sintesi *de novo* di indoli, le cotture sono estremamente deleterie in quanto degradano l'enzima vegetale, di conseguenza la possibilità di assumere ITC dipende esclusivamente dall'isoforma intestinale. I prodotti di idrolisi dei GLS, come qualsiasi fitochimico devono risultare biodisponibili per ottemperare alla propria funzione, ossia devono essere assorbiti dal corpo

e raggiungere il tessuto bersaglio nella forma attiva ed in una dose appropriata. La biodisponibilità (quantità in grado di raggiungere la circolazione sistemica) non dipende solo dalla concentrazione di partenza, sulla quale influiscono tutti i fattori visti in precedenza ma da vari altri elementi che ne influenzano la digestione, l'assorbimento, la distribuzione e l'escrezione. I GLS e gli ITCs rappresentano delle sostanze estranee per l'organismo e seguono quindi il metabolismo degli xenobiotici. La masticazione umana, costituendo un danno meccanico paragonabile a quello di un insetto erbivoro, distrugge il tessuto della pianta e la MIR vegetale inizia ad idrolizzare una parte dei GLS che insieme ai loro prodotti incontrano il basso pH dello stomaco, responsabile di una loro perdita irrisoria. La digestione ha effetti contrastanti: si assiste ad una ulteriore diminuzione a causa del legame con molecole presenti nella matrice alimentare come proteine e peptidi: gli ITCs a causa dell'elevata reattività ed instabilità possono formare derivati della tiourea e ditiocarbammati esteri. D'altro canto vi è una lisi cellulare aggiuntiva con rilascio di GLS e MIR: l'attività dell'enzima vegetale fino a questo punto è fondamentale e si deve focalizzare l'attenzione su metodiche di cottura blande al fine di evitarne la degradazione. Una frazione importante di GLS sembra bypassare l'assorbimento nel tenue, giungendo al colon, dove può essere scissa dalla β -tioglucosidasi dei batteri intestinali. Nonostante vi

siano delle controversie sul grado di attività rispetto all'enzima naturale, una diminuzione del microbioma porta ad una riduzione del 47% degli ITCs urinari. Nell'intestino tenue i GLS sembra vengano assorbiti per trasporto facilitato o diffusione passiva. In seguito alla valutazione del livello di ditiocarbammati (coniugati GSH-ITC) nelle urine, si evince che i prodotti di idrolisi usano quest'ultima modalità di assorbimento intestinale. Grazie alla natura lipofila e al basso peso molecolare i SFN entrano velocemente nella cellula dove si coniugano col glutathione (GSH) grazie alla glutathione S-trasferasi (GST) con la creazione di un gradiente responsabile della diffusione all'interno della cellula(**Figura 6**).

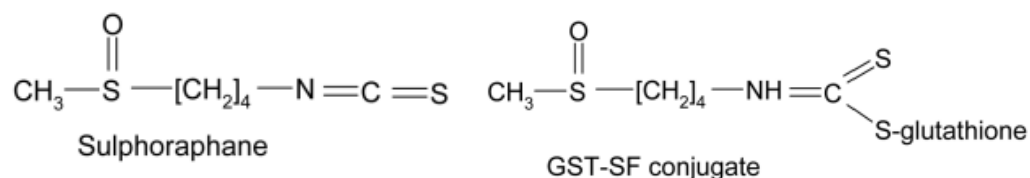


Figura 6 Struttura del sulforafano e sulforafano coniugato col GSH grazie all'attività della GST.

Una volta accumulati nella cellula, i coniugati GSH-ITC sono immessi nel torrente circolatorio grazie sia alla proteina di trasporto associata alla resistenza dei farmaci (MRP-1) sia alla glicoproteina p (Pgp-1). Nelle feci e

nelle urine si evidenziano basse quantità di GLS rispetto ai prodotti di idrolisi, per cui la quasi totalità è idrolizzata/assorbita e metabolizzata. Nel plasma gli ITC si legano all'albumina (carrier principale) o alle glicoproteine. Il loro metabolismo segue la via dell'acido mercapturico. Nel fegato si assiste ad un'ulteriore coniugazione tra GSH e ITC vista la concentrazione elevata del glutatione e la massima attività della GST. Gli ITC coniugati subiscono modificazioni aggiuntive tra cui una N-acetilazione da parte delle N-acetiltraferasi 1-2 (NAT1 e NAT2) con formazione di acido mercapturico e dei suoi derivati ditiocarbammati. Questa reazione avviene sia nel fegato, con ricircolo enteropatico, che nel rene cui segue l'escrezione di questi ultimi con le urine. Questa via metabolica è la principale per i prodotti di idrolisi dei GLS. Il livello escreto nelle urine dei coniugati con l'N-acetilcisteina prodotti dalla NAT rispecchia infatti gli ITC assunti con la dieta. Gli ITC subiscono altresì un importante bioconversione da parte degli enzimi detossificanti, che spiega i vari mercapturati rintracciabili nelle urine (13).

1.3.3 Vitamina K₁ nel broccolo

Nel 1935 Dam scoprì un composto in grado di prevenire le emorragie, che definì "Koagulation vitamin", da qui vitamina K. Con questa accezione si

raggruppa in realtà una serie di composti suddivisibili in 3 diversi gruppi: la vitamina K₁ (fillochinone), la K₂ (menachinone) e la K₃ (menadione). Mentre il menadione è un composto sintetico, il gruppo della K₂, costituito da più molecole, è di derivazione batterica (21). Il fillochinone, dal greco *Phyllon* “ il chinone delle foglie”, si trova nelle parti verdi delle piante come carrier di un elettrone luce dipendente nel fotosistema I (22-24). Chimicamente il fillochinone(2-metil-3-fetil-1,4-naftochinone) è costituito da una frazione naftalenoide (anello) e da una catena laterale fitilica: il menachinone-4, appartenente al gruppo della K₂, è un suo analogo strutturale con delle insaturazioni sulla catena laterale ed è sintetizzato da alcune alghe rosse, diatomee e cianobatteri (**Figura 7A**) (25-27). L’anello naftalenoide può presentare diversi stati di ossidazione: l’eossido è la forma più ossidata, il chinone e il semi-chinone sono forme intermedie, il chinolo la più ridotta (**Figura 7 B**).

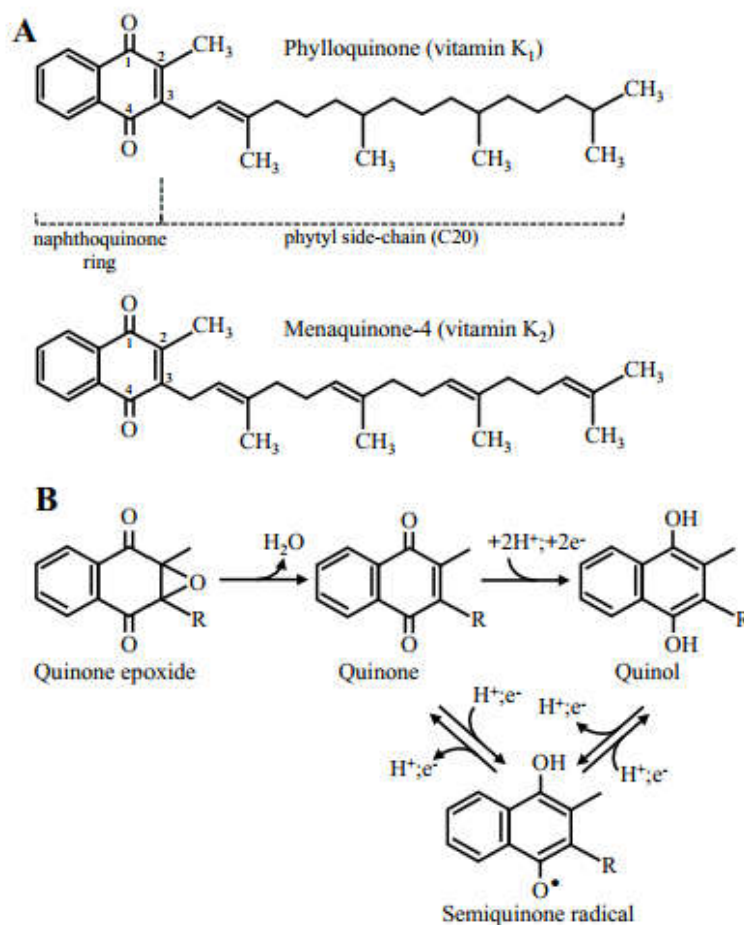


Figura 7 A) Struttura chimica del fillochinone (vitamina K₁) e del suo analogo strutturale menachinone-4 (vitamina K₂). B) Schema di interconversione tra le forme epossido, chinone, semi-chinone e chinolo dell'anello naftalenoide della vitamina K.

La funzione della K₁ nei vertebrati è legata ai diversi stati ossidativi: il fillochinolo funge da cofattore per l'enzima γ -carbossilglutammil carbossilasi che converte in γ -carbossilglutammato (Gla) i residui di acido glutammico (28). Durante questa reazione il chinolo si ossida a epossido, ridotto

nuovamente in fillochinolo dalla vitamina K epossido reduttasi (VKOR) nel reticolo endoplasmatico: ciclo della vitamina K-epossido (29)(**Figura 8**).

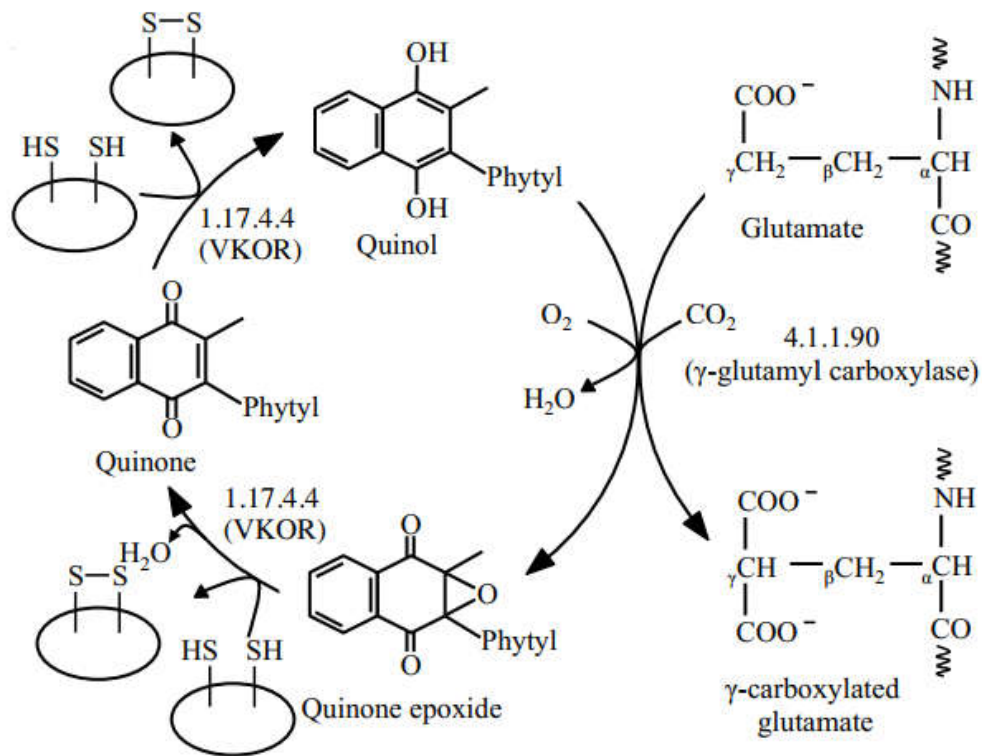


Figura 8 Reazione di γ -carbossilazione del glutammato e riciclo del fillochinone epossido catalizzato dalla vitamina K epossido reduttasi (VKOR).

Grazie a questa modifica post-traduzionale i fattori di coagulazione II, VII, XI, X, la proteina C ed S sono in grado di legare gli ioni calcio, senza i quali incapaci di svolgere la loro attività biologica (29, 30). Nell'uomo sono state scoperte anche altre proteine, estranee al processo di coagulazione, che subiscono questa γ -carbossilazione tra cui l'osteocalcina sintetizzata da osteoclasti, osteoblasti, condrociti ipertrofici e cementoblasti. (31, 32). Grazie

alla modulazione dell'osteocalcina e alla capacità del menachinone-4 di inibire il riassorbimento osseo, la vitamina K assume un ruolo fondamentale sia nel mantenimento della salute ossea sia nella prevenzione dell'osteoporosi, tanto da esserle stato riconosciuto un claim salutistico nell'ambito degli alimenti funzionali (33). La vitamina K, inoltre, possiede una potente attività antiossidante che espleta sia in maniera indiretta, promuovendo l'attività di enzimi come la superossido dismutasi (SOD), che indirettamente inibendo la produzione dei ROS, incluso l'ossigeno singoletto O^{2-} ed i radicali OH, e quella del fattore di trascrizione NF-kB (34). Negli adulti sani una carenza grave di vitamina K è rara perché il fillochinone è molto comune negli alimenti e la flora intestinale produce livelli basali di menachinoni (35, 36).

1.3.4 Biodisponibilità, digestione, metabolismo e assorbimento della vitamina K

Il fillochinone è presente in vari grani e semi (piselli verdi), in alcuni tuberi (patata) e nella frutta (kiwi) ed essendo una sostanza lipofila è anche co-estratta con gli oli vegetali, ad esempio quello di soia: la fonte più abbondante resta comunque la verdura, anche appartenente alla famiglia delle *Brassicaceae*, come il broccolo. Le foglie, rispetto ad altre parti della pianta, mostrano le concentrazioni più elevate vista la funzione di carrier fotosintetico, concentrazioni che aumentano con l'esposizione ad intensità

luminose crescenti e con la maturazione: mentre nel cavolo fresco (*Brassica oleracea*) il fillochinone è di 76µg/100g, negli spinaci (*Spinacea oleracea*) si arriva a 483µg/100g (37,38). L'assorbimento della vitamina K, vista la natura lipofilica, segue quello dei lipidi e perciò la biodisponibilità aumenta con un pasto ricco in grassi: gli spinaci crudi, consumati col burro aumentano la biodisponibilità relativa di 3 volte; e la biodisponibilità mostrata in seguito al consumo di un olio fortificato con questa molecola è maggiore rispetto all'assunzione di broccoli crudi (39, 40). Inoltre l'assorbimento sembra aumentare parallelamente alla quantità dei PUFA presenti nell'alimento a dispetto dei grassi totali (41). Il fillochinone alimentare, una volta internalizzato con altri lipidi nelle micelle dei sali biliari è assorbito nell'intestino tenue grazie ad un recettore scavenger di classe B (tipo I) (42). Negli enterociti è incorporato nei chilomicroni (CM) nascenti ed immesso tramite i capillari linfatici nel circolo linfatico e quindi nel circolo sanguigno a livello del dotto toracico. I CM subiscono il depauperamento della frazione dei trigliceridi (TG) da parte della lipoproteina lipasi (LPL), espressa nei capillari di diversi tessuti, convertendosi in chilomicroni remnants (CR), assimilati dal fegato. Il fillochinone, viene poi immesso nuovamente nel sangue con le VLDL. Nonostante le poche informazioni sul meccanismo molecolare di rilascio del fillochinone da parte delle lipoproteine, nei tessuti

extraepatici è stato studiato l'uptake da parte degli osteoblasti del tessuto scheletrico. *Newman et al.* (2002) hanno dimostrato come l'efficienza di internalizzazione in osteoblasti primari sia maggiore per le LDL seguite dalle lipoproteine ricche di TG che esprimono la più alta concentrazione di K_1 durante la fase postprandiale di assorbimento (43, 44). La sua internalizzazione negli osteoblasti è facilitata dalla presenza di LDLR e LRP1 due recettori capaci di aumentare l'affinità di legame per le lipoproteine che esprimono apoE: gli stessi elementi recettoriali sono presenti negli epatociti (45-47). In questo modo si modula l'uptake sia dei remnants che delle LDL. Vi è un'ulteriore complicazione nel metabolismo della vitamina K nell'uomo: una via di conversione del fillochinone in menachinone-4 (MK-4) mediata dall'enzima UBIAD1. Questa prenil-trasferasi è in grado di tagliare la coda fitilica della K_1 (e di altri menachinoni) con produzione di menadione che, una volta trasportato nei tessuti periferici e ridotto a menadiolo, può essere riprenilato a menachinone-4 (48, 49). Le lipoproteine ricche in trigliceridi trasportano infatti anche una frazione di MK-4, seppur in concentrazione inferiore (1/5) rispetto alla K_1 (50). Se la K_1 ha una concentrazione più elevata nel fegato, la MK-4 è maggiormente presente nel cervello, evidenziando una differente distribuzione tissutale dovuta forse ad una maggiore capacità del menadione di oltrepassare la barriera ematoencefalica (49).

L'escrezione del fillochinone e del menachinone-4 avviene tramite la bile e l'urina: si ipotizza che la catena laterale subisca una reazione di ω -idrossilazione prima e di β -ossidazione poi con accorciamento progressivo della stessa e coniugazione del prodotto ottenuto con l'acido glucuronico (51, 52). Il fillochinone mostra un tasso di ritenzione molto basso nel nostro organismo; evidenze cliniche e farmacologiche suggeriscono un turnover elevato, coadiuvato da un'escrezione importante a livello biliare (53-55).

1.3.5 Carotenoidi nel broccolo

I carotenoidi sono delle molecole idrofobiche sintetizzate dalle piante e da alcuni microorganismi come batteri, alghe e funghi: questi pigmenti di color giallo, arancio e rosso sono abbondanti in frutta, verdura, uova, alcuni pesci e crostacei. In natura sono stati rinvenuti più di 700 carotenoidi diversi e nonostante circa 50 siano presenti nella dieta, solo 20 sono identificabili nel sangue e nel siero dell'uomo: in quest'ultimo il β -carotene, l' α -carotene, la luteina, la zeaxantina e la β -criptoxantina sono i più cospicui (56). Le proprietà chimico-fisiche dei carotenoidi ne determinano la distribuzione nell'ambiente cellulare: essi infatti fanno parte sia del bilayer fosfolipidico delle membrane sia delle goccioline lipide citosoliche (57, 58). Alcuni sono in grado di sopperire alle richieste di vitamina A in quanto loro precursori. I

carotenoidi vengono suddivisi in due gruppi: ai caroteni appartengono molecole formate da solo carbonio e idrogeno come il β -carotene, l' α -carotene, il fitoene, mentre le xantofille includono invece molecole ossigenate quali luteina, zeaxantina e β -criptoxantina (56). Chimicamente presentano una struttura di base formata da unità isopreniche, legate covalentemente testa-testa o testa-coda e tipicamente un numero di C pari a 40: la prima molecola del pathway biosintetico è il fitoene che, a seguito di desaturazioni enzimatiche, può produrre il fitoluene ed eventualmente il licopene, con struttura lineare (59). Il licopene può subire processi di ciclizzazione o deidrogenazione con formazione di altri caroteni, i quali originano per ossidazione le xantofille (60). Il sistema dei doppi legami che caratterizza la struttura di questi fitochimici è responsabile non solo del loro colore ma anche della loro reattività (61). Alcuni carotenoidi come la luteina possono trovarsi in forma esterificata, inoltre ogni doppio legame può assumere la conformazione *cis* o *trans*: quasi tutti i carotenoidi naturali sono molecole *all-trans*, anche se trattamenti col calore, come la cottura, possono originare isomeri *cis* (62, 63). In aggiunta dalla scissione dei carotenoidi a 40 atomi di C si producono gli apocarotenoidi presenti sia negli alimenti naturali o prodotti in seguito a processi alimentari (64, 65). Nel broccolo i carotenoidi più abbondanti sono il β -carotene e la luteina (**Figura 9**).

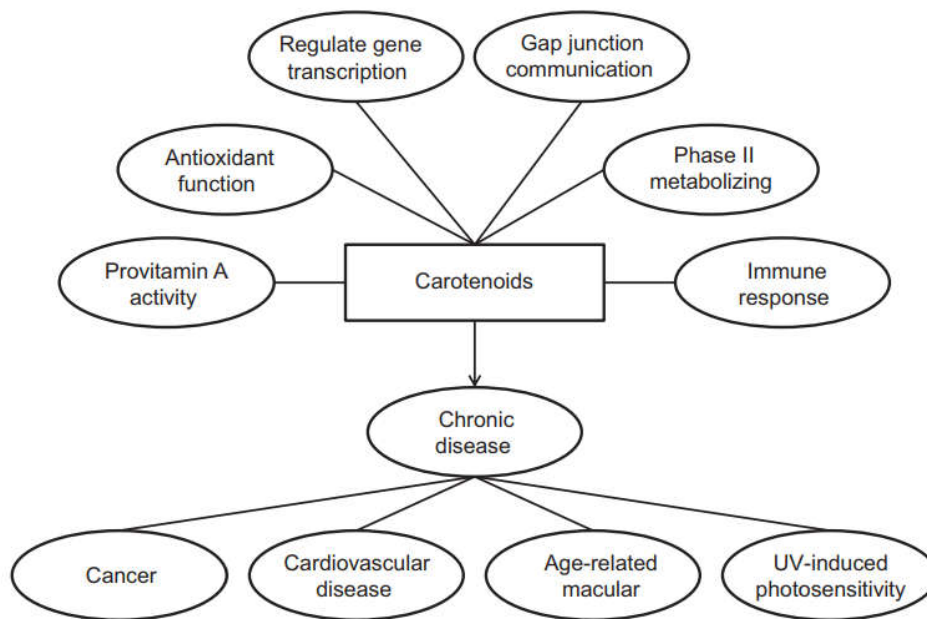


Figura 10 Azioni biologiche dei carotenoidi e prevenzione delle malattie croniche correlate.

Il β -carotene, insieme all' α -carotene, alla β -criptoxantina e l' γ -carotene sono precursori della vitamina A con medesime caratteristiche strutturali: un anello β -ionone intatto e non sostituito più una catena idrocarburica insatura. L'enzima BCO1 (β -carotene ossigenasi), infatti, scinde il doppio legame centrale 15,15' rilasciando una molecola di retinale, che può essere ridotto a retinolo (reversibile) o ossidato a formare l'acido retinoico *all-trans* (irreversibile) (**Figura 11**).

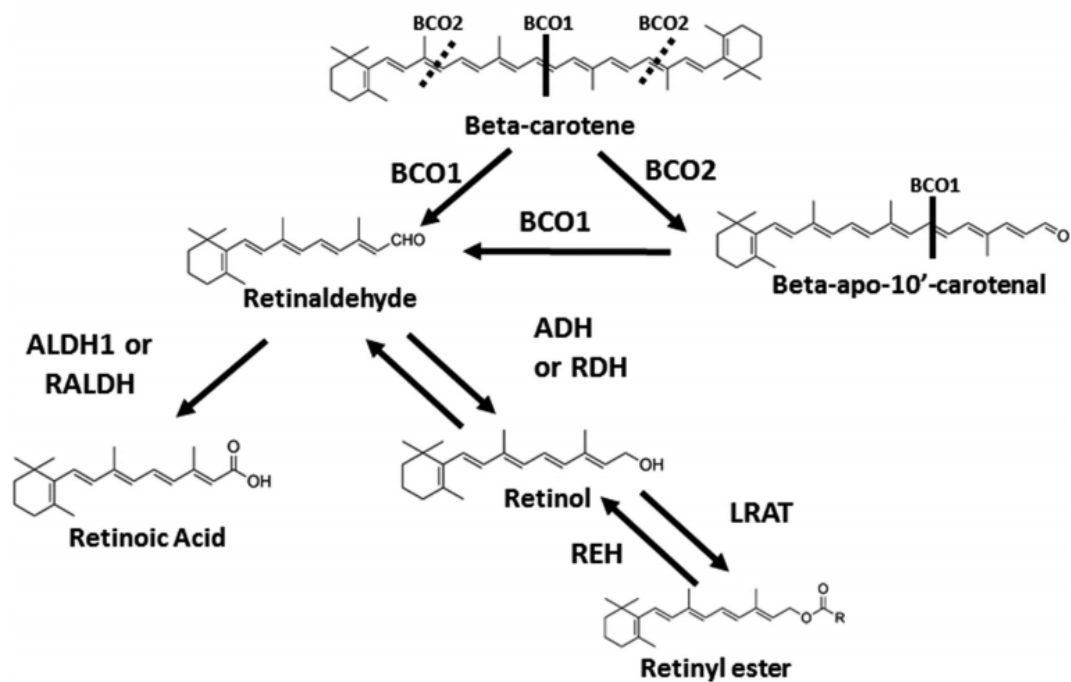


Figura 11 Conversione del β -carotene in vitamina A. BCO1: β -carotene-15,15-ossigenasi; BCO2, β -carotene-9,10-ossigenasi; ALDH1, aldeide deidrogenasi; RALDH, retinaldeide deidrogenasi; ADH, alcool deidrogenasi; RDH, retinol deidrogenasi; LRAT, lecitin-retinol acil trasferasi; REH, retinil estere idrolasi.

Dalla scissione del β -carotene si generano due molecole di retinale (68). Inoltre nel tessuto muscolare scheletrico e cardiaco, nella prostata, nel tessuto connettivo endometriale e nel pancreas una BCO2 opera una scissione asimmetrica nonostante BCO1 resti l'enzima chiave di questo processo (69). La vitamina A è un nutriente essenziale critico per attività biologiche quali la riproduzione, l'immunità e la vista (70).

I carotenoidi fungono da potenti antiossidanti grazie ai doppi legami coniugati che costituiscono un sistema reattivo ricco di elettroni col quale

operano da scavengers per l'ossigeno singoletto e per i radicali perossilici (71). In diversi studi è emerso il ruolo protettivo del β -carotene nei confronti delle scottature: diversi carotenoidi si accumulano nella pelle proteggendola dai danni della luce UV, dalle scottature e dall'invecchiamento (72). La modulazione della trascrizione genica sembra essere il meccanismo col quale i carotenoidi operano in vivo: il β -carotene si è mostrato capace di modulare i geni redox-sensibili come Bcl-2 e p-53 e di indurre l'espressione della proteina connessina-43, implicata nelle comunicazioni gap junction, in cellule cancerose della cavità orale (73, 74). Uno studio di 15 anni su più di mille uomini finlandesi ha correlato una bassa concentrazione di β -carotene nel siero con l'aumentato rischio di mortalità cardiovascolare, insufficienza cardiaca congestizia e morte cardiaca improvvisa (72).

La luteina e la zeaxantina, definite pigmenti maculari, si trovano nella retina umana, concentrate nella macula, dove assorbono la luce blu, fungono da antiossidanti e proteggono da lesioni fotochimiche (72). L'aumento nell'intake di queste xantofille migliora non solo la funzionalità oculare ma si ipotizza un ruolo anche nella capacità cognitiva in quanto nel cervello sono accumulate preferenzialmente proprio luteina e zeaxantina in proporzione del 46% e 70% rispetto ai carotenoidi totali (69). Recentemente degli studi di

meta-analisi hanno associato l'incremento sierico/alimentare di luteina con diminuzione delle malattie coronariche, infarto e sindrome metabolica (73).

1.3.6 Biodisponibilità, digestione, metabolismo e assorbimento dei carotenoidi

Come per i glucosinolati, anche la bioaccessibilità/biodisponibilità dei carotenoidi è dipendente dalla matrice alimentare considerata in quanto ogni alimento possiede un profilo peculiare che può essere modificato dai trattamenti a cui viene sottoposto. I carotenoidi sono immagazzinati nei cromoplasti, a volte in strutture cristalline e, nelle verdure a foglia verde, sovente complessati con proteine (76). I carotenoidi della frutta sono più disponibili rispetto a quelli della verdura ad una migliore interazione con la fase lipidica del contenuto gastrointestinale: sia *in vivo* che *in vitro* la bioaccessibilità del β -carotene è più elevata nel mango e nella papaia rispetto al pomodoro e carota, probabilmente per differenze morfologiche e d'accumulo nel cromoplasto stesso (76, 77). I cloroplasti delle verdure verdi e della frutta immatura contengono principalmente β -carotene, luteina, violaxantina e neoxantina ma con la maturazione si assiste sovente ad una modifica nella concentrazione e nel tipo di carotenoidi, in quanto i cloroplasti si convertono in cromoplasti, nei quali se ne aumenta la sintesi (78, 79): ciò non avviene in alcune *Brassicaceae*, quali kale e spinaci (80, 81).

Nonostante durante la maturazione si assista all'esterificazione delle xantofille, i prodotti esterificati risultano assenti nel siero probabilmente perché non biodisponibili o a causa di un'ulteriore attività esterasica intestinale. Inoltre anche il rilascio di pectine, tipico della maturazione, può intralciare l'assorbimento intestinale (82). I processi termici hanno effetti contrastanti; infatti, come quelli meccanici, degradano la matrice stessa e l'integrità cellulare e, rompendo i complessi carotenoidi-proteine, aumentano l'efficacia del processo digestivo e quindi l'assorbimento. E' altrettanto vero però che i carotenoidi sono termolabili e le cotture possono indurre cis-isomerizzazione, epossidazione e degradazione (79, 82). I carotenoidi hanno in comune con la vitamina K la natura lipofilica e quindi le medesime tappe generali di digestione, assorbimento e metabolismo, che coincidono con quelle lipidiche. La masticazione ed il succo gastrico iniziano a liberare i carotenoidi, incorporati nelle goccioline lipidiche in formazione dove si dispongono in relazione alla solubilità: i caroteni al centro mentre le xantofille sulla superficie (83). I sali biliari nel duodeno facilitano gli enzimi del succo pancreatico nel liberare i lipidi dalle micelle: alcune evidenze supportano l'idrolisi degli esteri delle xantofille da parte delle lipasi come la carbossil-estere lipasi (82). Il trasporto nel mezzo acquoso gastro-intestinale può compiersi anche con vescicole unilamellari o multilamellari di fosfolipi (84).

Come mostrato in figura sono state ipotizzate diverse modalità di assorbimento da parte degli enterociti: oltre che per diffusione passiva dipendente dalla concentrazione, si suppone l'implicazione anche dei trasportati del colesterolo(**Figura 12**) (85).

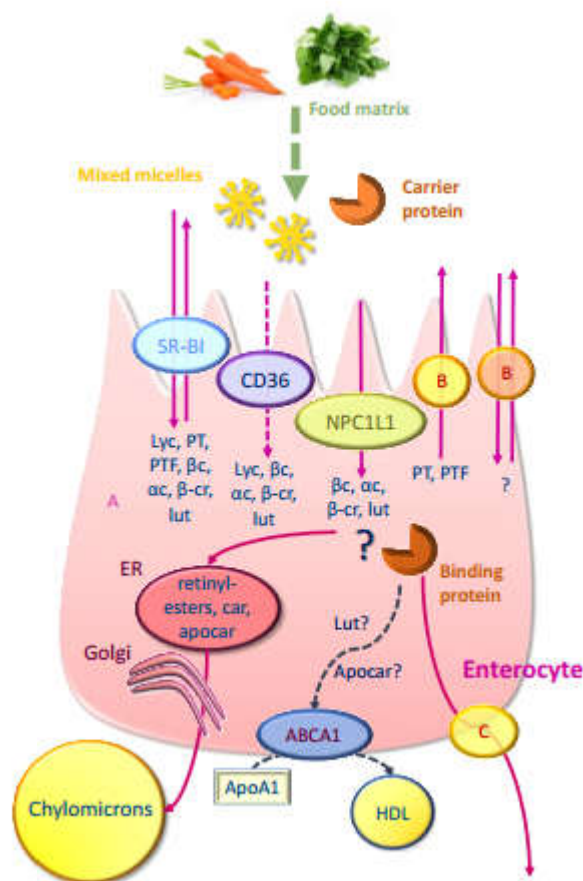


Figura 12 Pathway dell'uptake, del trasporto e della secrezione dei carotenoidi nell'enterocita. A, trasporto passivo; B, trasportatore apicale non identificato; C, trasportatore basolaterale per l'efflusso; ER, reticolo endoplasmatico.

In aggiunta il β -carotene e la luteina, sia nei ratti che nelle cellule Caco-2, sono internalizzati grazie al trasportatore lipidico SR-BI. Non è altresì escluso

il coinvolgimento di alcune proteine di membrana delle cellule intestinali quali CD-36, FAT , NPC1L e ABCG5/G8 della superfamiglia ABC dei trasportatori (82) (**Figura12**). Una volta all'interno dell'enterocita, i carotenoidi sono trasportati nell'Apparato del Golgi dove saranno assemblati nei chilomicroni nascenti: per di più anche le HDL sembrano implicate nel trasporto, soprattutto di luteina, nel circolo linfatico, grazie ad ABCA1 espresso sulla membrana basolaterale delle cellule intestinali (84, 86, 87). Vista la presenza di CD-36 nella membrana del Golgi e di NPC1L1, SR-BI e FABP's nei lisosomi ed in altri organuli, si crede che questi trasportatori siano implicati anche nella veicolazione citosolica (84, 85, 87). La possibilità di un efflusso nel lume intestinale dei carotenoidi non assimilati, grazie a proteine di membrana, concorrerebbe a chiarire il basso livello di assorbimento (86). Nonostante non si sia ancora certi sull'effettivo contributo dei vari trasportatori in questa fase, un loro coinvolgimento spiegherebbe le differenze individuali sull'uptake dei carotenoidi, dovute a diversa espressione genica. Circa il 30% dei carotenoidi assorbiti non è metabolizzato: gli enzimi BCO1/BCO2 nell'enterocita producono retinolo, esterificato in retinil-estere dalla lecitina-retinol aciltrasferasi (LRAT), e apocarotenoidi (88).

Trasportati con la linfa, i chilomicroni ed eventualmente le HDL raggiungono il circolo ematico. Qui dai chilomicroni, a causa delle LPL, si originano i CR:

vista la posizione superficiale di alcuni carotenoidi, soprattutto xantofille, si ipotizza un trasferimento o ad altre lipoproteine o ad alcuni tessuti grazie all'attività di SR-BI (89). Veicolati al fegato grazie ai CR, i carotenoidi vengono accumulati in situ, o eliminati con la bile o secreti con le VLDL per essere distribuiti ai tessuti periferici. Nonostante un possibile scambio di carotenoidi tra le VLDL e altre lipoproteine, una buona frazione dei caroteni, essendo localizzata nel core lipidico, si riscontra nelle LDL, tramite le quali vengono internalizzati nelle cellule. Sono state avanzate diverse ipotesi per la presenza dei carotenoidi nelle HDL: possono originarsi dai tessuti col metabolismo inverso dei lipidi, o dall'intestino grazie ad ABCA1 o dai possibili scambi visti in precedenza (90). In generale le xantofille sono trasportate soprattutto con le HDL mentre i caroteni con le LDL (91). I carotenoidi sono rintracciabili in tessuti diversi a diverse concentrazioni: il tessuto adiposo ed il fegato contengono rispettivamente l'80 e il 10% del totale (90).

1.4 Gli integratori alimentari

La definizione e regolamentazione degli integratori alimentari non ha ancora raggiunto un consenso globale: la melatonina ad esempio negli USA è regolamentata come un integratore, un prodotto salutistico naturale in Canada

mentre in Australia è considerata come una prescrizione medica; Paesi con cultura, sistema legale e livello di sviluppo economico simili applicano ordinamenti divergenti a questa categoria. Si aggiunge una difficoltà ulteriore se si considerano nazioni come la Cina o l'India che dispongono di un quadro normativo per la medicina tradizionale o la fitomedicina, di cui fanno parte prodotti botanici grezzi. Inoltre molte legislazioni stanno cambiando. Il tema degli integratori rappresenta infine un campo di aperto dibattito, caratterizzato da opinioni e punti di vista discrepanti. Alcuni considerano questi articoli alla stregua di farmaci o alimenti, altri credono sia necessario un approccio peculiare, vista l'esistenza, per molti di essi, di evidenze scientifiche basate però su prodotti contenenti più sostanze. Il boom che ha subito questo settore negli ultimi decenni ha stimolato un mercato lucrativo non di poco conto: si assiste infatti alla nascita continua di nuove aziende per la produzione degli integratori e la messa in commercio di prodotti rivoluzionari ed innovativi, a volte a discapito dei reali benefici (92). In generale un integratore alimentare è definito come *“una sostanza aggiunta alla dieta, in formulazione farmaceutica per trattare/prevenire una carenza, per incrementare la crescita, migliorare lo stato di salute e benessere”* (93). La normativa di settore che si occupa in Italia della definizione degli integratori alimentari è la Direttiva 2002/46/CE, attuata con il decreto legislativo 21 maggio 2004, n.

169 che specifica: *“prodotti alimentari destinati ad integrare la comune dieta e che costituiscono una fonte concentrata di sostanze nutritive, quali le vitamine e i minerali, o di altre sostanze aventi un effetto nutritivo o fisiologico, in particolare, ma non in via esclusiva, aminoacidi, acidi grassi essenziali, fibre ed estratti di origine vegetale, sia monocomposti che pluricomposti, in forme predosate”*. Di norma gli integratori alimentari sono proposti in formati quali capsule, compresse bustine o flaconcini e le linee guida ministeriali (LGM) racchiudono delle disposizioni per quegli aspetti non armonizzati a livello europeo suddivise nelle seguenti sezioni:

- Vitamine e minerali, per i quali sono presenti i massimi livelli di apporto consentiti
- Probiotici e prebiotici, con allegate precise disposizioni
- Altre sostanze con effetto nutritivo o fisiologico, con precise disposizioni

Inoltre i prodotti intesi come coadiuvanti delle diete ipocaloriche devono sottostare a delle conformità espresse in un'appendice (c).

1.4.1 Alimenti funzionali o integratori alimentari?

Dalla definizione di alimento funzionale ed integratore alimentare emerge uno scopo comune: la promozione ed il mantenimento dello stato di salute. Molte

delle sostanze elencate sono contenute nella frutta e nella verdura; nonostante ciò e tutti gli sforzi per incentivare il consumo giornaliero di più razioni di questi generi alimentari, vi sono ancora degli enormi gap tra le porzioni raccomandate e quelle effettivamente consumate: ad esempio uno studio del 2010 ha riportato un consumo medio per persona, al giorno, negli USA, di vegetali inferiore alle 4 porzioni, a discapito soprattutto della frutta (10). Inoltre vi sono casi in cui il fabbisogno per uno più specifici composti sia aumentato come in situazioni patologiche (ad esempio supplementazione di vitamina B12 per soggetti con anemia perniciosa), oppure in soggetti sportivi (multivitaminici e Sali minerali per atleti endurance) o donne in gravidanza per le quali si raccomanda ad esempio l'assunzione di un integratore di acido folico. D'altro canto, sebbene gli alimenti non sempre siano in grado di sopperire alle richieste fisiologiche degli individui, essi spesso possiedono più principi nutritivi (quali fitochimici, vitamine, sali minerali, ecc.) che possono avere un effetto sinergico per l'organismo (94). Inoltre, l'assunzione di molte molecole bioattive con l'alimentazione può favorire l'assorbimento e la biodisponibilità delle stesse, perché veicolati dai componenti del pasto (ad esempio, molecole lipofile vengono ben trasportate dai grassi contenuti nell'alimento o da eventuali condimenti impiegati). Da non sottovalutare l'importante funzione edonistica svolta dai cibi, la quale conferisce un piacere

aggiuntivo al consumo del composto bioattivo (PUFA assunti tramite frutta secca o pesce azzurro, resveratrolo mediante uva e vino rosso, ecc).

Gli integratori, la cui modalità di assunzione è molto più pratica, contengono dosi concentrate del principio attivo che al contrario si trova in quantità medio/basse nelle matrici alimentari. Diverse evidenze hanno però dimostrato che alcuni fitochimici o nutrienti se consumati in eccesso, per lunghi periodi o in parallelo con altre sostanze, possono risultare pericolosi e quindi meglio assumerli con una dieta variegata (95). Il ginseng, disponibile in bustine da tè o in capsule, migliora la resistenza (anche allo stress) e la concentrazione: se usato con altri stimolanti può però causare diarrea, ipertensione e insonnia (96). L'ingegneria genetica, la fortificazione (processo tecnologico volto ad incrementare le quantità del principio attivo già presente nel prodotto ma in basse concentrazioni), l'incrocio e la selezione rappresentano validi aiuti per incrementare i nutrienti nel cibo: l'incrocio tra un cultivar standard di broccoli con una forma wild (*B. Villosa*) ha permesso di ottenere una concentrazione maggiore di glucoiberina e glucorafanina (97). Le varie fasi di cui si compone la catena alimentare, soprattutto i processi meccanici e termici, hanno effetti spesso deleteri sull'alimento, come la degradazione degli stessi o di elementi necessari al loro assorbimento: come visto in precedenza per le *Brassicaceae*, la mirosinasi, che determina la quantità di ITC accessibili, si degrada con

cotture invasive. In aggiunta la bassa solubilità, ridotta stabilità e biodisponibilità di alcuni alimenti, possono impedire l'assorbimento: gli integratori sono pensati per bypassare tutti questi problemi (98). L'ossigeno e l'acqua sono elementi deleteri che si sommano agli ostacoli visti in precedenza: l'incapsulamento in nanoparticelle o microparticelle contenenti il composto, associate a formulazioni in gel o liquide sono dei validi strumenti volti ad eliminare queste problematiche (99). Gli integratori non essendo dei farmaci, non richiedono prescrizione medica, tanto che possono essere reperiti al supermercato o su internet: l'individuo associa questa disponibilità e mancanza di restrizioni all'assenza di rischi e pericoli, usufruendone con discernimento e senza consultare il parere di un esperto, incoraggiati spesso perché "derivati naturali" (96). Le sfide maggiori nei confronti degli integratori alimentari riguardano la definizione di tre parametri imprescindibili ossia qualità, sicurezza ed efficacia. I principi attivi sono spesso sostanze naturali, studiate, testate e usate già da tempo; tuttavia, dal momento che la realizzazione di un integratore prevede diversi step di sintesi e l'utilizzo di veicolanti, sono necessarie ulteriori analisi che confermino la qualità del prodotto. In particolare è necessario che tutti i componenti presenti in quantità non pericolose siano sicuri e che tossine naturali o elementi tossici debbano essere assenti. L'efficacia è garantita con studi a più livelli: si passa

dalle ricerche di base *in vitro*, alla valutazione dell'attività prima negli animali poi nell'uomo, prima con trials di fase I e II ristretti a cui segue una fase III massiva. Vi sono altresì differenze sulla quantità di evidenze richieste per dimostrare la funzionalità dell'integratore. In alcune nazioni addirittura le normative non richiedono test sulla dissoluzione e disintegrazione dell'integratore. Nonostante un quadro legislativo ancora discordante, la necessità di standardizzare globalmente le metodiche di validazione e la mancanza di dati sugli effetti a lungo termine, gli integratori rappresentano una valida alternativa per sopperire alle richieste di nutrienti da parte del nostro organismo quando non è possibile farlo con la dieta : ciò chiaramente non prescinde da un loro uso responsabile e limitato a brevi periodi (92).

2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare come variano i livelli totali di isotiocianati nel broccolo (*Brassica Oleracea var. Italica*) cotto con due trattamenti termici diversi e la biodisponibilità degli stessi, paragonandola poi a quella di un supplemento orale contenente sulforafano. È stata valutata inoltre sia la variazione dei livelli di vitamina K₁ e di carotenoidi in seguito agli stessi trattamenti termici, sia la loro biodisponibilità.

3.MATERIALI E METODI

3.1 Disegno sperimentale

3.1.1 Protocollo sperimentale

Il protocollo sperimentale seguito è presentato nello schema seguente (**Figura 13**).

Nel minibroccolo briot fresco sono stati quantificati isotiocianati e carotenoidi. Mentre una parte del crudo fresco è stata conservata a 4°C, un'altra è stata congelata a -20°C : nel primo (dopo 4 giorni) sono stati quantificati isotiocianati e vitamina K₁, nel secondo (dopo 15 giorni) isotiocianati, vitamina K₁ e carotenoidi.

Il broccolo congelato a -20°C è stato trattato termicamente (bollitura e full steaming): le stesse molecole bioattive sono state quantificate sia nei cotti che nel plasma dei soggetti partecipanti dopo l'assunzione degli stessi.

Dalla matrice alimentare, per ogni condizione, sono state scelte a caso e frullate tre rosette, da ciascuna delle quali sono stati prelevati tre campioni e analizzati in duplicato (per i carotenoidi il broccolo ha subito un processo di

liofilizzazione). Il plasma di ogni soggetto per ogni tempo è stato analizzato in duplicato.

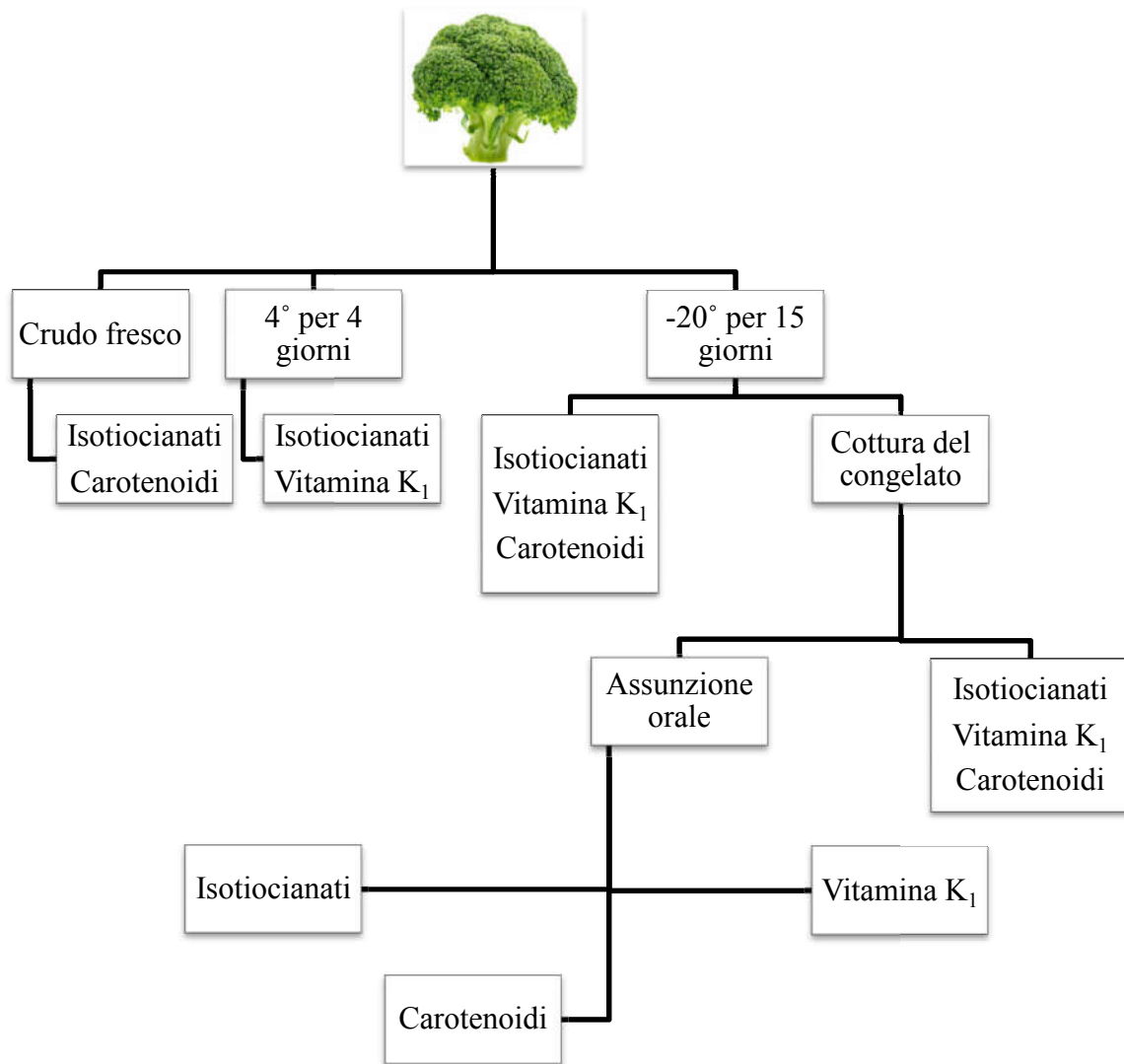


Figura 13 Protocollo sperimentale.

3.1.2 Partecipanti

Lo studio ha richiesto il reclutamento di un gruppo di soggetti sani, di entrambi i sessi, tutti volontari, con un'età compresa tra i 20 e i 40 anni, che hanno assunto l'integratore BroccoMax® ed il broccolo cotto tramite bollitura e con una tecnica innovativa, ossia il full steaming (**Figura 14**).

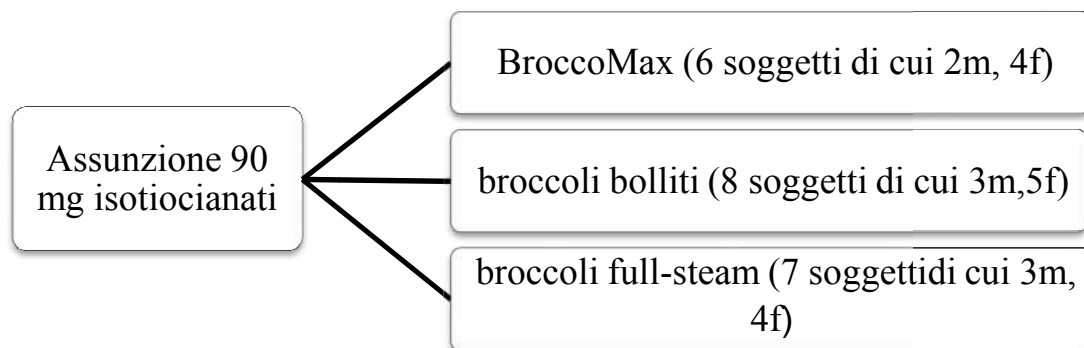


Figura 14 Organizzazione dei partecipanti allo studio

3.1.3 Caratteristiche dell'integratore BroccoMax®

Jarrow Formulas BroccoMax® (**Figura 15**) è un integratore vegano e senza glutine in capsule che permette l'assunzione di una quantità standardizzata di sulforafano glucosinolato (glucorafanina) estratto (senza solventi) dai semi di broccoli. Ogni capsula, da assumere preferenzialmente prima e dopo i pasti ed in numero massimo di tre, contiene 30 mg sulforafano glucosinolato (*Brassica*

oleracea var. italica) in una miscela di enzima mirosinasi, che permette di liberare il sulforafano.



Figura 15 *BroccoMax*®.

3.1.4 Campionamento del mini broccolo briot

L'azienda Agrinovana s.r.l (Petritoli, Fermo, Italia) ci ha fornito una partita di 9 kg di mini broccoli briot. Tramite un attento esame visivo i broccoli rovinati o usurati sono stati eliminati mentre gli altri sono stati rifiniti, eliminando il gambo e conservando solo la rosetta. Le rosette sono state ulteriormente tagliate per raggiungere una misura standard sia in peso (8-12 g) che in altezza ($2,5 \pm 0,5$ cm) (**Figura16**).



Figura 16 Campioni di rosette di mini broccolo briot rifinite.

Una volta lavate in acqua corrente e asciugate, le rosette sono state utilizzate per la quantificazione degli isotiocianati, del fillochinone e dei carotenoidi. In particolare:

- ✓ il giorno stesso per isotiocianati e carotenoidi
- ✓ dopo 4 giorni in un campione conservato a 4°C per isotiocianati e K₁
- ✓ dopo 15 giorni in un campione conservato a -20°C per isotiocianati, carotenoidi e K₁

Lo scopo della quantificazione degli isotiocianati è duplice:

- ✓ valutarne la quantità nel crudo in modo da calcolare la porzione di broccoli cotti che i soggetti avrebbero dovuto assumere per raggiungere la stessa quantità ingerita con l'integratore (90 mg)
- ✓ valutare il metodo di conservazione migliore

Le rosette destinate all'analisi degli isotiocianati e del fillochinone sono state triturate, mentre quelle destinate al dosaggio dei carotenoidi sono state liofilizzate intere con Virtis Wizard 2.0 (SP Industries, NY). Il restante broccolo è stato porzionato e congelato a -20°C in attesa dei trattamenti termici e successivo consumo.

3.1.5 Trattamenti termici

I trattamenti termici eseguiti sul prodotto congelato sono stati i seguenti (**Figura17**):

- Bollitura: questa cottura è stata realizzata con l'ausilio di una pentola, munita di coperchio, di 18 cm di diametro posta su una piastra e contenente 1.5 L di acqua non salata. Una volta raggiunta l'ebollizione sono stati aggiunti 200 g di broccoli congelati e cotti 12 minuti.
- Full steaming: 200 g di broccoli congelati sono stati rovesciati in un contenitore di vetro per la cottura full steam e posti nel forno freddo BS8354801M (AEG, Germania) con dei sensori di rilevazione dei dati (LXI Data Acquisition Switch Unit) (Keysight, US). È stato scelto il programma a 95°C della durata di 27 minuti.



Figura 17 Cottura del mini broccolo briot: bollitura a sinistra e full steaming a destra.

Dopo la cottura, i broccoli sono stati raffreddati a temperatura ambiente e poi distribuiti ai volontari. Per entrambe le condizioni, un campione è stato prelevato per la quantificazione degli isotiocianati, del fillochinone e dei carotenoidi.

3.1.6 Modalità di somministrazione dell'integratore e dei broccoli

L'assunzione delle capsule, dei broccoli bolliti e dei broccoli cotti al vapore è avvenuta dopo una settimana di restrizione alimentare: nel caso dell'integratore sono state eliminate solo le *Cruciferae*, mentre nel caso dei broccoli anche gli alimenti contenenti carotenoidi (soprattutto quelli ricchi in β -carotene e luteina) e vitamina K₁. Le capsule, i broccoli bolliti e cotti al

vapore sono stati assunti a stomaco vuoto. I soggetti hanno assunto complessivamente 90 mg di isotiocianati sottoforma di integratore o broccolo cotto con entrambe le modalità. Nello specifico, per raggiungere i suddetti livelli di isotiocianati, i volontari hanno consumato 400 grammi di alimento cotto.

3.1.7 Preparazione e stoccaggio dei campioni plasmatici

Per tutte e tre le condizioni sperimentali sono stati effettuati prelievi in cinque tempi diversi sulla base del lavoro proposto da *Atwell et al.* (2015) che dimostra come il picco degli isotiocianati nel plasma sia a 3 ore (100):

- tempo zero (t0): prima dell'assunzione
- tempo uno (t1): a 3 h dall'assunzione
- tempo due (t2): a 6 h
- tempo tre (t3): a 12 h
- tempo quattro (t4): a 24 h

Per ogni tempo ad ogni soggetto sono stati prelevati 6 ml di sangue intero suddivisi in un vacutainer contenente EDTA (destinati al dosaggio di isotiocianati e carotenoidi) e in uno contenente eparina (per il dosaggio di vitamina K₁). Subito dopo il prelievo tutti i vacutainer sono stati centrifugati a 1500xg per 15 minuti a 4°C. Successivamente il sovranatante è stato

recuperato ed aliquotato all'interno di eppendorf che sono state conservate a -80°C, fino al momento della lettura mediante HPLC e UPLC.

3.2 Determinazioni analitiche

3.2.1 Analisi cromatografica

Gli isotiocianati e la vitamina K sono stati quantificati con l'HPLC (High Performance Liquid Chromatography), una tecnica analitica di tipo quantitativo che permette di quantificare componenti sia di matrici biologiche, come il plasma o le cellule, sia di matrici alimentari. In particolare l'HPLC utilizzato consiste in un auto campionatore (YL 9150), un sistema di filtraggio, un fornello che ospita la colonna (YL instrument 9330), un sistema di pompe quaternario con 4 fasi diverse e due detectors: uno UV-visibile e uno a fluorescenza. Il software che gestisce il sistema è Clarity (DataApex). La separazione di uno o più componenti dalla matrice avviene sfruttando l'equilibrio di affinità tra una fase "stazionaria" posta all'interno della colonna cromatografica e una fase "mobile" che fluisce al suo interno. La fase mobile, spinta nella colonna cromatografica ad elevate pressioni grazie al sistema di pompe, è costituita da un solvente e dal campione mentre la fase stazionaria è un materiale solido adsorbente (generalmente silicati). Quando una sostanza è più affine alla fase stazionaria rispetto a quella mobile impiega un tempo

maggiore a percorrere la colonna cromatografica, quindi presenta un tempo di ritenzione maggiore; viceversa se la sostanza è più affine alla fase mobile. Alla fine della colonna cromatografica è applicato un rilevatore e un calcolatore che permettono un'analisi in continuo del materiale in uscita dalla colonna, emettendo un segnale che viene rappresentato da un cromatogramma. La scelta della colonna e della fase da utilizzare è stata realizzata in base alla molecola da quantificare.

La quantificazione dei carotenoidi è stata eseguita invece sul sistema UPLC Acquity (Ultra Pressure Liquid Chromatographic H-class) (Waters Corporation, Milford, US) dotato anch'esso di un sistema di pompe quaternario, un fornello per la colonna ed un detector a fotodiodi (PDA). La configurazione è stata eseguita dall'Empower software 2.0 della Waters Corporation.

3.2.2 Quantificazione degli isotiocianati

La quantificazione sia nella matrice alimentare che nel plasma è stata condotta utilizzando il metodo sviluppato da *Ye et al.* (2002) che si basa su una reazione di ciclocondensazione: tutti i glucosinolati presenti nella matrice di partenza vengono idrolizzati dalla mirosinasi e gli isotiocianati ottenuti reagiscono quantitativamente con i gruppi sulfidrilici dell'1,2-benzeneditiolo

con produzione dell'1,3-benzoditiolo-2-tione la cui separazione e quantificazione può essere realizzata con l'HPLC (101) (**Figura 18**).

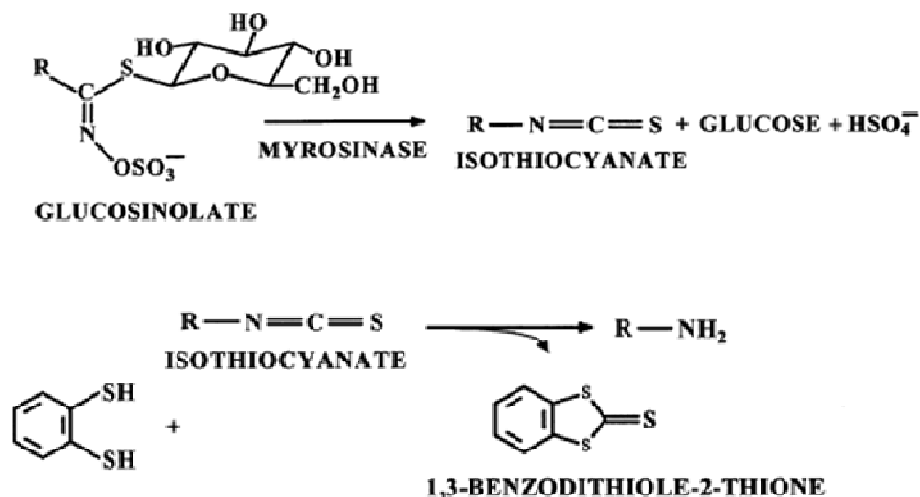


Figura 18 Idrolisi dei glucosinolati da parte della mirosinasi (in alto). Ciclocondensazione degli isotiocianati con l'1,2-benzeneditiolo con produzione dell'1,3-benzoditiolo-2-tione.

L'analisi della matrice alimentare ha richiesto delle prove preliminari per valutare sia la quantità più indicata di campione da iniettare, sia l'attività dell'enzima mirosinasi nelle diverse condizioni, necessario per produrre gli isotiocianati dai glucosinolati presenti nei mini broccoli *briot*.

L'estrazione è stata realizzata sulla base del lavoro di *Atwell et al.* (2015), preve modificazioni (100). Una porzione rappresentativa di campione (50 mg) è stata accuratamente pesata in una eppendorf a cui sono stati aggiunti 200 µL di acqua deionizzata: il campione è stato miscelato tramite vortex per

30 secondi e sonicato per 3 minuti, il tutto ripetuto 3 volte. Nelle eppendorf contenenti il campione cotto sono stati aggiunti 2 mg della tioglucosidasi *Sinapis alba* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Segue un incubazione di 2 h a 60°C al buio: in queste condizioni l'enzima, esogeno per il crudo ed endogeno per i cotti, scinde i glucosinolati in isotiocianati (reazione enzimatica). Trascorse le 2 h sono stati aggiunti 200 µL buffer 100 mmol/L di fosfato potassio (pH 8.5) e 400 µL dell'1,2-benzenediotiolo in acetonitrile 20 mmol/L (substrato) conservati entrambi a 4°C: è previsto un'ulteriore step di incubazione a 65°C per 2 h che permette la reazione di ciclocondensazione e la formazione dell'1,3-benzoditiolo-2-tione. Dopo una centrifugazione a 1200xg per 5 minuti a 4°C il sovrantante è stato recuperato e aliquotato in altre eppendorf.

Lo stesso protocollo, esclusi i cicli di sonicazione e la reazione enzimatica, è stato applicato per la quantificazione degli isotiocianati in 200 µL di plasma.

Per la quantificazione in HPLC sono stati iniettati 40 µL di campione nella colonna cromatografica Phenomenex Kinetex (C18 250 mm x 4.6 mm x 5 µm), mediante un flusso di 1,7 mL/min, usando come fase mobile una soluzione di 80% metanolo:20% acqua. L'1,3-benzoditiolo-2-tione, eluito in 5 minuti, è stato rilevato con un detector UV visibile (YL Instrument 9300 HPLC System) a 365 nm.

3.2.3 Quantificazione della Vitamina K₁

Per la determinazione nel broccolo sono stati pesati 50 mg in una eppendorf e mescolati con 1 mL di etanolo per 30 secondi seguiti da 3 minuti di sonicazione per tre volte. 100 µl di estratto sono stati diluiti in 900 µl di etanolo. Una volta terminata una centrifugazione a 1200 g per 5 minuti a 4°C, il sovrinatante è stato recuperato e aliquotato.

Per la determinazione nel plasma, la vitamina K₁ è stata estratta aggiungendo 250 µL di etanolo a 50 µL di plasma. Successivamente il campione è stato mescolato tramite vortex per 30 secondi e poi centrifugato a 1200 g per 5 minuti a 4°C: il sovrinatante è stato recuperato e 40 µL sono stati iniettati nell'HPLC equipaggiato con due colonne: una colonna analitica Phenomenex Kinetex (C18 100 mm x 4.6 mm x 2.6 µm) e una colonna riducente a valle della precedente Shiseido CQ (20 x 2.0 mm I.D) in quanto la vitamina K₁, se ridotta, diviene fluorescente. Il flusso applicato è pari a 0,7 mL/min mentre la fase mobile è una soluzione di 97% etanolo:3% acqua distillata. Il detector a fluorescenza utilizzato è della Shiseido Nanospace SI-2 e le lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione sono rispettivamente di 335 e 430 nm.

3.2.4 Quantificazione dei carotenoidi

3.2.4.1 Estrazione dalla matrice alimentare

L'estrazione dei carotenoidi dalla matrice alimentare è stata realizzata secondo il metodo di *Biswas et al.* (2011) (102). In una provetta di vetro è stato accuratamente pesato 1 g di campione a cui sono stati aggiunti 5 mL di acetone refrigerato. Il campione, mantenuto per 15 minuti a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$, mescolato tramite vortex per 10 minuti ad alta velocità, è stato infine centrifugato a $189\times g$ per 10 minuti a 4°C . Il sovrinatante è stato raccolto in una nuova provetta. Nel campione è stata effettuata un'ulteriore estrazione aggiungendo di nuovo 5 mL di acetone refrigerato e seguendo i passaggi già descritti. Una volta riuniti, i sovrinatanti sono stati filtrati con un filtro di cellulosa rigenerata Sartorius ($0.45\mu\text{m}$). Il campione è stato portato a secco con un Rotavapor R-210 (Buchi- Svizzera) e risospeso con 0.5 mL di acetone.

3.2.4.2 Determinazione plasmatica

La determinazione dei carotenoidi nel plasma è stata eseguita secondo il metodo di *Chauveau-Duriot et al.* (2010) (103). Specificamente, 350 μL di plasma sono stati miscelati con 350 μL di etanolo. Successivamente sono stati aggiunti 800 μL di esano, miscelati e centrifugati a $189\times g$ di 5 minuti a 4°C .

In seguito, 700 μL del sovrinatante sono stati aliquotati in una nuova provetta troncoconica. Successivamente il campione rimanente è stato nuovamente estratto con l'aggiunta di 800 μL di esano,ripetendo le fasi descritte sopra. Infine entrambe le aliquote di sovrinatante sono state riunite. Il campione è stato portato a secco tramite azoto e poi risospeso con 100 μL di acetone. Il campione è stato centrifugato a 4°C ed il sovrinatante è stato aliquotato per l'analisi.

3.2.4.3. *Quantificazione all'UPLC*

Il metodo utilizzato per la quantificazione nel broccolo e nel plasma è quello proposto da *Chauveau-Duriot et al.* (2010) con una modifica che ha permesso di abbreviare i tempi di analisi (da 46 minuti a 20 min) (103). Come fase stazionaria è stata utilizzata la colonna Acquity UPLC BEH C18 (2.1 mm x 100 mm x 1.7 μm) mentre le due fasi mobili sono: una fase A costituita da una soluzione 75% acetonitrile: 10% diclorometano: 15% metanolo e una fase B di acetato d'ammonio in acqua. Il gradiente tra le due fasi è pari a 75:25 (A:B) da 0 a 10 minuti, 98:2 (A:B) da 10 a 11 minuti, 98:2 (A:B) fino a 20 minuti. Il flusso è stato di 0.4mL/min, la colonna è stata mantenuta a 35°C in apposito forno termostato e il caricamento dei campioni è stato realizzato a 20°C. L'analisi al detector è stata realizzata ad una lunghezza d'onda di 450

nm su una scansione dello spettro da 200 a 500 nm. I carotenoidi sono stati identificati comparando i tempi di ritenzione con quelli degli standard.

3.3 Reagenti

3.3.1 Standard K₁

La curva standard di taratura di vitamina K₁ è stata realizzata mediante solubilizzazione della molecola in etanolo fino a raggiungere un range di concentrazioni di 0.78-50 ng/mL.

3.3.2 Standard isotiocianati

La curva di taratura è stata ottenuta mediante l'impiego di una soluzione madre di 1.13 mg/mL (6.14 µM) ottenuta solubilizzando 1.7 mg di 1,3-benzoditiolo-2-tione in 1.5 mL di cloroformio. La soluzione madre è stata poi diluita 100 volte in acetonitrile:acqua deionizzata (1:1) ottenendo così una soluzione di 11.3 µg/mL (61.4 nM). Per lo standard più concentrato, 100 µL dello stock della soluzione 61.4 nM sono stati diluiti con 300 µL di acetonitrile:acqua (1:1); gli standard successivi sono stati ottenuti diluendo 1:1 (200 µL standard e 200 µL acetonitrile:acqua 1:1).

3.3.3 Analisi statistica

La determinazione delle molecole bioattive nel mini broccolo briot, per tutte le condizioni (il crudo, i conservati ed i cotti), è stata realizzata su 3 campioni e la quantificazione è stata eseguita in duplicato. Il plasma è stato analizzato in duplicato. I dati sono stati analizzati mediante T di student a due code per dati non appaiati. I risultati sono stati espressi come media \pm SEM e sono stati considerati significativamente diversi per $p \leq 0.05$ e altamente significativi per $p \leq 0.01$. La biodisponibilità plasmatica delle molecole bioattive studiate è stata anche espressa come area sottostante la curva (AUC) calcolata dal software GraphPadPrism® 6.0.

4 RISULTATI

4.1 Livelli di ITCs, luteina, β -carotene e vitamina K₁ nel mini broccolo briot

4.1.1 Valutazione dell'attività enzimatica in seguito ai trattamenti del mini broccolo briot

I glucosinolati, presenti nella loro forma inattiva nella pianta *Brassica oleracea*, vengono attivati in isotiocianati per idrolisi enzimatica, ad opera della mirosinasi, la quale viene liberata per azione meccanica (ad esempio masticazione o triturazione). Con l'obiettivo di comprendere se l'attività enzimatica potesse essere influenzata dai trattamenti di conservazione e di cottura dei broccoli previsti nel presente studio, i livelli di ITCs liberati dalla mirosinasi endogena sono stati confrontati a quelli ottenuti in seguito all'aggiunta di 2 mg della tioglucosidasi *Sinapis alba* esogena.

La **figura 19** mostra come, con e senza l'aggiunta dell'enzima esogeno, il livello degli isotiocianati nel crudo fresco, conservato a 4°C e a -20°C rimanga pressoché invariato: la conservazione non inattiva l'enzima. Al contrario, in seguito alla cottura, il livello di ITCs diminuisce drasticamente in tutte e tre le condizioni di conservazione: i dati ottenuti dimostrano che la mirosinasi

presente naturalmente nel broccolo viene inattivata o denaturata dai trattamenti termici (**Figura 20**). Si rende quindi necessario l'uso della tioglucosidasi esogena che infatti permette il rilevamento degli ITCs in entrambe le cotture.

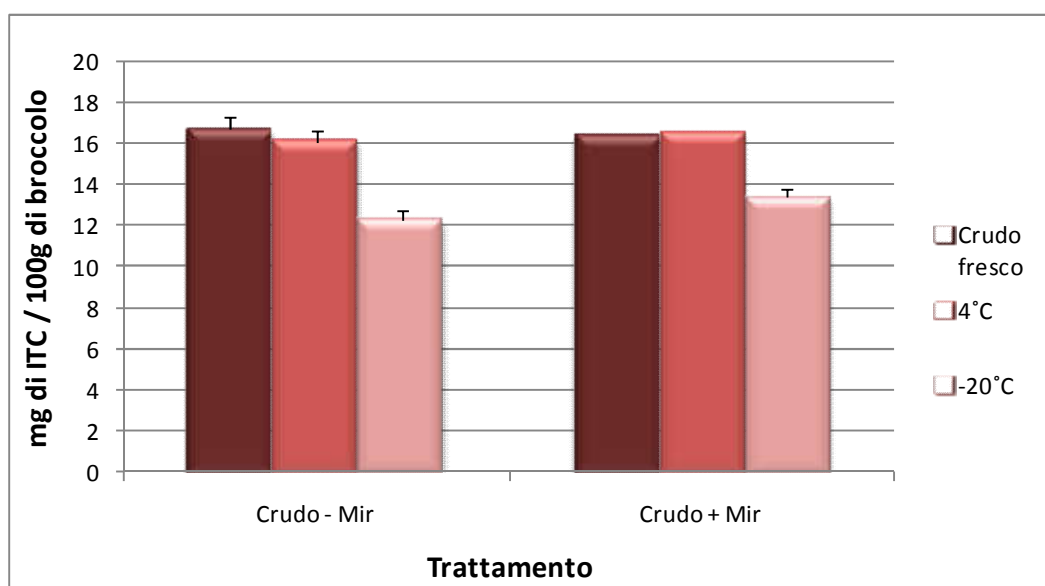


Figura 19 Determinazione dell'effetto dei trattamenti di conservazione sull'enzima endogeno.

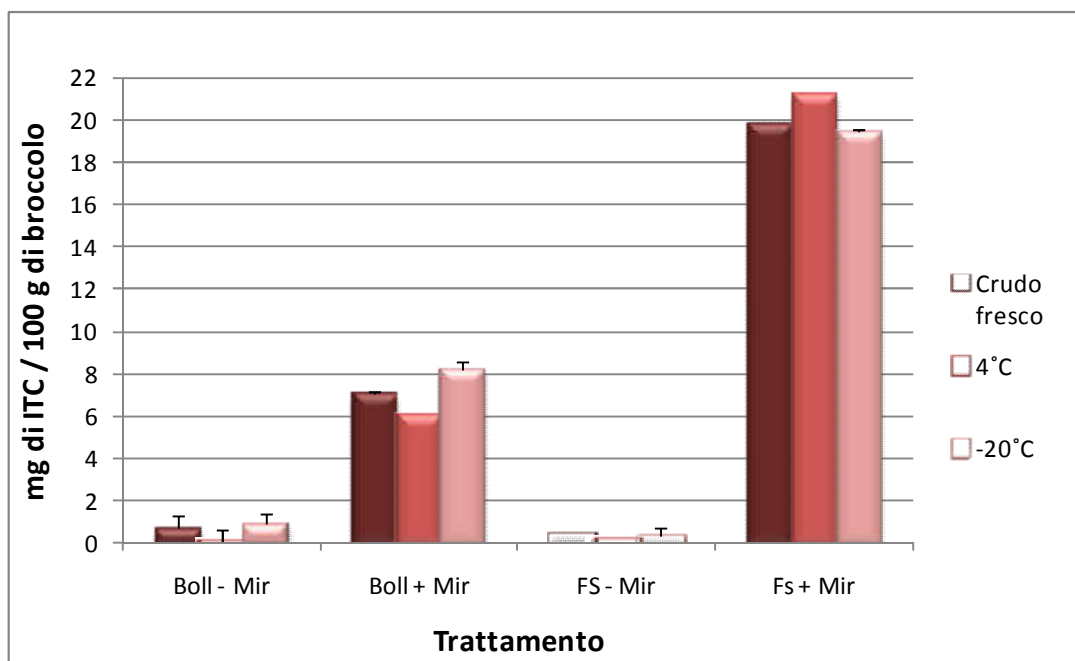


Figura 20 Determinazione dell'effetto dei trattamenti termici con e senza l'aggiunta dell'enzima *Sinapis alba* esogeno.

4.1.2 Livello degli isotiocianati nel mini broccolo briot

Poiché la valutazione dell'attività enzimatica ha dimostrato che la mirosinasi endogena è inattivata in seguito ai trattamenti termici impiegati per la cottura dell'ortaggio, la quantificazione dei livelli di ITCs nello stesso alimento è stata eseguita mediante incubazione con l'enzima esogeno.

Le analisi evidenziano un contenuto di isotiocianati pari a $23,3 \pm 1,6$ mg in 100 g di broccolo briot crudo fresco (**Figura 21**). Per raggiungere la quantità di 90 mg, che rappresenta il corrispettivo di 3 capsule BroccoMax® assunte

dai volontari, è stato calcolato un consumo di circa 400 grammi di ortaggio cotto.

Tuttavia, il livello di queste molecole, diminuisce in maniera altamente significativa in entrambe le condizioni di conservazione studiate, sebbene resti significativamente più elevato nel mini broccolo briot conservato per 15 giorni a -20°C ($18,5 \pm 0,9$ mg/100 g) rispetto a quello mantenuto a 4°C ($14,9 \pm 0,6$ mg/100 g; $p < 0,01$) (**Figura 21**). Pertanto, il metodo di conservazione del broccolo impiegato, precedente alle due cotture (bollitura e full steaming) è stato il congelamento.

Inoltre, il grafico dimostra come entrambi i trattamenti termici determinino un'ulteriore diminuzione altamente significativa degli ITCs, rispetto al crudo fresco e a quello congelato. Nonostante ciò, il full steaming è risultato essere in grado di determinare una perdita più contenuta di queste molecole rispetto alla bollitura (full steaming= $14,2 \pm 0,7$ mg/100 g, bollitura= $9,6 \pm 1,1$ mg/100 g; $p < 0,01$)

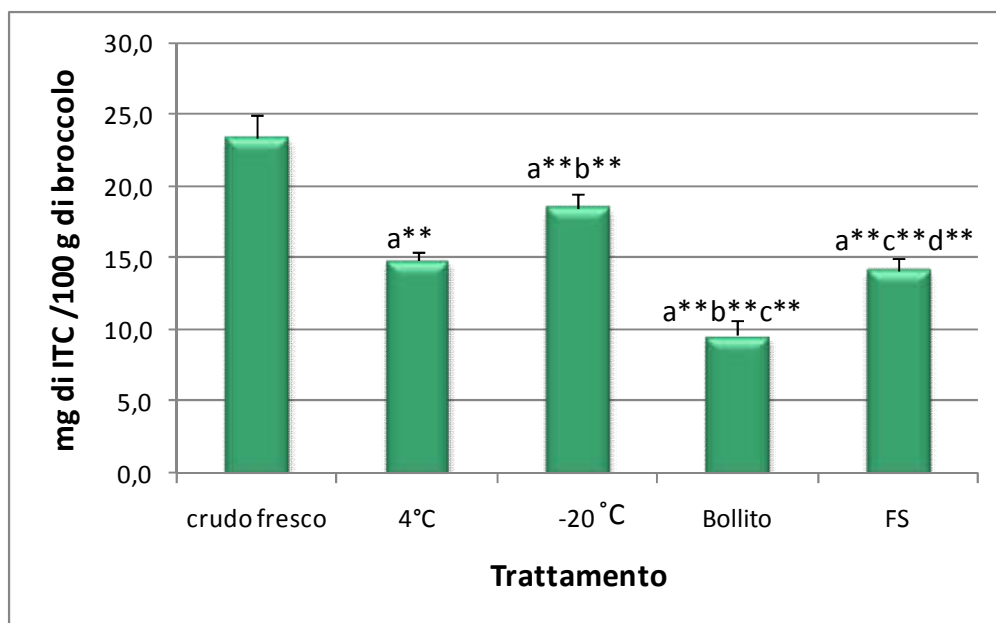


Figura 211 Livello degli ITCs nella matrice alimentare cruda e nella diverse condizioni di conservazione e cottura.

4.1.3 Livello di vitamina K_1 nel mini broccolo briot

I risultati ottenuti dimostrano come, indipendentemente dalla tipologia di conservazione del broccolo, i livelli di fillochinone rimangono pressoché costanti: $0,35 \pm 0,01$ mg/100 g nel conservato a 4°C, $0,35 \pm 0,09$ mg/100 g in quello congelato a -20°C. Allo stesso modo, i trattamenti termici eseguiti dopo 15 giorni di congelamento del prodotto non determinano variazioni significative dei livelli di questa molecola (**Figura 22**).

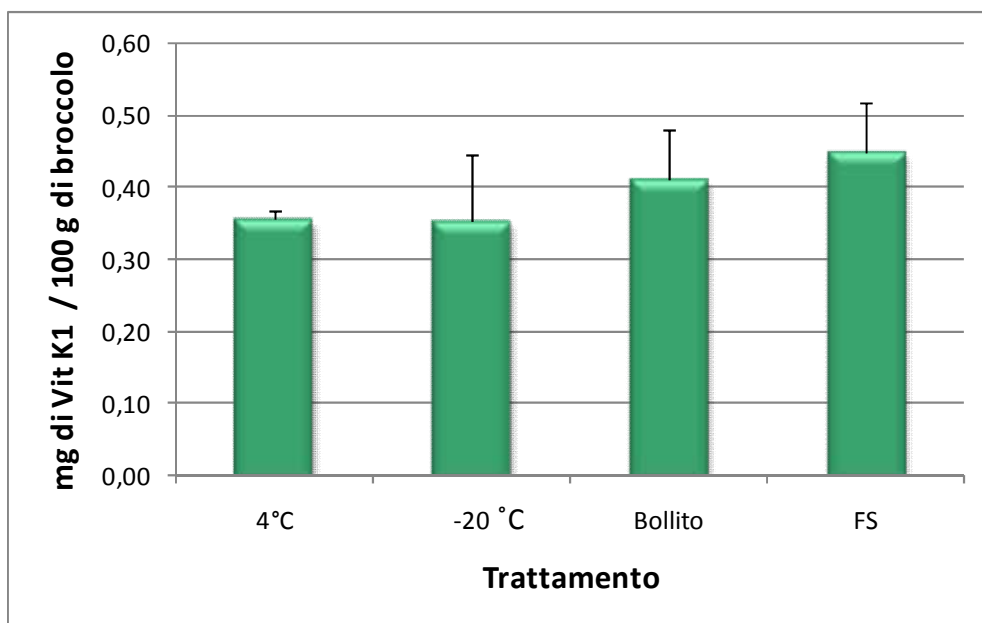


Figura 22 Livelli della vitamina K₁ nella matrice alimentare nelle diverse condizioni di conservazione e cottura.

4.1.4 Livello dei carotenoidi nel mini broccolo briot

Al contrario, per quanto riguarda i livelli dei carotenoidi studiati nell'ortaggio, entrambi i trattamenti termici hanno determinato un aumento sia di β -carotene che di luteina nel mini broccolo briot (**Figura 23**). Nel crudo il livello di β -carotene e di luteina è pari a $360,4 \pm 1,7$ e $383,8 \pm 1,7$ $\mu\text{g}/100\text{g}$, rispettivamente. In particolare la bollitura è risultata essere il metodo di cottura che più favoriva la disponibilità di queste molecole: si raggiunge infatti una quantità di β -carotene pari a $1194,9 \pm 6,8$ $\mu\text{g}/100\text{g}$ e di luteina pari a $1208,9 \pm 9,6$ $\mu\text{g}/100\text{g}$. I carotenoidi quantificati nel full steaming sono

invece pari a $565,1 \pm 4,8$ $\mu\text{g}/100\text{g}$ di β -carotene e $656,1 \pm 8,1$ $\mu\text{g}/100\text{g}$ di luteina. La quantificazione nel broccolo conservato a 4°C non è stata realizzata in quanto, sulla base dei risultati ottenuti per gli isotiocianati, era stato scelto il congelamento come metodo di conservazione.

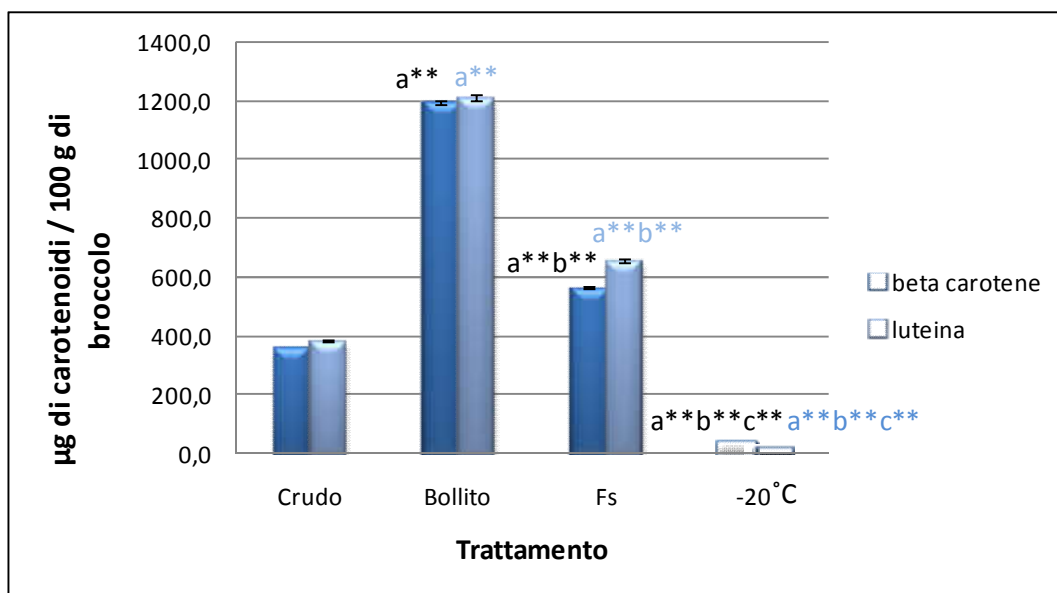


Figura 22 Livello della luteina e del β -carotene nella matrice alimentare nelle diverse condizioni di conservazione e cottura.

4.2 Biodisponibilità plasmatica di ITCs, luteina, beta-carotene e vitamina K_1

4.2.1 Biodisponibilità plasmatica di isotiocianati

Nel presente lavoro sono stati valutati i livelli plasmatici di ITCs basali e dopo 3/6/12/24 ore dall'assunzione di 400 g di mini broccolo briot bolliti o cotti al

vapore. Per quanto riguarda la loro biodisponibilità, nel presente studio sono stati confrontati i due metodi di cottura e la supplementazione tramite integratore BroccoMax®. La **Figura 24** dimostra che, rispetto al basale, i livelli di queste molecole bioattive sono aumentate in maniera altamente significativa almeno fino a 12 ore dopo l'assunzione sia dell'ortaggio cotto che dell'integratore. Tuttavia dal calcolo dell'AUC totale per ciascuna curva si evince che l'integratore determina un maggior aumento plasmatico di ITCs (450,1) mentre la cottura al vapore e la bollitura presentavano un AUC pari a 417,4 e 175,3, rispettivamente. La differenza tra l'AUC di BroccoMax® rispetto a quella del bollito è altamente significativa ($p = 0,003$) mentre non lo è rispetto a quella del full steaming. Le AUC degli ITCs del plasma del bollito e del full steaming risultano significativamente diverse ($p < 0,05$).

Inoltre sono state calcolate le significatività tra le diverse condizioni di assunzione. Le differenze mostrate da BroccoMax® rispetto al full steaming sono altamente significative a 3 h ($p < 0,01$) e significative a 12 e 24 h mentre rispetto al bollito sono altamente significative a 3, 6 e 12 h. Le differenze tra il bollito ed il full steaming sono altamente significative a 6-12-24 h.

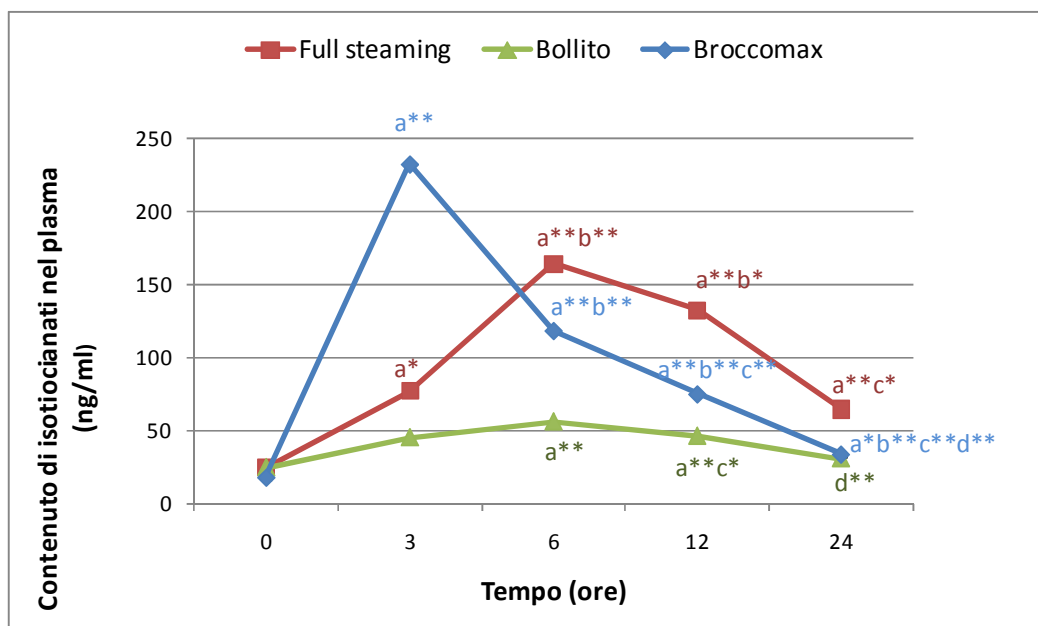


Figura 234 Biodisponibilità plasmatica di isotiocianati al tempo 0 e dopo 3-6-12-24 ore dalla somministrazione di BroccoMax®(in blu) o di 400 g di broccoli bolliti (in verde) e cotti al vapore (in rosso).

4.2.2 Biodisponibilità plasmatica di vit. K_1

La **Figura 25** mostra come il consumo dell'ortaggio abbia determinato un aumento significativo della molecola in tutti i punti della curva rispetto al tempo 0, ad esclusione dell'ultimo prelievo (24 ore dopo) in cui i livelli di vit K_1 sono tornati a quelli basali. Le curve di biodisponibilità del fillochinone sono molto simili per le due cotture. In particolare, per entrambe il picco massimo di assorbimento è a 6 h ed il valore dell'AUC per il bollito è pari a 18,7 mentre quello del full steaming è di 16,7. La differenza di AUC, sebbene statisticamente non significativa, è legata ad una maggiore biodisponibilità di

questa molecola dopo 3ore dall'assunzione del broccolo bollito ($6,4 \pm 3,9\text{ng}/100\text{g}$) rispetto a quello cotto al vapore ($3,9 \pm 1,3 \text{ ng}/100\text{g}$).

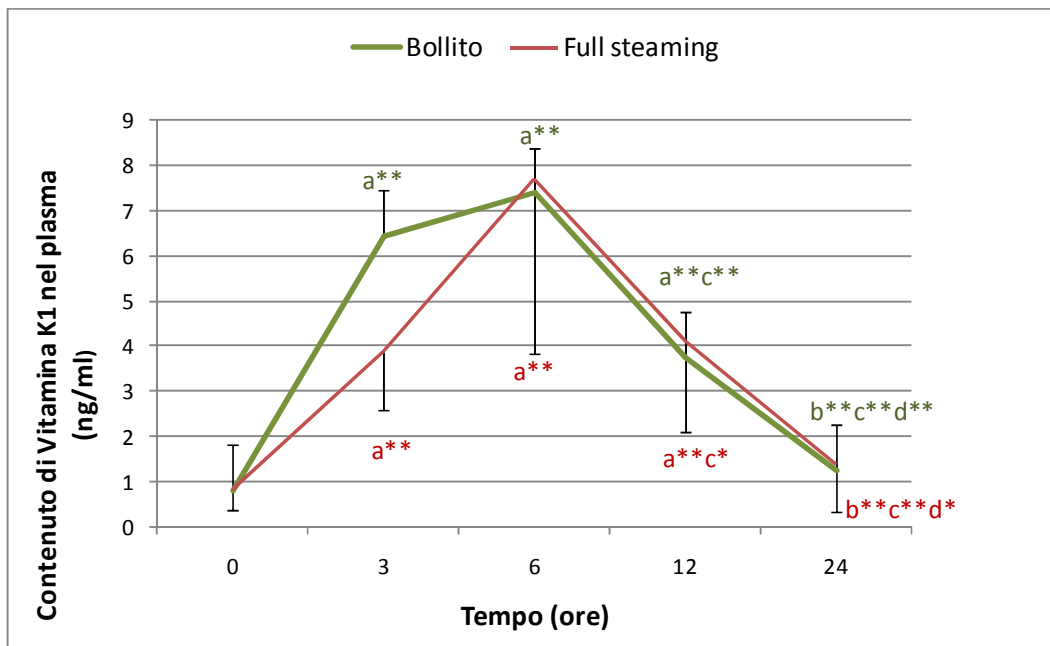


Figura 25 Biodisponibilità plasmatica di Vit. K₁ al tempo 0e dopo 3-6-12-24 ore dalla somministrazione di 400 g di broccoli bolliti (in verde) e cotti al vapore (in rosso).

4.2.3 Biodisponibilità plasmatica di β -carotene e luteina

Infine, sono stati valutati i livelli plasmatici di β -carotene e luteina, carotenoidi particolarmente diffusi nel broccolo. Come è possibile notare dalle **Figure 26** e **27**, l'assunzione di 400 g di ortaggio non ha determinato alcun aumento dei livelli plasmatici di entrambe le molecole nei tempi previsti

dallo studio, indipendentemente dalla tipologia di trattamento termico utilizzato. Al contrario, i livelli di β -carotene dopo 3/12/24 h dall'assunzione del broccolo cotto al vapore diminuivano significativamente rispetto al tempo 0, mentre la bollitura ha determinato piccole variazioni non significative (Figura 26). Per quanto riguarda la quantità di luteina plasmatica, le due cotture non hanno determinato variazioni significative rispetto al livello basale, sebbene dopo 12 ore dall'assunzione del broccolo bollito sia stato registrato un incremento significativo rispetto ai livelli di luteina raggiunti dopo 3 e 6 ore (Figura 27).

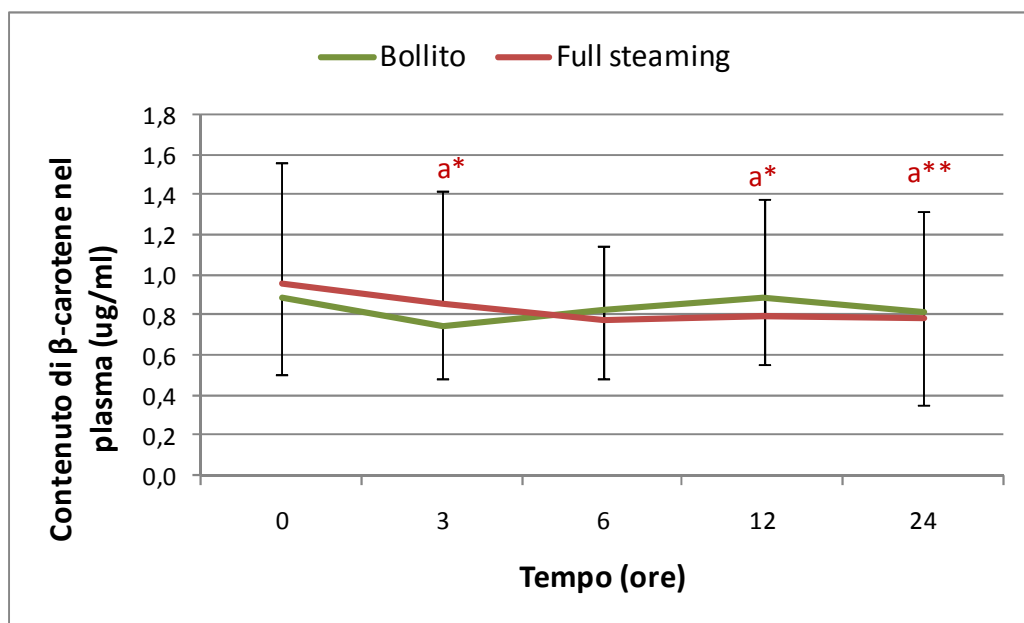


Figura 24 Biodisponibilità plasmatica del β -carotene al tempo 0 e dopo 3-6-12-24 ore dalla somministrazione di 400 g di broccolo bollito (in verde) o cotti al vapore (in rosso).

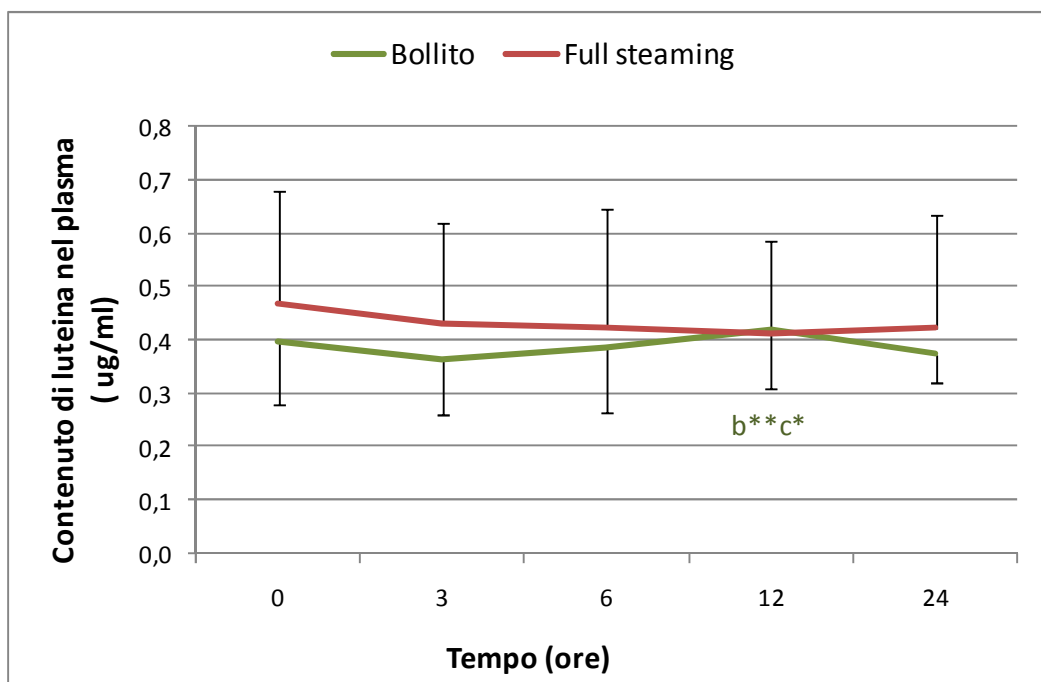


Figura 25 Biodisponibilità plasmatica della luteina al tempo 0 e dopo 3-6-12-24 ore dalla somministrazione di 400 g di broccolo bollito (in verde) o cotti al vapore (in rosso).

5 DISCUSSIONE

L'identificazione della dieta come un elemento cruciale, non solo nel mantenimento di un buono stato di salute, ma anche nella prevenzione di numerose condizioni patologiche, molte delle quali riconosciute tra le più comuni cause di decesso nell'uomo, quali cancro e malattie cardiovascolari (CVDs), ha stimolato la ricerca in campo nutrizionale e sensibilizzato l'opinione pubblica nella promozione di uno stile di vita sano basato su un'alimentazione equilibrata e variegata. In questo senso gli alimenti funzionali, in grado di migliorare il benessere dell'organismo grazie alla capacità di modulare processi fisiologici oltre a quella nutrizionale, hanno subito uno sviluppo vertiginoso in tutto il mondo, con un mercato stimato intorno ai 304.5 miliardi di dollari nel 2020 (104). Un alimento può essere reso funzionale mediante il processo tecnologico di fortificazione, messo in atto dalle industrie alimentari, che permette l'aggiunta di una o più molecole bioattive per le quali le funzioni fisiologiche sono state scientificamente dimostrate. Tuttavia molti prodotti sono naturalmente funzionali in quanto già ricchi di per se di questi composti. Tra questi le *Brassicaceae* sono sicuramente tra i più conosciuti, non solo per la presenza di vitamine, sali minerali e carotenoidi, ma principalmente per l'elevato contenuto di

glucosinolati da cui derivano gli isotiocianati (ITCs). In particolare, il broccolo (*Brassica oleracea* var. *italica*) riveste un ruolo di spicco perché contiene elevati livelli del glucosinolato “glucorafanina”, precursore del sulforafano, oltre che di vitamina K₁, β-carotene e luteina. Gli isotiocianati presentano spiccate capacità antitumorali, antiossidanti ed antiinfiammatorie e il sulforafano, dal canto suo, non solo è quello più attivo ma anche uno dei più potenti induttori degli enzimi citoprotettivi di fase II: a conferma di ciò, in uno studio, *Posner et al.* (1994) hanno valutato questa sua abilità paragonandolo a circa 100 analoghi strutturali sintetici, nessuno dei quali si è dimostrato in grado di eguagliarlo (105, 106). Se da un lato si raccomanda costantemente una dieta diversificata, con particolare attenzione al consumo di alimenti ricchi in molecole bioattive e fitochimici, privilegiando frutta e verdura (come il broccolo per i glucosinolati o GLS), dall’altro le fasi di cui si compone la catena alimentare (dalla raccolta ai trattamenti di conservazione o termici), possono alterarne quantità e qualità. Inoltre possono sussistere delle condizioni per cui è necessario limitare il consumo di questi alimenti (ad esempio intolleranze e allergie) o per le quali ci sia una richiesta supplementare di specifiche molecole bioattive (ad esempio durante la gravidanza o in alcune specifiche patologie). In questo contesto gli integratori alimentari, intesi come prodotti non convenzionali (pillole, capsule) in grado

di far fronte a carenze o richieste aumentate di uno o più composti, giocano un ruolo fondamentale.

Lo scopo del lavoro è stato quello di valutare il contenuto degli ITCs confrontando due trattamenti termici, bollitura (per 12 minuti) e full steaming (cottura a vapore a 95°C per 27 minuti) e di comparare la loro biodisponibilità in seguito all'assunzione del broccolo cotto e di un integratore alimentare (BroccoMax®). In aggiunta è stata studiata anche la risposta del fillochinone e dei carotenoidi ai trattamenti e la loro biodisponibilità dopo l'assunzione del broccolo cotto.

Dai risultati emerge un contenuto di isotiocianati pari a $23,3 \pm 1,6$ mg in 100 g di mini broccolo briot crudo. Tuttavia è noto che la quantità ed i vari tipi di glucosinolati espressi nelle *Cruciferae* (e di conseguenza dei derivati ITCs) variano in funzione del genotipo, delle condizioni ambientali, delle modalità di coltivazione, del tempo di raccolta, nonché dal packaging e da eventuali trattamenti tecnologici subiti (13).

Sebbene la conservazione abbia determinato una diminuzione significativa dei livelli di ITCs, nel presente studio il congelamento si è dimostrato essere il metodo che meglio preserva queste molecole. *Ciešlik et al.* (2007) ad esempio, non hanno riscontrato variazioni importanti di glucorafanina a

-20°C, e GLS diversi mostrano una resistenza diversa alla temperatura dovuta alla struttura chimica (107). Di contro, quando i broccoli sono stati conservati in un refrigeratore domestico, il contenuto dei GLS totali e individuali diminuisce in una settimana. Dopo 5 giorni a 4° C si assiste ad una perdita dei GLS totali tra il 4-16% con una diminuzione di glucorafanina del 31%; dopo 7 giorni i GLS totali scendono dal'11 al 20% con una diminuzione di glucoiberina pari al 40-50% (108, 109). Pertanto il metodo di conservazione scelto è stato il congelamento a -20°C per 15 giorni ed è stata calcolata la quantità di broccoli cotti da assumere: i 90 mg di glucosinolato glucorafanina contenuti in 3 pastiglie (quantità consigliata) di BroccoMax® si trovano in 400g di broccolo crudo.

Prima di procedere con la supplementazione, è stata eseguita una prova preliminare in cui sono stati quantificati gli ITCs senza l'incubazione dei broccoli cotti con una mirosinasi esogena dimostrando che entrambi i trattamenti termici utilizzati abbattano l'attività dell'enzima, che si trova sia accumulato nei vacuoli della pianta e liberato come meccanismo di difesa, che nell'intestino dell'uomo dove è prodotto dalla flora batterica. Essendo responsabile della conversione dei glucosinolati in ITCs, la sua inattivazione, dovuta alle cotture, ha causato una diminuzione dei livelli di ITCs nei broccoli. A conferma di ciò, diversi studi hanno dimostrato che la mirosinasi

estratta dal broccolo rimane attiva fino ad una temperatura di 40°C, con un optimum a 30°C (110, 111). Con l'aggiunta dell'enzima esogeno, il full steaming è risultato essere il metodo di cottura migliore dei broccoli poiché, sebbene abbia determinato una diminuzione significativa del livello di isotiocianati rispetto al crudo fresco e al conservato a -20°C, resta comunque più elevato del bollito. *Pellegrini et al* (2010) hanno osservato un trend molto simile dimostrando che, mentre il livello dei GLS totali non varia cuocendo il broccolo fresco per 13 minuti col metodo del full steaming, esso diminuisce in un prodotto congelato dopo una cottura di 12 minuti: il differente comportamento rispetto al fresco è stato motivato dai trattamenti precedenti ai quali è stato sottoposto il prodotto (congelamento) (112), dato confermato anche nel presente lavoro. Il full steaming si è rivelata una cottura in grado di preservare ed, in alcuni casi, venti minuti di cottura non hanno determinato alcuna riduzione di GLS (109, 113, 114). La risposta al trattamento termico dei singoli GLS risulta, tuttavia, diversa: mentre non si osservano variazioni di glucorafanina, il contenuto di glucobrassicina diminuisce del 41% dopo 3.5 minuti di trattamento (115). Non solo i GLS ma anche i fenoli e i polifenoli non risentono di questo tipo di cottura: il full steaming rientra pertanto tra le più comuni modalità di cottura dei vegetali sia in Nord America che in Europa grazie alla capacità dimostrata nel preservare le molecole contenute negli

alimenti (116).

Al contrario di quanto emerso per gli isotiocianati, nel presente studio i trattamenti termici hanno determinato un aumento del livello di luteina e β -carotene, con una biodisponibilità più elevata per la bollitura. Lo studio di *Miglio et al.* (2008) avvalorava i nostri risultati con un aumento dei carotenoidi nel broccolo pari a +32% e +19% per il bollito e il full steaming, rispettivamente; un aumento dei carotenoidi in seguito alla bollitura è stato osservato anche nella carota (+14%) rispetto al crudo (114). Vi è invece una discrepanza coi risultati ottenuti da *Pellegrini et al.* (2010) che hanno rilevato una diminuzione della luteina del 33% rispetto al fresco (112). Nonostante ciò, la letteratura sembra confermare l'efficienza delle cotture nell'aumentare il contenuto dei carotenoidi, in linea con il pensiero di *Wash et al.* (2015), secondo cui i trattamenti termici incrementano la biodisponibilità di queste molecole, determinando l'inattivazione degli enzimi nella matrice alimentare, la sua degradazione e la scissione dei complessi proteina-carotenoidi (112, 117). La diminuzione del rilevamento dei carotenoidi con l'HPLC dopo la conservazione a -20°C è supportata dalla letteratura (118, 119).

Per ciò che riguarda la vitamina K₁, essa risulta essere la molecola meno condizionata sia dai trattamenti di conservazione che termici. In letteratura la stabilità della molecola a -20°C (per 7 giorni) è stata confermata nelle bacche

e nel succo di olivello spinoso, nel latte, nei vegetali e negli oli vegetali (120). Gli effetti delle cotture mostrano risultati diversi in base alla matrice alimentare: mentre la cottura al microonde ne modula un decremento sia nella margherita corona che nella malva, nei broccoli, nelle patate classiche e dolci, nella bietola, nelle carote, negli spinaci nelle zucchine, nelle cipolle e nelle foglie di perilla il microonde, la sbollentatura, il full steaming e la bollitura ne determinano un aumento (121). Questo incremento può essere dovuto al rilascio della vitamina K₁ dai cloroplasti della pianta: causando la rottura della parete cellulare, i trattamenti di calore liberano la molecola e la rendono disponibile all'estrazione.

Per quanto riguarda la biodisponibilità delle molecole bioattive oggetto di studio, essa è stata valutata dopo 3, 6, 12 e 24 ore dalla somministrazione di 400 g di broccoli cotti in soggetti sani. Inoltre, il livello plasmatico di ITCs è stato confrontato con quello raggiunto in seguito alla supplementazione di 3 capsule di integratore contenente 90 mg di sulforafani, ossia il corrispettivo del contenuto di ITCs quantificato in 400 g di broccoli crudi. Dall'analisi degli ITCs nel plasma emergono diverse evidenze. Nello specifico i valori di AUC di BroccoMax® e del full steaming non sono risultati significativamente diversi tra loro, sebbene evidenzino una farmacocinetica differente: l'integratore determina un picco massimo di assorbimento dopo tre

ore dall'assunzione e raggiunge quasi i livelli basali nell'arco delle 24 ore; differentemente, i livelli massimi plasmatici di ITCs vengono raggiunti dopo 6 ore dall'assunzione del broccolo cotto a vapore e diminuiscono in seguito molto lentamente, rimanendo in concentrazioni alte dopo 24 ore. In termini farmacocinetici va sottolineato che l'effetto del composto è considerato essere tanto più marcato quanto più è elevato il picco, indipendentemente dal tempo di comparsa: nel nostro caso il picco dell'integratore è significativamente superiore e l'assunzione frazionata nel tempo piuttosto che in acuto (come nel presente lavoro) delle tre capsule potrebbe favorire una maggiore permanenza nell'organismo. Dall'assunzione del broccolo bollito risulta un incremento minimo, sebbene significativo, dei livelli di ITCs nel sangue.

Un ulteriore dato che emerge dalla nostra sperimentazione è la presenza degli ITCs nel plasma dei soggetti, nonostante i nostri dati abbiano dimostrato che i trattamenti termici inattivino la mirosinasi della pianta: ciò è dovuto all'attività della tioglucosidasi intestinale. *Cheng et al.* (2004) hanno osservato come la sinigrina e la glucotropaeolina siano idrolizzate *in vitro* da tre specie di bifidobatteri di origine umana (122). Diversi studi documentano la capacità ed il contributo della tioglucosidasi prodotta dal microbioma umano nell'idrolisi dei GLS: in una ricerca *Gethaun et al.* (1999) evidenziano un incremento lineare nella formazione di ITC dall'incubazione (anaerobiosi e

a 37°C) di un succo di erba cotta, contenente GLS ma MIR inattiva, con feci umane fresche; inoltre la riduzione della microflora tramite pulizia meccanica ed antibiotici conduce ad un decremento significativo dei ditiocarbammati nell'urina dal 47% a una quantità trascurabile (123, 124).

Allo stesso tempo è stata dimostrata anche l'importanza dell'attività enzimatica della mirosinasi presente nell'alimento nella conversione dei glucosinolati in isotiocianati. Nello specifico *Clarke et al.* (2011) hanno paragonato la biodisponibilità degli ITCs ottenuta in seguito all'assunzione di 40g di germogli di broccoli freschi (contenenti quindi l'enzima) e 6 pastiglie di BroccoMax® la cui formulazione non prevedeva ancora la presenza della mirosinasi. Lo studio dimostrava una concentrazione molto più elevata di ITCs nel sangue e di ditiocarbammati nelle urine col consumo dei broccoli piuttosto che dell'integratore. L'assenza dell'enzima nella formulazione dell'integratore non ha permesso la stessa efficienza di conversione dei glucosinolati in ITCs dei germogli freschi (125).

Degno di interesse è sicuramente il tempo del picco degli ITCs che per entrambe le cotture è a 6 h mentre per l'integratore a 3h: ciò è dovuto al fatto che, vista l'inattivazione della MIR endogena con la cottura, i GLS per essere idrolizzati e quindi assorbiti devono raggiungere la microflora intestinale; al contrario la presenza dell'enzima e del GLS glucorafanina nelle pastiglie

provoca un'idrolisi, un rilascio e quindi un possibile assorbimento in tempi minori e senza il coinvolgimento della microflora. Infatti sembra che l'efficienza di assorbimento del sulforafano (SLF) liberato nel tratto gastrointestinale superiore sia maggiore rispetto a quella del colon (126). Per di più la microflora si dimostra capace di metabolizzare gli ITCs o di convertirli in molecole diverse, come le ammine, impedendone quindi l'assorbimento (127, 128). Nonostante l'efficienza della tioglucosidasi umana nell'idrolisi degli GLS sia ampiamente comprovata, risulta comunque inferiore rispetto a quella naturale, il cui contributo è più rilevante (13, 125).

I nostri risultati, in accordo con altre evidenze scientifiche, confermano come la bollitura sia un metodo di cottura estremamente deleterio nel caso del broccolo, causando una perdita importante di GLS: ciò è probabilmente dovuto alla natura idrofila dei GLS che quindi si solubilizzano nell'acqua di cottura. La perdita dei GLS varia in risposta a diversi fattori quali la specie, la dimensione dei pezzi, la quantità di acqua, il tempo di cottura ed anche il tipo GLS. Alcuni autori hanno dimostrato che una bollitura di 30 minuti causa un decremento dei GLS del 77% nei broccoli, mentre nei cavoletti di Bruxelles solo del 58%; il cavolo bollito perde un contenuto di GLS >50% se tritato e solo del 28% se le foglie sono cotte intere (13, 129). Nel presente studio una bollitura di 12 dei mini broccoli briot ha determinato una diminuzione del

48% di ITCs. Il full steaming, come sottolineato in precedenza, ha causato una perdita di circa il 23% di queste molecole, dimostrando un potere di ritenzione maggiore: pertanto la tioglucosidasi intestinale nel caso del broccolo bollito ha meno substrato da idrolizzare, carenza che si traduce in un livello più basso di ITCs nel plasma dei partecipanti.

Per quanto riguarda la biodisponibilità della vitamina K₁, dal presente studio non sono emerse differenze tra le due cotture sottolineando come, questa molecola lipofila, non risenta del trattamento termico impiegato. Inoltre, diversamente da quanto visto con gli ITCs, i livelli plasmatici di fillochinone raggiungono i valori basali, grazie ad una veloce captazione epatica. Tuttavia, il picco osservato a 6 ore è discordante con lo studio di *Garber et al.* (1999) (con l'assunzione di 150 g di broccolo cotto al full steaming per 20 minuti ha riscontrato un picco di assorbimento dopo circa 3 h) ma confermato da *Novotny et al.* (2010) (assunzione di 400 g di kale cotto al microonde con 30g di olio vegetale) e *Kurilich et al.* (2003) (130-132).

Al contrario, dopo l'assunzione di 400g di broccolo i valori di β -carotene e luteina non subiscono variazioni nel sangue, con valori fluttuanti intorno al baseline, manifestando una bassa biodisponibilità; questo risultato è in accordo con quello ottenuto da *Brown et al.* (1989) dopo l'assunzione di 600g di broccolo cotto (133).

6 CONCLUSIONI

In conclusione il presente studio dimostra come, gli usuali trattamenti di conservazione e termici cui sottoponiamo il broccolo nella vita quotidiana, abbiano conseguenze rilevanti in termini di glucosinolati totali, le principali molecole bioattive presenti nell'ortaggio: entrambi i trattamenti, infatti, hanno determinato un significativo decremento nel livello di queste molecole. Ciononostante, nell'impossibilità di consumare il broccolo fresco e crudo, la conservazione a -20°C e la successiva cottura full steaming sono risultati essere i migliori trattamenti da impiegare per ridurre la perdita di queste sostanze. D'altro canto, la supplementazione con l'integratore BroccoMax® non solo rappresenta il modo più semplice per assumere gli ITCs piuttosto che consumare quotidianamente quantità non indifferenti di broccoli, ma determina anche una miglior biodisponibilità degli stessi. Inoltre, al contrario delle *Brassicaceae*, questo integratore è costituito esclusivamente da glucorafanina, precursore del sulforafano, l'isotiocianato più attivo. Infine, dal presente lavoro non sono emerse differenze sulla biodisponibilità di beta-carotene, luteina e fillochinone correlate ai due metodi di cottura oggetti di studio.

Malgrado il consumo abbondante e variegato di frutta e verdura resti alla base di una sana alimentazione, la supplementazione con integratore alimentare, la cui formulazione preveda la presenza della mirosinasi, è consigliabile per massimizzare la biodisponibilità plasmatica di isotiocianati.

7 BIBLIOGRAFIA

1. **Stiefel, M., Shaner, A., Schaefer, S.D.** The Edwin Smith Papyrus: The Birth of Analytical Thinking in Medicine and Otolaryngology. *The laryngoscope* 116:182–188. 2006
2. **Katarzyna, B.L., Katarzyna, C.** The industrial potential of herbs and spices a mini review. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* 15:353–365. 2016
3. **Martirosyan, D.M., Singh, J.** A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique?. *Functional Foods in Health and Disease* 5:209-223. 2015
4. **Khalid, G., Singh A.K., Jabeen, R.** Nutraceuticals and Functional Foods: The Foods for the Future World. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56:2617–2627. 2016
5. **Nicoletti, M.** Nutraceuticals and botanicals: overview and perspectives *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 63:2–6. 2012
6. **Barberan, F.T., Osorio, C.** Advances in Health-Promoting Food Ingredients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67:9121-9123. 2019
7. **Onwulata C.I.** Encapsulation of New Active Ingredients*. *Annual Review of Food Science and Technology* 3:183-202. 2012
8. **Santini, A., Cammarata, S.M., Capone, G., Ianaro, A., Tenore G.C., Pani, L., Novellino, E.** Nutraceuticals opening the debate for a regulatory framework *British Journal of Clinical Pharmacology. British Journal of Clinical Pharmacology* 659-672. 2018

9. **Liu, R.H.** Dietary Bioactive Compounds and their Health Implications. *Journal of food Science* 78 Suppl 1:18-25. 2013
10. **Liu, R.H.** Health Promoting Components of fruits and vegetables in the diet. *Advances in Nutrition* 4:384-392. 2013
11. **Björkman, M., Klingen, I., Birch, A., Bones, A.M., Bruce, T., Johansen, T., Meadow, R., Mølmann, J., Seljåsen, R., Smart, L., Stewart, B.** Phytochemicals of Brassicaceae in plant protection and human health – Influences of climate, environment and agronomic practice. *Phytochemistry* 72:538–556. 2011
12. **Ares, A.M., Nozal, M.J., Bernal, J.** Extraction, chemical characterization and biological activity determination of broccoli health promoting compounds. *Journal of Chromatography A* Oct 25;1313:78-95. 2013
13. **Verkerk, R., Schreiner, M., Krumbein, A., Ciska, E., Holst, B., Rowland, I., De Schrijver, R., Hansen, M., Gerh, C., Mithen, R., Dekker, M.** Glucosinolates in Brassica vegetables: The influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health. *Molecular Nutrition and Food Research* 53:219–265. 2009
14. **Pagliaro, B., Santalomazza, C., Simonelli, F., Rubattu, S.** Phytochemicals compounds and protection from cardiovascular disease: a state of the art. *BioMed Research International* Article ID 918069, 17 pages. 2015
15. **Ritz, A., Wan, J., Diaz-Sanchez, D.** Sulforaphane stimulated phase II enzyme induction inhibits cytokine production by airway epithelial cells stimulated with diesel extract. *The American Journal of Physiology—Lung Cellular and Molecular Physiology* 1:33–39. 2007

16. **Murashima, M., Watanabe, S., Zhuo, X.G., M., Uehara, M., Kurashige, A.** Phase 1 study of multiple biomarkers for metabolism and oxidative stress after one-week intake of broccoli sprouts. *BioFactors* no. 1–4: 271–275. 2004
17. **Jaafaru, M., Karim, N.A.A., Enas, M.A., Rollin, P., Mazzon, E., Razis, A.F.A.** Protective Effect of Glucosinolates Hydrolytic Products in Neurodegenerative Diseases (NDDs). *Nutrients* 2018, 10, 580
18. **Hwang, I.S., Lee, J., Lee, D.G.** Indole-3-carbinol generates reactive oxygen species and induces apoptosis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 34:1602-8. 2011
19. **Fahey, J.W., Haristoy, X., Dolan, P.M., Kensler, T.W., Scholtus, I., Stephenson, K.K., Talalay, P., Lozniewski, A.** Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *PNAS* 28:7610-7615. 2002
20. **Le , T.L., Chiu, C-H., Hsieh P-C.** Bioactive compounds and bioactivities of *Brassica oleracea* L. var. *Italica* Sprouts and Microgreens: an updated overview from a nutraceutical perspective. *Plants*, 9: 946. 2020
21. **Shearer, M.J., McBurney, A., Barkhan, P.** Studies on the absorption and metabolism of phylloquinone (vitamin K₁) in man. Department of Haematology. Guy's Hospital. London. England. 1974
22. **Almquist, H.J., Stockstad, E.L.R.** Hemorrhagic chick disease of dietary origin. *Journal of Biological Chemistry* 111:105-113. 1935
23. **Brettel, K., Sétif, P., Mathis, P.** Flash-induced absorption changes in photosystem I at low temperatures: evidence that the electron acceptor A1 is vitamin K1. *FEBS Lett* 203:220-224. 1986

- 24. Sigfridsson, K., Hansson, O., Brzezinski, P.** Electrogenic light reactions in photosystem I: resolution of electron-transfer rates between the iron-sulfur centers. *Proceedings of National Academy of Science USA* 92:3458–3462. 1995
- 25. Basset, G.j., Latimer, S., Fatihi, A., Soubeyrand, E., Block, A.** Phylloquinone (Vitamin K1): Occurrence, Biosynthesis and Functions. *Mini Review in Medicinal Chemistry* No. X. 2016
- 26. Mimuro, M., Tsuchiya, T., Inoue, H., Sakuragi, Y., Itoh, Y., Gotoh, T., Miyashita, H., Bryant, D.A., Kobayashi, M.** The secondary electron acceptor of photosystem I in *Gloeobacter violaceus* PCC7421 is menaquinone-4 that is synthesized by a unique but unknown pathway. *FEBS Lett* 579:3493-3496. 2005
- 27. Yoshida, E., Nakamura, A., Watanabe, T.** Reversed-phase HPLC determination of chlorophyll *a'* and naphthoquinones in photosystem I of red algae: Existence of two menaquinone-4 molecules in photosystem I of *Cyanidium caldarium*. *Analytical Science* 19: 1001-1005. 2003
- 28. Stenflo, J., Fernlund, P., Egan, W., Roepstorff, P.** Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin. *Proceedings of National Academy of Science USA* 71:2730-2733. 1974.
- 29. Chu, P.H., Huang, T.Y., Williams, J., Stafford, D.W.** Purified vitamin K epoxide reductase alone is sufficient for the conversion of vitamin K epoxide to vitamin K and vitamin K to vitamin KH₂. *Proceedings of National Academy of Science USA* 103:19308-19313. 2006
- 30. Shearer MJ.** Vitamin K and vitamin K-dependent proteins. *British Journal of Haematology* 75:156-162. 1990

- 31. Cancela, M.R., Laizé, V., Conceição, N.** Matrix Gla protein and osteocalcin: From gene duplication to neofunctionalization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 561: 56-63. 2014
- 32. Lombardi, G., Perego, S., Luzi, L., Banfi, G.** A four-season molecule: osteocalcin. Updates in its physiological roles. *Endocrine* 48:394-404. 2014
- 33. Bolton-Smith, C., Price, R.J.G., Fenton, S.T., Harrington, D.M., Shearer, M.J.** Compilation of a provisional UK database for the phylloquinone (vitamin K₁) content of foods. *British Journal of Nutrition* 83:389-399. 2000
- 34. Karamzad, N., Maleki, V., Carson-Chahhoud, K., Azizi, S., Sahebkar, A., Gargari, B.P.** A systematic review on the mechanism of vitamin K effects on the complications of diabetes and pre-diabetes. *Biofactors* 1-17. 2019
- 35. Feskanich, D., Weber, P., Willett, W.C., Rockett, H., Booth, S.L., Colditz, G.A.** Vitamin K intake and hip fractures in women: a prospective study. *The American Journal of Clinical Nutrition* 69:74-79. 1999
- 36. Rejnmark, L., Vestergaard, P., Charles, P., Hermann, A.P., Brot, C., Eiken, P., Mosekilde, L.** No effect of vitamin K1 intake on bone mineral density and fracture risk in perimenopausal women. *Osteoporosis International* 17:1122-1132. 2006
- 37. Dam, H., Galvind, J.** Vitamin K in the plant. *Biochemical Journal* 32:485-487. 1938
- 38. Ferland, G., Sadowski, J.A.** Vitamin K1 (phylloquinone) content of green vegetables: Effects of plant maturation and geographical growth location. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40:1874-1877. 1992

- 39. Gijsbers, BL., Jie, KS., Vermeer, C.** Effect of food composition on vitamin K absorption in human volunteers. *The British Journal of Nutrition* 76:223–9. 1996
- 40. Booth, SL., Lichtenstein, AH., Dallal, GE.** Phylloquinone absorption from phylloquinone-fortified oil is greater than from a vegetable in younger and older men and women. *The Journal of Nutrition* 132:2609–12. 2002
- 41. Jones, KS., Bluck, LJ., Wang, LY., Stephen, AM., Prynne, CJ., Coward WA.** The effect of different meals on the absorption of stable isotope labeled phylloquinone. *The British Journal of Nutrition* 102:1195–202. 2009
- 42. Goncalves, A., Margier, M., Roi, S., Collet, X., Niot, I., Goupy, P., Caris-Veyrat, C., Reboul, E.** Intestinal scavenger receptors are involved in vitamin K1 absorption. *Journal of Biological Chemistry* 289:30743-30752. 2014
- 43. Newman, P., Bonello, F., Wierzbicki, AS., Lumb, P., Savidge, GF., Shearer, MJ.** The uptake of lipoprotein-borne phylloquinone (vitamin K1) by osteoblasts and osteoblast-like cells: role of heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *Journal of Bone and Mineral Research* 17:426–33. 2002
- 44. Erkkilä, AT., Lichtenstein, AH., Dolnikowski, GG., Grusak, MA., Jalbert, SM., Aquino, KA., Peterson, JW., Booth, SL.** Plasma transport of vitamin K in men using deuterium-labeled collard greens. *Metabolism* 53:215–21. 2004
- 45. Niemeier, A., Kassem, M., Toedter, K., Wendt, D., Ruether, W., Beisiegel, U., Heeren J.** Expression of LRP1 by human osteoblasts: a mechanism for the delivery of lipoproteins and vitamin K1 to bone *Journal of Bone and Mineral Research* 20:283–93. 2005

46. Ji, ZS., Fazio, S., Lee, YL., Mahley, RW. Secretion-capture role for apolipoprotein E in remnant lipoprotein metabolism involving cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Journal of Biological Chemistry* 269:2764–72. 1994
47. Shimano, H., Namba, Y., Ohsuga, J., Kawamura, M., Yamamoto, K., Shimada, M., Gotoda, T., Harada, K., Yazaki, Y., Yamada N. Secretion-recapture process of apolipoprotein E in hepatic uptake of chylomicron remnants in transgenic mice. *Journal of Clinical Investigation* 93:2215. 1994
48. Nakagawa, K., Hirota, Y., Sawada, N., Yuge, N., Watanabe, M., Uchino, Y., Okuda, N., Shimomura, Y., Suhara, Y., Okano T. Identification of UBIAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme. *Nature* 468:117–21. 2010
49. Hirota, Y., Tsugawa, N., Nakagawa, K., Suhara, Y., Tanaka, K., Uchino, Y., Takeuchi, A., Sawada, N., Kamao, M., Wada, A., Okitsu, T., Okano, T. Menadione (vitamin K3) is a catabolic product of oral phylloquinone (vitamin K1) in the intestine and a circulating precursor of tissue menaquinone-4 (vitamin K2) in rats. *Journal of Biological Chemistry* 288:33071-33080. 2013
50. Schurgers, LJ., Vermeer, C. Differential lipoprotein transport pathways of K-vitamins in healthy subjects. *Biochimica et Biophysica Acta* 1570:27–32. 2002
51. McBurney, A., Shearer, MJ., Barkhan, P. Preparative isolation and characterization of the urinary aglycones of vitamin K1 (phylloquinone in man). *Biochemical Medicine* 24:250–67. 1980
52. Shearer, MJ., Newman, P. Metabolism and cell biology of vitamin K. *Thrombosis and Haemostasis* 100:530–47. 2008

- 53. Shearer, M.J., McBurney, A., Barkhan, P.** Studies on the absorption and metabolism of phylloquinone (vitamin K1) in man. *Vitamins and Hormones* 32:513–42. 1974
- 54. Usui, Y., Tanimura, H., Nishimura, N., Kobayashi, N, Okanoue, T, Ozawa, K.** Vitamin K concentrations in the plasma of surgical patients. *American Journal of Clinical Nutrition* 51:846-852. 1990
- 55. Harrington, D.J., Booth, S.L., Card, D.J., Shearer M.J.** Excretion of the urinary 5C- and 7C-aglycone metabolites of vitamin K by young adults responds to changes in dietary phylloquinone and dihydrophylloquinone intakes. *The Journal of Nutrition* 137:1763-1768. 2007
- 56. Krinsky, N.I., Johnson, E.J.** Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine* 26:459–516. 2005
- 57. Khachik, F., Spangler, C.J., Smith, J.C., Jr., Canfield, L.M., Steck, A., Pfander, H.** Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum. *Analytical Chemistry* 69:1873–1881. 1997
- 58. Tapiero, H., Townsend, D.M., Tew, K.D.** The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 58:100–110. 2004
- 59. Engelmann, N.J., Clinton, S.K., Erdman, J.W., Jr.** Nutritional aspects of phytoene and phytofluene, carotenoid precursors to lycopene. *Advances in Nutrition* 2:51–61. 2011
- 60. Moise, A.R., Al-Babili, S., Wurtzel, E.T.** Mechanistic aspects of carotenoid biosynthesis. *Chemical Reviews*. 114:164–193. 2014
- 61. Khachik, F., Beecher, G.R., Goli, M.B et al.** Separation, identification, and quantification of carotenoids in fruits, vegetables and human

- plasma by high performance liquid chromatography. *Pure Applied Chemistry* 63:71–80. 1991
- 62. Bowen, P.E., Herbst-Espinosa, S.M., Hussain, E.A., Stacewicz-Sapuntzakis, M.** Esterification does not impair lutein bioavailability in humans. *The Journal of Nutrition* 132:3668–3673. 2002
- 63. Shi, J., Le Maguer, M.** Lycopene in tomatoes: Chemical and physical properties affected by food processing. *Critical Reviews in Biotechnology* 20: 293–334. 2000
- 64. Rodriguez, E.B., Rodriguez-Amaya, D.B.** Formation of apocarotenals and epoxy carotenoids from beta-carotene by chemical reactions and by autoxidation in model systems and processed foods. *Food Chemistry* 101:563–572. 2007
- 65. Kopec, R.E., Riedl, K.M., Harrison, E.H., Curley, R.W., Jr., Hruszkewycz, D.P., Clinton, S.K., Schwartz, S.J.** Identification and quantification of apo-lycopenals in fruits, vegetables, and human plasma. *The Journal of Agriculture and Food Chemistry* 58:3290–3296. 2010
- 66. Ranard, K.M., Jeon, S., Mohn, E.S., G, J.C., Johnson, E.J., Erdman, J.W.** Dietary guidance for lutein: consideration for intake recommendations is scientifically supported. *European Journal of Nutrition* 56:37-42. 2017
- 67. Johnson, E.J.** The role of carotenoids in human health. *Nutrition in clinical care* :56-65. 2002
- 68. Bauernfeind, J.** Carotenoid vitamin A precursors and analogs in food and feeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 20:455–473. 1972
- 69. Moran, E., Mohn, E.S., Hason, N., Erdman, JW., Johnson, E.j.** Intrinsic and extrinsic factors impacting absorbtion, metabolism, and

- health-effects of dietary carotenoids. *Advances in Nutrition* 9:465–492. 2018
- 70. Noy, N.** Vitamin A. In: Stipanuk, M.H. (Ed.), *Biochemical, Physiological, Molecular Aspects of Human Nutrition*. Saunders Elsevier, St. Louis, MO:835–862 . 2006
- 71. Van den Berg, H.M., Faulks, R., Granado, H.F., Hirschberg, J., Begona, O.A., Sandman, G., Southon, S., Stahl, W.** The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80:880–912 . 2000
- 72. Eggersdorfer, M., Wyss, A.** Carotenoids in human nutrition and health, *Archives of Biochemistry and Biophysics* doi: 10.1016/j.abb.2018.06.001. 2018
- 73. Palozza, P., Serini, S., Di Nicuolo, F., Piccioni, E., Calviello, G.** Pro oxidant effects of beta-carotene in cultured cells. *Molecular Aspects of Medicine* 24:353–362. 2003
- 74. Zhang, LX., Cooney, RV., Bertram, JS.** Carotenoids up-regulate connexin 43 gene expression independent of their provitamin A or antioxidant properties. *Cancer Research* 52:5707–5712 . 1992
- 75. Leermakers, ET., Darweesh, SK., Baena, CP., Moreira, EM., Melo van Lent, D., Tielemans, MJ., Muka, T., Vitezova, A., Chowdhury, R., Bramer, WM.** The effects of lutein on cardiometabolic health across the life course: a systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition* 103:481–94. 2016
- 76. Schweiggert, RM., Mezger, D., Schimpf, F. et al.** Influence of chromoplast morphology on carotenoid bioaccessibility of carrot, mango, papaya, and tomato. *Food Chemistry* 135:2736–2742. 2012

- 77. West, CE., Castenmiller, JJ.** Quantification of the “SLAMENGGHI” factors for carotenoid bioavailability and bioconversion. *Internal Journal for Vitamin and Nutrition Research* 68:371–377. 1998
- 78. Rodriguez-Amaya, DB., Kimura, M.** Harvest Plus handbook for carotenoid analysis, Harvest Plus technical monograph 2. International Food Policy Research Institute (IFPRI) and International Center for Tropical Agriculture (CIAT), Washington, DC/Calif. 2004.
- 79. Yahia, EM., Ornelas-Paz, J de J.** Chemistry, stability and biological actions of carotenoids. In: De la Rosa LA, Alvarez-Parrilla E, Gonzalez-Aguilar GA (eds) Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability. *Wiley-Blackwell, Iowa*:177–222. 2010
- 80. Azevedo-Meleiro, CH., Rodriguez-Amaya, DB.** Carotenoid composition of kale as influenced by maturity, season and minimal processing. *J of the Science of Food and Agriculture* 18:591–597. 2005
- 81. Azevedo-Meleiro, CH., Rodriguez-Amaya, DB.** Carotenoids of endive and New Zealand spinach as affected by maturity, season and minimal processing. *Journal of Food Composition and Analysis* 18:845–855. 2005
- 82. Cervantes-Paz, B., Vivtoria-campos, C.I., Ornelas-Paz, J.D.J.** Absorption of carotenoids and mechanism involved in their health-related properties. *Sub-cellular Biochemistry* 79:415-54. 2016
- 83. Furr, HC, Clark, R.M.** Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids. *Journal of Nutritional Biochemistry* 8:364–377. 1997
- 84. Reboul, E., Borel, P.** Proteins involved in uptake, intracellular transport and basolateral secretion of fat-soluble vitamins and carotenoids by mammalian enterocytes. *Progress in Lipid Research* 50:388–402. 2011

- 85. Borel, P.** Genetic variations involved in inter individual variability in carotenoid status. *Molecular Nutrition and Food Research* 56:228–240. 2012
- 86. Parker, RS.,** Absorption, metabolisms, and transport of carotenoids. *FASEB Journal* 10:542–551. 1996
- 87. Reboul, E.** Absorption of vitamin A and carotenoids by enterocyte: focus on transport proteins. *Nutrients* 5:3563–3581. 2013
- 88. Reboul, E.,** Mechanisms of Carotenoid Intestinal Absorption: Where Do We Stand? *Nutrients* 11,838. 2019
- 89. Canane-Adams, K., Erdman, J.W.** Absorbition, Transport, Distribution in Tissue and Bioavailability. *Nutrition and Health* 5:115-148. 2009
- 90. Desmarchelier, C., Borel, P.** Overview of carotenoid bioavailability determinants: From dietary factors to host genetic variations: Carotenoid bioavailability determinants. *Trends in Food Science and Technology*, Elsevier, 69 (B), Epub ahead of print. [ff10.1016/j.tifs.2017.03.002](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.03.002)[ff.fffinserm-01499484ff](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.03.002). 2017
- 91. Thomas, S. E., Harrison, E. H.** Mechanisms of selective delivery of xanthophylls to retinal pigment epithelial cells by human lipoproteins. *Journal of Lipid Research* 57:1865-1878. 2016
- 92. Dwyer, J.T., Coates, P.M., Smith M.J.** Dietary Supplements: Regulatory Challenges and Research Resources. *Nutrients* 10,41. 2018
- 93. Aronson, J.K.,** Defining ‘nutraceuticals’: neither nutritious nor pharmaceutical. The British Pharmacological Society DOI:10.1111/bcp.12935

- 94. Liu RH.** Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal of Nutrition* 134:3479S–85S. 2004
- 95. Bloch, A.S.,** Nutrition for health promotion: Phytochemicals, functional food, and alternative approaches to combat obesity. *Dental Clinics of North America* 47:411–423. 2003
- 96. Vogelzang, J.L.** What you need to know about dietary supplements. *Home Healthcare Nurse* no 1. 2001
- 97. Gasper, A. V., Al-Janobi, A., Smith, J. A., Bacon, J. R., et al.,** Glutathione S-transferase M1 polymorphism and metabolism of sulforaphane from standard and high-glucosinolate broccoli. *The American Journal of Clinical Nutrition* 82:1283 –1291. 2005
- 98. Granato, D., Barba, F.J., Kovacevic, D.B., Lorenzo, J.M., Cruz, A.G., Putnik, P.** Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. *Annual Review of Food Science and Technology* 11:3.1-3.26. 2020
- 99. Leclercq, S., Harlander, KR., Reineccius GA.** Formation and characterization of microcapsules by complex coacervation with liquid or solid aroma cores. *Flavour and Fragrance Journal* 24:17–24. 2009
- 100. Atwell, L.L., Hsu, A., Wong, P., Stevens, J., Bella, D, Yu, W., Pereira, C., Löhr, C., Christensen, J.M., Dashwood, R.H., Williams, D.E., Shannon, J., Ho, E.** Absorption and chemopreventive targets of sulforaphane in humans following consumption of broccoli sprouts or a myrosinase-treated broccoli sprout extract. *Molecular Nutrition and Food Research* 59: 424-433. 2015
- 101. Ye, L., Dinkova-Kostova, A., Wade, K.L., Zhang, Y., Shapiro, T.A., Talalay, P.** Quantitative determination of dithiocarbamates in human plasma, serum, erythrocytes and urine:

- pharmacokinetics of broccoli sprout isothiocyanates in humans. *Clinica Chimica Acta* 316:43-53. 2002.
- 102. Biswas, A.K., Sahoo, J., Chatli, M.K.** A simple UV-Vis spectrophotometric method for determination of β -carotene content in raw carrot, sweet potato and supplemented chicken meat nuggets. *Food Science and Technology* 44:1809-1813. 2011
- 103. Chauveau-Duriot, B., Doreau, M., Nozière, P., Graulet, B.** Simultaneous quantification of carotenoids, retinol, and tocopherols in forages, bovine plasma, and milk: validation of a novel UPLC method. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397:777-790. 2010
- 104. Bogue, J., Collins, O., Troy, A.J.** Market analysis and concept development of functional foods. *Developing of New Functional Food Nutraceutical* 29-45. 2017
- 105. Fahey, J.W., Dinkova-Kostova, A.T., Stephenson, K.K., Talalay, P.** The “Prochaska” microtiter plate bioassay for inducers of NQO1. *Methods in Enzymology* 382:243–258. 2004
- 106. Posner, G.H., Cho, C.G., Green, J.V., Zhang, Y., Talalay, P.** Design and synthesis of bifunctional isothiocyanate analogs of sulforaphane: Correlation between structure and potency as inducers of anticarcinogenic detoxication enzymes. *Journal of Medicinal Chemistry* 37:170–176. 1994
- 107. Cieřlik, E., Leszczynska, T., Sikora, A., Pisulewsky, P.** Effect of some technological processes on glucosinolate contents in cruciferous vegetables. *Food Chemistry* 105:976-981. 2007
- 108. Rodrigues, A. S., Rosa, E. A. S.** Effect of postharvest treatments on the level of glucosinolates in broccoli. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79:1028 –1032. 1999

- 109. Lijiang, S., Paul, J., Thornalley.** Effect of storage, processing and cooking on glucosinolate content of *Brassica* vegetables. *Food and Chemical Toxicology* 45:216-224. 2007
- 110. Ludikhuyze, L., Ooms, V., Weemaes, C., Hendrickx, M.** Kinetic study of the irreversible thermal and pressure inactivation of myrosinase from broccoli (*Brassica oleracea* L. cv. *Italica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:1794–1800. 1999
- 111. Ludikhuyze, L., Rodrigo, L., Hendrickx, M.** The activity of myrosinase from broccoli (*Brassica oleracea* L. cv. *Italica*): Influence of intrinsic and extrinsic factors. *Journal of Food Protection* 63:400–403. 2000
- 112. Pellegrini, N., Chiavaro, E., Gardana, C., Mazzeo, T., Contino, D., Gallo, M, et al.** Effect of different cooking methods on color, phytochemical concentration, and antioxidant capacity of raw and frozen *Brassica* vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 4310–4321. 2010
- 113. Xu, F., Zheng, Y., Yang, Z., Cao, S., Shao, X., Wang, H.,** Domestic cooking methods affect the nutritional quality of red cabbage. *Food Chemistry* 161:162-167. 2014
- 114. Miglio, C., Chiavaro, E., Visconti, A., Fogliano, V., Pellegrini, N.** Effects on different cooking methods on nutritional and physicochemical characteristics of selected vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:139-147. 2008
- 115. Vallejo, F., Tomas-Barberan, FA., Garcia-Viguera C .** Glucosinolates and vitamin C content in edible parts of broccoli florets after domestic cooking. *European Food Research and Technology* 215:310–316. 2002

- 116. Mahn, A., Reyes, A.** An overview of health-promoting compounds of broccoli (*Brassica Oleracea* var. *Italica*) and the effect of processing. *Food Science and Technology International* 18:503-514. 2011
- 117. Walsh, R., Barlett, H., Eperjesi, F.** Variation in carotenoid content of kale and other vegetables: a review of pre- and post- harvest effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63:9677-9682. 2015
- 118. Pugliese, A., Loizzo, M.R., Tundis, R., O'Callaghan, Y., Galvin, K., Menichini, F., O'Brien, N.** The effect of domestic processing on the content and bioaccessibility of carotenoids from chili peppers (*Capsicum* species). *Food Chemistry* 141:2606-2613. 2013
- 119. Pugliese, A., O'Callaghan, Y., Tundis, R., Galvin, K., Menichini, F., O'Brien, N., Loizzo, M.R.** In vitro investigation of the bioaccessibility of carotenoids from raw, frozen and boiled red chili peppers (*Capsicum annum*). *European Journal of Nutrition* 53:501-10. 2014
- 120. Gutzeit, D., Baleanu, G., Winterhalter, P., Jerz, G.** Determination of Processing Effects and of Storage Stability on Vitamin K1 (phylloquinone) in Sea Buckthorn Berries (*Hippophaë rhamnoides* L. ssp. *rhamnoides*) and related Product. *Journal of Food Science* Nr9, 2007.
- 121. Seongeung, L., Youngmin, C., Heon Sang, J., Junsoo, L., Jeehye, S.** Effect of different cooking methods on the content of vitamins and true retention in selected vegetables. *Food Science Biotechnology* 12; 27:333-342. 2017
- 122. Cheng, DL., Hashimoto, K., Uda, Y.** In vitro digestion of sinigrin and glucotropaeolin by single strains of *Bifidobacterium* and identification of the digestive products. *Food and Chemical Toxicology* 42:351–357. 2004

123. **Getahun, SM., Chung, FL.** Conversion of glucosinolates to isothiocyanates in humans after ingestion of cooked watercress. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 8:447–451. 1999
124. **Shapiro, T. A., Fahey, J. W., Wade, K. L., Stephenson, K. K., et al.** Chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of broccoli sprouts: Metabolism and excretion in humans. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 10:501–508. 2001
125. **Clarke, J., Hsu A., Riedl, K., Bella., Schwartz, S.V., Stevens, J.F., Ho, E.** Bioavailability and inter-conversion of sulforaphane and erucin in human subjects consuming broccoli sprouts or broccoli supplement in a cross-over study design. *Pharmacological Research* 64:456–463. 2011
126. **Saha, S., Hollands, W., Teucher, B., Needs, P.W., Narbad, A., Ortori, C.A., Barrett, D.A., Rossiter, J.T., Mithen, R.F., Kroon P.A.** Isothiocyanate concentrations and interconversion of sulforaphane to erucin in human subjects after consumption of commercial frozen broccoli compared to fresh broccoli. *Molecular Nutrition and Food Research* 56:1906–1916. 2012
127. **Rouzaud, G., Rabot, S., Ratcliffe, B., Duncan, AJ.** Influence of plant and bacterial myrosinase activity on the metabolic fate of glucosinolates in gnotobiotic rats. *British Journal of Nutrition* 90:395–404. 2003
128. **Combourieu, B., Elfoul, L., Delort, AM., Rabot, S.** Identification of new derivatives of sinigrin and glucotropaeolin produced by the human digestive microflora using H-1 nmR spectroscopy analysis of in vitro incubations. *Drug Metabolism and Disposition* 29:1440–1445. 2001

129. **Rungapamestry, V., Duncan, A.J., Fuller, Z., Ratcliffe, B.** Effect of cooking Brassica vegetables on the subsequent hydrolysis and metabolic fate of glucosinolates. *Proceedings of the Nutrition Society* 66:69–81. 2007
130. **Garber, A., Binkley, N.C., Krueger, C., Suttie, J.W.** Comparison of Phylloquinone Bioavailability from Food Sources or a Supplement in human Subject. *The Journal of Nutrition* 129:1201-3. 1999
131. **Novotny, J., Kurilich, A.C., Britz, S.J., Baer, D.J., Clevidence B.A.** Vitamin K absorption and kinetics in human subjects after consumption of ¹³C-labelled phylloquinone from kale. *British Journal of Nutrition* 104:858-862. 2010
132. **Kurilich, A.C., Britz, S.J., Beverly, A., Clevidence B.A. Novotny, J.** Isotopic Labelling and LC-APCI-MS Quantification for Investigating Absorption of Carotenoids and Phylloquinone from kale (*Brassica oleracea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:4877-4883. 2003
133. **Brown, ED., Micozzi, MS., Craft, NE., Bieri, JG., Beecher, Edwards BK., Rose, A., Taylor, PR., Smith, JC.** Plasma carotenoids in normal men after a single ingestion of vegetables or purified β -carotene. *The American Journal of Clinical Nutrition* 49:1258-65. 1989

7 SITOGRAFIA

- a) www.unesco.it
- b) www.eufic.org
- c) www.salute.gov.it

Ringraziamenti

Finalmente sono giunta ai ringraziamenti.

Questa è la parte più semplice ma forse "più sentita"
di questo lavoro e di questo percorso.

Voglio ringraziare infinitamente i miei genitori per la pazienza
(ne è servita molta), il sostegno ed il supporto incondizionato.

Se ce l'ho fatta è grazie a voi